



UNIVERZITET U NIŠU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU



**Vesna M. Novković**

**DOBIJANJE DIGOKSINA IZ SMEŠE SEKUNDARNIH  
GLIKOZIDA *Digitalis lanata* Ehrh. RAZLIČITIM TEHNIKAMA  
EKSTRAKCIJE TEČNOST-TEČNOST**

**Doktorska disertacija**

**Leskovac, 2014.**



**UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF TECHNOLOGY, LESKOVAC**



**Vesna M. Novković**

**ISOLATION OF DIGOXIN FROM SECONDARY GLYCOSIDE  
MIXTURE OF *Digitalis lanata* Ehrh. USING DIFFERENT  
LIQUID-LIQUID EXTRACTION TECHNIQUES**

**Doctoral dissertation**

**Leskovac, 2014**

**MENTOR:**

**Prof. dr Vlada Veljković**  
**Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu**

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**Prof. dr Milorad Cakić**  
**Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu**

**Prof. dr Slobodan Petrović**  
**Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet**

**Datum odbrane**\_\_\_\_\_

## ZAHVALNOST

*Prof. dr Vladi Veljkoviću, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, koji je u svojstvu mentora rukovodio izradom. Neizmerno sam zahvalna na dragocenim uputstvima u toku eksperimentalne izrade, u obradi eksperimentalnih rezultata i prezentaciji rezultata rada.*

*Duboku zahvalnost dugujem prof. dr Miloradu Cakiću, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, na podršci i pomoći u izboru metoda, kao i izradi i prezentaciji rezultata kvalitativne i kvantitativne karakterizacije izolovanih supstanci.*

*Prof. dr Slobodanu Petroviću dugujem neizmernu zahvalnost na pomoći i korisnim sugestijama u toku rada i obradi rezultata rada.*

*Disertacija je deo rezultata istraživanja na projektu TR 34012, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

*Veliku zahvalnost dugujem mojoj porodici ćerki Ivani, sinu Dušanu i suprugu Ivanu na bezgraničnoj moralnoj podršci i razumevanju.*

**Vesna**

# DOBIJANJE DIGOKSINA IZ SMEŠE SEKUNDARNIH GLIKOZIDA *Digitalis lanata* Ehrh. RAZLIČITIM TEHNIKAMA EKSTRAKCIJE TEČNOST-TEČNOST

## REZIME

Predmet proučavanja ove doktorske disertacije su fermentacija lišća *Digitalis lanata* Ehrh. u kojoj se enzimskom transformacijom lanatozida A, B i C (LA, LB i LC) dobijaju sekundarni glikozidi digitoksin (Dx), gitoksin (Gx) i digoksin (Dgx), ekstrakcija sekundarnih glikozida perkolacijom sa razblaženim vodeno-alkoholnim rastvorima (10-50 % vol.), prečišćavanje dobijenih perkolata, dobijanje suvih hloroformskih i trihloretilenskih ekstrakata (izolata) smeše sekundarnih glikozida iz perkolata i izolacija Dgx visoke čistoće (preko 96 %) iz rastvora izolata frakcionim rastvaranjem, diskontinualnom ekstrakcijom tečnost-tečnost i kontinualnom protivstrujnom frakcionom ekstrakcijom tečnost-tečnost na Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni. Korišćeno je suvo samleveno lišće plantažno gajenog *Digitalis lanata* Ehrh. Osnovni cilj ove doktorske disertacije je bio razvoj procesa dobijanja sekundarnog kardiotoničnog glikozida Dgx iz lišća *Digitalis lanata* Ehrh.

Najpre su definisani optimalni operativni uslovi fermentacije samlevenog suvog lišća *Digitalis lanata* L. Ehrh. u anaerobnim uslovima na 37 °C: srednji prečnik delova samlevenog biljnog materijala 7 mm i odnos voda-biljni materijal 1:2 m/v. Po prvi put je utvrđen uticaj srednjeg prečnika samlevnog lišća na stepen enzimске hidrolize LC do Dgx. Zatim su određeni optimalni operativni uslovi ekstrakcije Dgx perkolacijom iz fermentisanog biljnog materijala: srednji prečnik delova samlevenog biljnog materijala 7 mm, visina punjenja perkolatora biljnim materijalom 30 cm, rastvarač za perkolaciju (rastvor etanola 10 % vol.) i protok perkolata 4 dm<sup>3</sup>/h (odnosno vreme zadržavanja perkolata u perkolatoru 4 h), pri kojima je ostvaren stepen ekstrakcije Dgx veći od 95 %. Takođe, određeni su optimalni uslovi prečišćavanja tečnih ekstrakata ekstrakcijom pomoću hloroforma ili trihloretilena. Koncentrovanjem dobijenog tečnog ekstrakta uparavanjem pod vakuumom, obradom sa magnezijum-oksidom, filtracijom pod vakuumom i isparavanjem rastvarača pod vakuumom (60 °C) dobijen je suvi ekstrakt (izolat) sa sadržajem smeše sekundarnih glikozida od oko 80 %. Frakcionim rastvaranjem

nečistoća suvog izolata smeše sekundarnih glikozida u smeši aceton-voda (7:1 do 10:1 vol.) uz refluks izolovan je Dgx visoke čistoće (preko 96 %). Dalje prečišćavanje Dgx je izvršeno diskontinualnim i kontinualnim postupkom. Prvi postupak je izveden u levcima za odvajanje (15 levaka sa lakom fazom i 15 levaka sa teškom fazom) korišćenjem sistema EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15:20:30 vol., čije su laka i teška faza međusobno zasićene pri koncentraciji sekundarnih glikozida rastvorenih u lakoj fazi od 15 g/dm<sup>3</sup> i odnosu zapremine lake i teške faze 1:1,1. Laka faza je uparena do 1/3 polazne zapremine, posle čega su kristali Dgx odvojeni filtracijom pod vakuumom i sušeni. Prinos Dgx je bio 98 % Dgx. Kontinualno prečišćavanje je izvedeno u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni sa protivstrujnim proticanjem lake i teške faze. Najveći stepen ekstrakcije Dgx (preko 99 %) u lakoj fazi ostvaruje se uvođenjem napojnog rastvora smeše sekundarnih glikozida (izolata), koncentracije 45 g/dm<sup>3</sup> u teškoj fazi, na sredini kolone visine 4 m, korišćenjem sistema rastvarača EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15:20:30 vol. pri odnosu protoka lake i teške faze 1:1,1 vol., rastojanju između pločica 2,5 cm, hodu vibracionog seta 2 cm i frekvencijom vibracije 125 min<sup>-1</sup>. Ovim postupkom dobijen je Dgx visoke čistoće oko 99 %. Metodama propisanim oficijelnom farmakopejom (Ph. Eur., 7<sup>th</sup>Edition, 2012) potvrđeno je da finalni proizvod sadrži 98,6-100,2 % Dgx.

**Ključne reči:** Enzimaska hidroliza, ekstrakcija tečnost-tečnost, maceracija, perkolacija, digoksin, Karr-ova ekstrakciona vibraciona kolona, sekundarni glikozidi, vunasti digitalis, prečišćavanje biljnih ekstrakata, *Digitalis lanata* Ehrh.

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Hemijski inženjerstvo

**UDK:** 547.918; 66.061.34

# ISOLATION OF DIGOXIN FROM SECONDARY GLYCOSIDES MIXTURE OF *Digitalis lanata* Ehrh. USING DIFFERENT LIQUID-LIQUID EXTRACTION TECHNIQUES

## SUMMARY

The present doctoral dissertation deals with the fermentation of leaves of *Digitalis lanata* Ehrh. (woolly foxglove) causing the enzymatic transformation of lanatoside A, B and C (LA, LB and LC) into the secondary glycosides digitoxin (Dx), gitoxin (Gx) and digoxin (Dgx), the extraction of the secondary glycosides by percolation using the aqueous solutions of methanol and ethanol (10-50 % v/v), the purification of the percolates, the preparation of dry extracts of secondary glycosides using chloroform or trichlorethylene and the isolation of highly pure Dgx (>96 %) from the solution of the dry extracts by fractional dissolution employing either the batch liquid-liquid extraction or continuous countercurrent liquid-liquid extraction in a Karr's extraction reciprocating plate column. Ground dried leaves cultivated of *Digitalis lanata* Ehrh. were used. The main goal was to develop the process for obtaining Dgx from the leaves of *Digitalis lanata* Ehrh.

At first, the optimal operating conditions of the fermentation of leaves of *Digitalis lanata* Ehrh. under anaerobic conditions at 37 °C were determined to be as following: the mean size of plant particles of 7 mm and the water-to-plant material 1:2 g/cm<sup>3</sup>. Then, the optimal operating conditions of Dgx extraction from the fermented plant material by percolation ensuring the Dgx extraction degree higher than 95 % were found to be as follows: the mean size of plant particles of 7 mm, the depth of the plant material in the extractor of 30 cm, the 10 % vol. ethanol solution as the extracting solvent and the percolate flow rate of 4 dm<sup>3</sup>/h (i.e. the residence time of 4 h). Also the optimal conditions of purification of the liquid extract using chloroform or trichlorethylene. The obtained liquid extracts were evaporated under vacuum, treated by MgO, filtrated under vacuum and evaporated under vacuum (60 °C). The obtained dry extract contained about 80 % of the secondary glycosides. It was treated with a mixture of acetone and water (7:1 to 10:1 vol.) under reflux to get the Dgx product of high purity (>96 %). Further purification of

Dgx was conducted by the batch and continuous processes. The first process was carried out using separating funnels (15 funnels for the light phase and 15 funnels for the heavy phase) and the extraction system EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15:20:30 vol., having the saturated phases, at the concentration of secondary glycosides dissolved in the light phase of 15 g/dm<sup>3</sup> and the volumetric ratio of light-to-heavy phase 1:1.1. The light phase was evaporated until the third of the initial volume. The Dgx crystals were separated by filtration under vacuum and dried. The Dgx yield was 98 %. The purification of Dgx was also carried out in the Karr's extraction reciprocating plate column with countercurrent flows of the phases. The highest Dgx extraction degree (> 99 %) in the light phase was achieved when the solution of secondary glycosides (45 g/dm<sup>3</sup> in the heavy phase) was fed in the middle of the column (4 h high) using the solvent system EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE = 35: 15:20: 30 vol. at the volumetric ratio of light-to-heavy phase 1:1.1, the spacing between the perforated plates 2.5 cm, the stroke 2 cm and the frequency 125 min<sup>-1</sup>. The Dgx product of high purity (99 %) was obtained, containing 98.6-100.2 % Dgx.

**Ključne reči:** Enzymatic hydrolysis, liquid-liquid extraction, percolation, digoxin, Karr's extraction reciprocating plate column, secondary glycosides, *Digitalis lanata* Ehrh., woolly foxglove, purification of plant extracts.

**Scientific field:** Technological engineering

**Specific scientific field:** Chemical engineering

**UDC:** 547.918; 66.061.34



# SIMBOLI I SKRAĆENICE

## SIMBOLI

$a$  - specifična kontaktna površina između rastvarača i biljnih čestica

$b$  - koeficijent ispiranja ekstraktivne materije

$c$  - koncentracija ekstrahovanih materija iz biljnog materijala

$c$  - aktuelna koncentracija rastvora ekstraktivnih materija

$c_0$  - uniformna koncentracij ekstraktivnih materija u pseudo-čestici

$c_s$  - koncentracija zasićenog rastvora ekstraktivnih materija

$c = c_w$  aktuelna koncentracija rastvora za  $t = 0$

$\bar{c}$  - srednja koncentracija ekstraktivnih materija u biljnim česticama

$D_{ef}$  - efektivni koeficijent difuzije ekstraktivnih materija

$E$  – ekstrakcioni broj

$h$  - geometrijski parametar

$k_L = D_{ef} / \delta$  - koeficijent prenosa mase ekstraktivnih materija u tečnoj fazi

$k$  - koeficijent spore ekstrakcije u jednačini (1.12)

$k_L a$  - zapreminski koeficijent prenosa mase ekstraktivnih materija u tečnoj fazi

$K$  - koeficijent raspodele odgovarajuće supstance

$K_c$  - ukupni koeficijent prenosa mase (jednačina 1.14)

$l$  - debljina biljne čestice u obliku ploče

$m$  - količina materije koja prelazi iz jedne u drugu fazu (jednačina 1.14)

$p$  – parametar u jednačinama 1.21–1.24

$q$  - masa ekstraktivnih materija prisutnih u biljnoj sirovini posle određenog vremena ekstrakcije

$q_0$  - masa ekstraktivnih materija prisutnih u biljnoj sirovini na početku ekstrakcije

$R$  - poluprečnik čestice biljnog materijala u obliku sfere ili poluprečnik osnove cilindra čestice

$t$  - vreme

$t_1$  i  $t_2$  – koeficijenti pravaca pravih u jednačinama 1.22–1.26

$V_L$  – zapremina lake faze

$V_T$  – zapremina teške faze

$x$  - rastojanje u pravcu prenosa mase

$\alpha$ - specifična međufazna površna( jednačina 1.14),konstanta u jednačini (1.3),zapreminski faktor (jednačina 1.19)

$\beta$  -faktor selektivnosti rastvarača za dati par čvrstih matreija (jednačina 1.15), konstanta u jednačini (1.3)

$\delta$  - debljina difuzionog sloja oko biljne čestice

$\nu$  - odnos zapremina lake i teške faze (jednačina 1.16)

### **SKRAĆENICE**

Dx–digitoksin

Dgx –digoksin

Gx–gitoksin

LA, LB, LC, LD i LE - lanatozidi A, B, C, D i E

SEM – suve ekstraktivne materija

UG – ukupni glikozidi

## SADRŽAJ

	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>TEORIJSKI DEO</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>VUNASTI DIGITALIS (<i>Digitalis lanata</i> Ehrh.)</b>	<b>7</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Opšte botaničke karakteristike</b>	<b>7</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Berba i sušenje</b>	<b>8</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Organoleptičke karakteristike suvog lišća</b>	<b>9</b>
<b>1.1.4</b>	<b>Hemijski sastav</b>	<b>9</b>
<b>1.1.5</b>	<b>Hemija i stereochemija kardi toničnih glikozida</b>	<b>9</b>
<b>1.1.6</b>	<b>Farmakološke karakteristike</b>	<b>10</b>
<b>1.1.7</b>	<b>Primena</b>	<b>11</b>
<b>1.2</b>	<b>ENZIMSKE TRANSFORMACIJE PRIMARNIH DO SEKUNDA- RNIH KARDIOTONIČNIH GLIKOZIDA FERMENTACIJOM LIŠĆA <i>Digitalis lanata</i> Ehrh.</b>	<b>12</b>
<b>1.3</b>	<b>EKSTRAKCIJA ČVRSTO-TEČNO BIOAKTIVNIH MATERIJAMA IZ BILJNIH SIROVINA</b>	<b>13</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Osnovne zakonitosti ekstrakcije bioaktivnih materija iz biljnih materijala</b>	<b>13</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Uticaj operativnih uslova na proces ekstrakcije</b>	<b>17</b>
<b>1.3.3</b>	<b>Prenos mase u toku ekstrakcije čvrsto-tečno</b>	<b>20</b>
<b>1.3.3.1</b>	<b>Kinetički model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal</b>	<b>21</b>
<b>1.3.3.2</b>	<b>Kinetički model zasnovan na teoriji fima</b>	<b>23</b>
<b>1.3.4</b>	<b>Postupci ekstrakcije čvrsto-tečno bioaktivnih materija iz biljnih materijala</b>	<b>24</b>
<b>1.3.4.1</b>	<b>Ekstrakcija maceracijom</b>	<b>24</b>
<b>1.3.4.2</b>	<b>Ekstrakcija perkolacijom</b>	<b>26</b>
<b>1.4</b>	<b>EKSTRAKCIJA TEČNOST-TEČNOST BIOAKTIVNIH MATERIJAMA IZ BILJNIH EKSTRAKATA</b>	<b>26</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Osnovne zakonitosti ekstrakcije tečnost–tečnost</b>	<b>27</b>
<b>1.4.1.1</b>	<b>Izbor rastvarača i sastava faza</b>	<b>28</b>
<b>1.4.1.2</b>	<b>Diskontinualna ekstrakcija tečnost–tečnost</b>	<b>32</b>
<b>1.4.1.3</b>	<b>Kontinualna ekstrakcija tečnost-tečnost u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni</b>	<b>33</b>

<b>2.</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DEO</b>	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIJAL</b>	<b>35</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Biljna sirovina</b>	<b>35</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Hemikalije</b>	<b>35</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Reagensi</b>	<b>35</b>
<b>2.2</b>	<b>METODE</b>	<b>36</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Mlevenje biljne sirovine</b>	<b>36</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Fermentacija biljne sirovine</b>	<b>36</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Sadržaj digitoksina, gitoksina, digoksina i ukupnih glikozida u fermentisanom biljnom materijalu</b>	<b>36</b>
<b>2.2.3.1</b>	<b>Priprema osnovnog rastvora</b>	<b>36</b>
<b>2.2.3.2</b>	<b>Sadržaj digitoksina, gitoksina, digoksina i srodnih materija u suvim izolatima</b>	<b>37</b>
<b>2.2.3.3</b>	<b>Određivanje sadržaja digitoksina, gitoksina i digoksina u izolatima i kristalizatu digoksina metodom HPLC</b>	<b>38</b>
<b>2.2.3.4</b>	<b>Sadržaj izolovanog digoksina</b>	<b>39</b>
<b>2.2.3.5</b>	<b>Ekstrakcija sekundarnih glikozida iz fermentisanog lišća</b>	<b>39</b>
<b>2.3</b>	<b>PREČIŠĆAVANJE PERKOLATA, EKSTRAKCIJA SEKUNDARNIH GLIKOZIDA IZ PERKOLATA I DOBIJANJE SUVIH IZOLATA SMEŠE SEKUNDARNIH GLIKOZIDA</b>	<b>40</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Obrada ekstrakata sa baznim olovo(II)-acetatom i ekstrakcija hloroformom ili trihloretilenom (metod I)</b>	<b>40</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Ekstrakcija tečnost-tečnost (metod II)</b>	<b>40</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Obrada koncentrovanog hloroformskog ili trihloretilenskog ekstrakta magnezijum-oksidom (metod III)</b>	<b>41</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Obrada koncentrovanog hloroformskog ili trihloretilenskog ekstrakta aluminijumom-oksidom (metod IV)</b>	<b>41</b>
<b>2.3.5</b>	<b>Ekstrakcija rastvorom natrijum-karbonata (metod V)</b>	<b>42</b>
<b>2.3.6</b>	<b>Ekstrakcija smešom petroletar-etilacetat 80:20 vol. (metod VI)</b>	<b>42</b>
<b>2.4</b>	<b>IZOLACIJA DIGOKSINA FRAKCIONIM RASTVARANJEM IZOLATA SMEŠE SEKUNDARNIH GLIKOZIDA VODENIM RASTVORIMA ACETONA</b>	<b>43</b>

<b>2.5</b>	<b>IZOLACIJA DIGOKSINA DISKONTINUALNOM EKSTRAKCIJOM TEČNOST-TEČNOST IZ RASTVORA IZOLATA SMEŠE SEKUNDARNIH GLIKOZIDA</b>	<b>43</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Izdvajanje digoksina visoke čistoće iz izolata smeše sekundarnih glikozida ekstrakcijom tečnost-tečnost</b>	<b>43</b>
<b>2.5.1.1</b>	<b>Izbor sistema rastvarača</b>	<b>44</b>
<b>2.5.1.2</b>	<b>Koncentrovanje lake faze i izdvajanje kristala digoksina</b>	<b>44</b>
<b>2.5.1.3</b>	<b>Uparavanje teške faze i izdvajanje smeše Dx i Gx sa pratećim materijama</b>	<b>44</b>
<b>2.6</b>	<b>KONTINUALNA PROTIVSTRUJNA EKSTRAKCIJA TEČNOST-TEČNOST NA KARR-OVOJ EKSTRAKCIJONJOJ VIBRACIONOJ KOLONI</b>	<b>45</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Opis eksperimentalnog postrojenja</b>	<b>45</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Priprema sistema rastvarača za razdvajanje i napojnog rastvora suvih ekstrakata sekundarnih glikozida</b>	<b>47</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Ravnotežna raspodela digoksina između lake i teške faze sistemu EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15: 20:30 vol.</b>	<b>48</b>
<b>2.6.4</b>	<b>Definisanje optimalnih operativnih uslova rada ekstrakcione kolone</b>	<b>48</b>
<b>3.</b>	<b>REZULTATI I DISKUSIJA</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>FERMENTACIJA BILJNOG MATERIJALA</b>	<b>50</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Uticaj operativnih uslova fermentacije na prinos digitoksina, gitoksina i digoksina</b>	<b>50</b>
<b>3.2</b>	<b>EKSTRAKCIJA SEKUNDARNIH GLIKOZIDA I UKUPNIH GLIKOZIDA IZ FERMENTISANOG BILJNOG MATERIJALA</b>	<b>51</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Ekstrakcija sekundarnih i ukupnih glikozida maceracijom</b>	<b>51</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Ekstrakcija sekundarnih i ukupnih glikozida perkolacijom</b>	<b>52</b>
<b>3.2.2.1</b>	<b>Uticaj protoka rastvarača na stepen stepen ekstrakcije digitoksina, gitoksina i digoksina</b>	<b>52</b>
<b>3.2.2.2</b>	<b>Uticaj visine punjenja perkolatora na efikasnost perkolacije vodom</b>	<b>53</b>
<b>3.2.2.3</b>	<b>Uticaj stepena usitnjenosti biljnog materijala na efikasnost perkolacije</b>	<b>58</b>
<b>3.3</b>	<b>PREČIŠĆAVANJE EKSTRAKATA FERMENTISANOG LIŠĆA <i>Digitalis lanata</i> Ehrh.</b>	<b>63</b>

<b>3.4</b>	<b>IZOLACIJA DIGOKSINA IZ TRIHLORETILENSKOG IZOLATA SMEŠE SEKUNDARNIH GLIKOZIDA</b>	<b>65</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Frakciono rastvaranje u smeši voda-aceton</b>	<b>65</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Diskontinualna istostrujna ekstrakcija tečnost-tečnost u levcima za odvajanja</b>	<b>66</b>
<b>3.4.2.1</b>	<b>Izbor sistema za razdvajanje digitoksina, gitoksina i digoksina</b>	<b>66</b>
<b>3.4.2.2</b>	<b>Ravnotežna raspodela digoksina u sistemu EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:THE = 35: 15:20: 30 vol.</b>	<b>72</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Kontinualna protivstrujna frakciona ekstrakcija tečnost- tečnost</b>	<b>73</b>
<b>3.4.3.1</b>	<b>Optimalni uslovi razdvajanja sekundarnih glikozida</b>	<b>73</b>
<b>3.4.3.2</b>	<b>Uticaj rastojanja između pločica na efikasnost kontinualne protivstrujne frakcione ekstrakcije tečnost-tečnost</b>	<b>79</b>
<b>3.4.3.3</b>	<b>Uticaj hoda seta na efikasnost kontinualne protivstrujne frakcione ekstrakcije tečnost-tečnost</b>	<b>80</b>
<b>3.4.3.4</b>	<b>Uticaj frekvencije vibracije na efikasnost kontinualne protivstrujne frakcione ekstrakcije tečnost-tečnost</b>	<b>81</b>
<b>3.4.3.5</b>	<b>Uticaj koncentracije napojnog rastvora izolata smeše sekundarnih glikozida na efikasnost kontinualne protivstrujne frakcione ekstrakcije tečnost-tečnost</b>	<b>82</b>
<b>3.5</b>	<b>KVALITATIVNE I KVANTITATIVNE KARAKTERISTIKE IZOLOVANOG DIGOKSINA</b>	<b>83</b>
<b>3.5.1</b>	<b>HPLC hromatogrami izolovanog i standardnog digoksina</b>	<b>85</b>
<b>3.5.2</b>	<b>FT-IR spektri izolovanog i standardnog digoksina</b>	<b>86</b>
<b>3.6</b>	<b>TEHNOLOŠKI POSTUPAK DOBIJANJA DIGOKSINA DIGOKSINA IZ LIŠĆA <i>Digitalis lanata</i> Ehrh.</b>	<b>87</b>
<b>4.</b>	<b>ZAKLJUČAK</b>	<b>89</b>
	<b>LITERATURA</b>	<b>91</b>
	<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b>	<b>97</b>
	<b>IZJAVE AUTORA</b>	<b>98</b>

## UVOD

Bioaktivne supstance iz biljnih sirovina, poznate kao prirodni izolati ili fitohemikalije, imaju sve veću primenu u proizvodnji lekova (tzv. fitopreparati), kozmetičkih i prehrambenih proizvoda i kao prekursori u sintezi novih proizvoda sa specifičnim bioaktivnim svojstvima. Fitopreparati se sve više koriste u medicini i veterini, za lečenje svih bolesti, posebno onih najtežih: bolesti srca, kancera, side, herpesa, leukemije i virusoidnih bolesti. Posebno značajno područje primene ovih biokativnih supstanci visoke čistoće je u oblasti istraživanja i standardizacije proizvoda u pomenutim granama industrije. Ove supstance su retke, skupe i sve traženije na svetskom tržištu.

Među bioaktivnim supstancama biljnog porekla značajno mesto pripada sekundarnim kardiotioničnim glikozidima digitoksinu (Dx), gitoksinu (Gx) i digoksinu (Dgx), koji su proizvodi enzimske hidrolize primarnih (genuinih) kardiotioničnih glikozida lanatozida A, B i C (LA, LB i LC, respektivno), koji nastaju u toku fermentacije lišća vunastog digitalisa (*Digitalis lanata* Ehrh.) pod dejstvom enzima prisutnih u lišću ( $\beta$ -glukozidaza, digilanidaza i acetilesteraza) (Abraham, 2003; Baumgarten, 1963; Duke, 1987; Fonin i Khorlin, 2003; Hegnauer, 1996; List i Hörnhammer, 1973; Stoll i Kreis, 1934; 1935; Stoll i sar., 1951; Weiss, 1985). Dgx je najvažniji i najefikasniji sekundarni glikozid vunastog digitalisa i zajedno sa LC, nezamenljiv u lečenju akutnog i hroničnog kongestivnog zastoja u radu srca, posebno tzv. "staračkog srca" i supraventrikularnih aritmija (Cayley, 2004; Hegnauer, 1996; Heinrich i sar., 2004; Juillièrè i Selton-Suty, 2010; List i Hörnhammer, 1973; Weiss, 2003). Digoksin ima, takođe, diuretičko, antikancerogeno (Felth i sar., 2009; Mijatovic i sar., 2007) i antivirusno (herpes) (Nie i sar., 2001) dejstvo. Polazna je sirovina za polusintetsko dobijanje efikasnijeg kardiotionika  $\beta$ -metildigoksina (Wichtl, 2006), koji se poslednjih godina sve više koristi.

Zbog složene strukture, kardiotionični glikozidi digitalisa do danas nisu sintetizovani, niti su sintetizovana analogna jedinjenja sa istim ili približno istim terapijskim svojstvima. I posle preko 200 godina intenzivnih farmakoloških, medicinskih i hemijskih ispitivanja kardiotioničnih glikozida, Dgx, još uvek se dobija iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. Saglasno zahtevu oficijelnih farmakopeja: Ph Jug. IV, Europien Pharmacopoeieia i US Pharmacopeia da se u terapijske svrhe mogu koristiti samo lekovi sa sadržajem Dgx visoke čistoće (preko 96-100 %),

istraživanja na razvoju postupaka izolacije Dgx visoke čistoće iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. su i danas vrlo aktuelna.

Opšti postupak dobijanja sekundarnih glikozida iz lišća *Digitalis lanata* Ehrh. sastoji se iz sledećih glavnih faza (Foerest, 1957):

- a) Fermentacije usitnjenog suvog lišća, odnosno hidrolize lanatozida do odgovarajućih sekundarnih glikozida pod dejstvom enzima prisutnih u lišću (Fonin i Khorlin, 2003; Fuchs, 1960; Pekić, 1972; Pitra i Herak, 1972; Stanković, 1979; Žurkowska i Adamiec, 1975);
- b) Ekstrakcije sekundarnih glikozida pogodnim rastvaračem (voda, vodeno-alkoholni rastvori, alkoholi, etilacetat i drugi) (Pekić, 1972; Pekić i Stanković, 1973);
- c) Prečišćavanja dobijenih tečnih ekstrakata;
- d) Ekstrakcije sekundarnih glikozida iz tečnih ekstrakata fermentisanog lišća organskim rastvaračima, najčešće dietiletom, hloroformom, trihloretilenom i smešom hloroform-metanol (Pekić, 1972) i
- e) Izolacije kristalizata smeše sekundarnih glikozida ili pojedinih čistih sekundarnih glikozida.

Unapređenje ovog opšteg postupka dobijanja sekundarnih glikozida zahteva određene modifikacije svake od njegovih faza, koje se prvenstveno odnose na definisnje optimalnih uslova fermentacije biljnog materijala, ekstrakcije rastvaračem, prečišćavanja dobijenih ekstrakata i izolacije pojedinih sekundarnih glikozida visoke čistoće, posebno Dgx.

Prva faza opšteg postupka dobijanja sekundarnih glikozida, odnosno Dgx, iz lišća *Digitalis lanata* Ehrh. je enzimaska hidroliza LA, LB i LC do sekundarnih glikozida Dgx, Gx i Dgx u toku fermentacije svežeg ili suvog usitnjenog biljnog materijala nakvašenog vodom, sa enzimima prisutnim u biljnom materijalu (List i Hörnhammer, 1973; Pitra i Herak, 1972; Žurkowska i Adamiec, 1975) na 35-37 °C. Zavisno od porekla biljne sirovine, enzimaska aktivnost varira u širokim granicama, tako da se u nekim slučajevima izvrši potpuna enzimaska hidroliza lanatozida do sekundarnih glikozida za 1 h, a u nekim znatne količine lanatozida ostaju nehidrolizovane posle 72 h (Fuchs i Jachs, 1960). Zbog razlika u aktivnosti enzima u biljnim sirovinama različitog porekla, koje su genetske ili tehničke prirode (vreme berbe, način sušenja, stepen usitnjenosti, lagerovanje), neophodno je za svaki biljni materijal odrediti optimalne uslove enzimske hidrolize lanatozida u toku fermentacije biljnog materijala. Definisnje optimalnih uslova enzimske



hidrolize LC do Dgx u toku fermentacije suvog lišća *Digitalis lanata* Ehrh podrazumevaju definisanje optimalnog stepena usitnjenosti biljne sirovine (srednji prečnik samlevene biljne sirovine), optimalnog odnosa kvašenja biljne sirovine vodom, temperature fermentacije i vremena trajanja fermentacije. Uslovi enzimske hidrolize LC do Dgx u toku fermentacije lišća *Digitalis lanata* Ehrh. na 37 °C kreću se u različitim granicama (Đorđević i Stanković, 1977; Fonin and Khorlin, 2003; Pekić, 1972; Pekić i Stanković, 1973; Stanković i sar., 1989): kvašenje biljne sirovine vodom u odnosu od 0,5:1 do 1:2 m/v i vreme fermentacije od 48-72 h. Međutim, o uticaju usitnjenosti biljnog materijala na stepen enzimske hidrolize lanatozida do sekundarnih glikozida Dgx, Gx i Dx nema podataka u literaturi.

Veoma važne su faze u postupku dobijanja sekundarnih glikozida je njihova izolacija iz biljne sirovine ekstrakcijom čvrsto-tečno (Foerest, 1957; List i Hörnhammer, 1957; Ponomarev, 1976), prečišćavanje tečnih ekstrakata i re-ekstrakata, izdvajanje izolata ili kristalizata iz tečnih ekstrakata i re-ekstrakata, razdvajanje pojedinih supstanci ekstrakcijom tečnost-tečnost) i kristalizacija čistih supstanci.

Za ekstrakciju sekundarnih glikozida iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. najčešće su korišćene različite konvencionalne tehnike maceracije (Fonin i Khorlin, 2003; Pekić, 1972; Pekić i Stanković, 1973; Stanković, 1979; Stanković i sar., 1989). Definisani su skoro svi optimalni uslovi za različite postupke ekstrakcije sekundarnih glikozida maceracijom. U ovim postupcima korišćeni su različiti rastvarači, kao što su: voda, alkoholi (metanol, etanol i izopropanol) ili vodeno-alkoholni rastvori različitih koncentracija (najčešće vodeno-metanolni i vodeno-etanolni) (Stanković i sar, 1981), etilacetat zasićen vodom (Pekić, 1972; Pekić i Stanković, 1973) ili neutralisan ispiranjem 5 %-tnim rastvorom natrijum-karbonata (Fonin i Khorlin, 2003) i smeše alkohola i organskih rastvarača sa petroletrom (Đorđević i Stanković, 1977). Sa vodom i vodeno-alkoholnim rastvorima dobijaju se tečni ekstrakti sekundarnih glikozida sa najmanjim sadržajem pratećih materija (nečistoća) i sa najvećim stepenom ekstrakcije Dgx, odnosno sa najvećom selektivnošću ekstrakcije Dgx. Dobijeni ekstrakti se mogu prečistiti različitim postupcima i iz njih izdvojiti čvrsti izolati sa visokim sadržajem Dgx.

Perkolacija je ekonomski prihvatljiviji postupak ekstrakcije od maceracije, koji nije dovoljno istražen u slučaju ekstrakcije sekundarnih glikozida iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh.

U dostupnoj literaturi nema podataka o uticaju veličine čestica usitnjenog suvog lišća vunastog digitalisa, visine punjenja perkolatora, primenjenog rastvarača i zapreminske brzine isticanja perkolata na kinetiku i stepen ekstrakcije sekundarnih glikozida, na bazi kojih bi se definisali optimalni uslovi perkolacije potrebni za projektovanje poluindustrijskih i industrijskih postupaka. Takođe, nema podataka na bazi kojih bi se definisao optimalni postupak prečišćavanja perkolata i dobijanja suvih izolata smeše sekundarnih glikozida sa relativno visokim sadržajem Dgx, iz kojih se može dobiti Dgx visoke čistoće.

Kardiotonični primarni i sekundarni glikozidi u izolatima iz lišća *Digitalis lanata* Ehrh. su u smeši supstanci sličnih struktura koje vrlo često kristališu izomorfno, zbog čega se teško mogu izdvojiti u čistom stanju. Poslednjih godina se za izdvajanje bioaktivnih komponenti iz izomornih fitoizolata sve više koristi ekstrakcija tečnost-tečnost. Jedan od veoma efikasnih postupaka za izolaciju prirodnih bioaktivnih supstanci iz suvih fitoizolata ili izomornih kristalizata njihovih smeša je kontinualna frakciona ekstrakcija tečnost-tečnost na Karr-ovoj vibracionoj koloni (Cusack i Karr, 1991; Donald i Parker, 2009; Haynes i Stuart, 1963; Heyberger, 2010; Karr 1997, Lo i sar., 1992; Pekić i Tolić, 1980; Xien i sar., 2003). Primena ove metode je posebno značajna kad nije moguća ili je veoma složena i sa komercijalnog aspekta neisplativa sinteza bioaktivne supstance, kao što je slučaj sa kardiotoničnim glikozidima *Digitalis lanata* Ehrh. Prednosti ove metode u poluindustrijskim ili industrijskim uslovima su jednostavna i ekonomski isplativija oprema u odnosu na druge metode.

U literaturi nema podataka o kontinualnoj frakcionoj ekstrakciji Dgx iz izolata ili kristalizata smeše sekundarnih glikozida Dgx, Dx i Gx, koja je izolovana iz lišća *Digitalis lanata* Ehrh. Međutim, ima podataka o korišćenju kontinualne suprotnostrujne ekstrakcije tečnost-tečnost na Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni za izolaciju drugih bioaktivnih supstanci iz biljnih izolata, kao što su LC (Pekić i Tolić, 1980), glicirizinska kiselina i likviritin (Shen i sar., 2007), kapsaicinoidi (Picazo i sar., 2008), izomorfni steroidi (Nie i sar., 2001), kafein (Xu i sar., 2003), fitosteroli (Heberger i sar., 2010), u vodi rastvorne frakcije sirovih ulja (Zhou i sar., 1994) i solanesol (Tang i sar., 2007).

Do sada je samo Pekić (1972) proučavao izolaciju Dgx iz rastvora suvih izolata smeše sekundarnih glikozida fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. diskontinualnom ekstrakcijom

tečnost-tečnost. Kontinualna frakciona ekstrakcija tečnost-tečnost na Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni nije do sada primenjena za izolaciju Dgx iz izolata ili kristalizata sekundarnih glikozida. Zbog toga su potrebna detaljna ispitivanja procesa diskontinualne i kontinualne frakcione ekstrakcije Dgx iz rastvora izolota smeše sekundarnih glikozida *Digitalis lanata* Ehrh., primenom ekstrakcije tečnost-tečnost na Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni u cilju sagledavanja uticaja operativnih uslova na efikasnost i definisanja optimalnih uslova izdvajanja Dgx visoke čistoće.

Predmet ispitivanja ove doktorske disertacije je fermentacija suvog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. u kojoj se enzimskom transformacijom LA, LB i LC dobijaju sekundarni glikozidi Dx, Gx i Dgx, ekstrakcija sekundarnih glikozida perkolacijom sa razblaženim vodenom-alkoholnim rastvorima (10-50 % vol.), prečišćavanje dobijenih perkolata, dobijanje suvih hloroformskih i trihloretilenskih ekstrakata (izolata) smeše sekundarnih glikozida iz perkolata i izolacija Dgx visoke čistoće (preko 96 %) iz rastvora izolata frakcionim rastvaranjem, diskontinualnom ekstrakcijom tečnost-tečnost i kontinualnom protivstrujnom frakcionom ekstrakcijom tečnost-tečnost na Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni.

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je razvoj procesa dobijanja sekundarnog kardiotoničnog glikozida Dgx iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. različitim tehnikama ekstrakcije. U okviru glavnog cilja, ova disertacija ima još i sledeće posebne ciljeve:

- definisanje uticaja veličine čestica samlevenog lišća, odnosa kvašenja voda: biljna sirovina i temperature na kinetiku i stepen enzimske hidrolize lanatozida do sekundarnih glikozida u toku fermentacije lišća *Digitalis lanata* Ehrh.;
- definisanje uticaja visine punjenja perkolatora, koncentracije rastvarača za ekstrakciju (vodenometanolni i vodenometanolni rastvori), odnosa voda: biljna sirovina i zapreminske brzine isticanja perkolata, odnosno vremena zadržavanja perkolata u perkolatoru na efikasnost i selektivnost ekstrakcije ukupnih glikozida (UG), Dx, Gx i Dgx;
- definisanje uticaja operativnih uslova ekstrakcije sekundarnih glikozida iz perkolata ekstrakcijom tečnost-tečnost (rastvarači: hloroform ili trihloretilen; odnos zapremine perkolata i rastvarača; zapremina tečnog hloroformskog ili trihloretilenskog koncentrata; odnos zapremine koncentrata i MgO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ili Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> za prečišćavanje koncentrata; uparavanje prečišćenog

koncentrata do suvog izolata) na prinos i sastav suvih izolata sekundarnih glikozida (Dx, Gx, Dgx i UG);

- definisanje uticaja operativnih uslova frakcionog rastvaranja suvih izolata (rastvarači: smeše aceton-voda; odnos suvih izolata i zapremina rastvarača; broj ispiranja izolata rastvaračem) na ekstrakciju Dgx iz hloroformskih ili trihloretilenskih izolata sekundarnih glikozida;

- definisanje optimalnih uslova diskontinualne ekstrakcije tečnost-tečnost u levcima za odvajanje za izdvajanje Dgx iz rastvora hloroformskih ili trihloretilenskih suvih izolata smeše sekundarnih glikozida u ternernim dvofaznim sistemima etanol (EtOH)-voda-hloroform-etilacetat (EtOAc), EtOH-H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>-EtOAc i EtOH-H<sub>2</sub>O-trihloretilen (THE)-EtOAc (izbor optimalnog sastava sistema; rastvaranje izolata sekundarnih glikozida u lakoj ili teškoj fazi; koncentracija suvog hloroformskog ili trihloretilenskog izolata sekundarnih glikozida; broj levkova Dgx u lakoj fazi) prethodno uravnotežavanje faza; optimalni odnos zapremina faza);

- definisanje uticaja operativnih uslova na stepen ekstrakcije Dgx iz trihloretilenskih suvih izolata smeše sekundarnih glikozida, protivstrujnom kontinualnom frakcionom ekstrakcijom tečnost-tečnost na Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni (rastojanje između perforiranih pločica, veličine otvora pločica, hod i frekvencija vibracione mešalice; visina kolone; optimalni sastav sistema; uticaj uvođenja rastvora izolata: odozgo, sa dna ili u sredini kolone);

- određivanje stepena koncentrovanja tečne faze sa sadržajem Dgx do zapremine koncentrata iz koga se dobija najveći prinos kristala digoksina farmaceutskog kvaliteta;

- definisanje postupka odvajanja i sušenja kristala Dgx;

- definisanje uslova regeneracije i ponovnog korišćenja tečnih faza iz procesa ekstrakcije tečnost-tečnost;

- definisanje metoda kvalitativnog i kvantitativnog određivanja sadržaja ukupnih i pojedinačnih sekundarnih glikozida u fermentisanoj biljnoj sirovini, perkolatima, izolatima i kristalnom Dgx.

# 1 TEORIJSKI DEO

## 1.1 VUNASTI DIGITALIS (*Digitalis lanata* Ehrh.)

Preko 26 vrsta roda *Digitalis* iz porodice biljaka *Plantaginaceae* – *Scrophulariceae* – *Rhinantoideae* – *Digitaleae* je poreklom iz Evrope, Azije i Severne Afrike (Foerest, 1957; List i Hörnhammer, 1973). Lišće dve vrste ovog roda, *Digitalis purpurea* (purpurni digitalis) i *Digitalis lanata* Ehrh. (vunasti digitalis), najvažniji su izvori dobijanja primarnih (lanatozida) i sekundarnih kardiotoničnih glikozida (Stoll i Renz, 1956), od kojih je najvažniji Dgx.

Vrsta *Digitalis lanata* Ehrh. je poreklom iz jugoistočne Evrope, sa Balkana (List i Hörnhammer, 1973; Kišgeci i sar., 1987, 2009). Gaji se i u srednjoj i zapadnoj Evropi, u Indiji, srednjoj Americi i Africi (List i Hörnhammer, 1973). Najveći proizvođači su Rusija, Poljska, Mađarska, Rumunija, Bugarska, Češka, Slovačka, Bugarska, Austrija, Nemačka i Holandija (Kišgeci i sar., 1987, 2009)

### 1.1.1 Opšte botaničke karakteristike

*Digitalis lanata* Ehrh. je dvogodišnja zeljasta biljka, koja uspeva na zemljištu bogatom humusom u hladovini, na suvim ili vlažnim staništima. Ima razgranat koren dužine oko 20 cm. Lišće, čije je naličje prekriveno belim dlakama, formira se u prvoj godini u obliku rozete od krupnog lišća na kratkim drškama. Sa donje površine listovi su prekriveni belim dlačicama. U drugoj godini se razvija uspravna dlakava cvetna stabljika visine 40-150 cm, sa sitnim sedećim kopljastim listovima na donjem delu, na vrhu zašiljeni dužine 10-20 cm, širine oko 2 cm. Cvetovi su cevasti, zvonasti u obliku grozdaste cvasti sa dlakavim čašicama i krem bele boje. Krunice su prošarane sa smeđe-crvenim ili ljubičasto-brončanim žilicama. Ima plod u obliku čaure u kojoj se nalazi sitno seme crvenkasto-smeđe boje (List i Hörnhammer, 1973; Kišgeci i sar., 1987, 2009).



**A**



**B**

**Slika 1** *Digitalis lanata* Ehrh.: A – jednogodišnja i B – dvogodišnja biljka

[http://en.wikipedia.org/wiki/Digitalis\\_lanata](http://en.wikipedia.org/wiki/Digitalis_lanata)

### 1.1.2 Berba i sušenje

Berba lišća se vrši uglavnom ručno 2-3 puta u toku godine u toku vegetacije (jul–septembar) po lepom vremenu (Kišgeci i sar., 2009) u periodu maksimalnog sadržaja LC (Stanković, 1979).

Posle berbe, lišće se ostavi nekoliko dana na lesama u tankom sloju, u hladu ili na senovitim mestima na promaji, da bi se završila postmortalna sinteza lanatozida i povećao njihov sadržaj (Stanković, 1979). Sušenje lišća se dalje nastavlja najčešće u sušarama na 50-60 °C (Kišgeci i sar., 2009; Stanković, 1979). Neka istraživanja su pokazala da se lišće može sušiti u struji zagrejanog vazduha u rotopneumatskoj sušnici kratkotrajnim sušenjem na povišenim temperaturama 100-400 °C (Pekić i sar., 1976; Stanković, 1979, 1983) uz nezantno smanjenje sadržaja lanatozida. Sušenje pod sniženim pritiskom (20 mm Hg) je bez gubitaka lanatozida i sa povećanjem aktivnosti enzima prisutnih u lišću, da se vreme hidrolize lanatozida pri fermentaciji osušenog lišća skraćuje (Stanković, 1979).

### 1.1.3 Organoleptičke karakteristike suvog lišća

Suvi listovi su svetlo do tamnozeleno boje, slabog ali karakterističnog mirisa, gorkog ukusa. Ceo list je oko 10-30 cm dugačak i 4 cm širok. Površina lista je kopljasta (Ph.Eur. 7th Edition, 2012) sa gornje strane glatka a sa donje dlakava.

### 1.1.4 Hemijski sastav

Svi delovi *Digitalis lanata* Ehrh. sadrže kardiotionične glikozide sa steroidnim jezgrom - geninom kardenolidnog tipa, od kojih su najzastupljeniji primarni kardiotionični glikozidi - LA, LB, LC, lanatozid D (LD) i lanatozid E (LE). Kasnije su otkriveni i drugi glikozidi (glukodigifukozid, glukoverodoksin, digitalinum verum, odorobiozid G) (Fieser i Fieser, 1959). U lišću ima najviše LA, LB i LC (0,4–1 %) od kojih je najvažniji LC. U lišću kultivisane vrste *Digitalis lanata* Ehrh., sadržaj LC je od 1,7-5,3 % (Nyaradi-Szabady, 1982). U lišću divlje rastuće vrste *Digitalis lanata* Ehrh. nađen je niži sadržaj LA, LB i LC od 0,27, 0,11 i 0,175 %, respektivno (Klosi i Zotaj, 1979). U neznatnim količinama nalaze se sekundarni glikozidi Dx, Gx i Dgx, kao prekursori u biosintezi lanatozida, koji su produkti transformacije lanatozida u toku fermentacije lišća *in vitro*, pod dejstvom enzima tipa  $\beta$ -glukozidaza i acetilesteraza. Tako se iz LC dobija najvažniji sekundarni kardiotionični glikozidi Dgx, Dx i Gx (Fonin i Khorlin, 2003; Fuchs, 1960; List i Hörnhammer, 1973; Pekić, 1972; Pitra i Herak, 1972; Stanković, 1979; Źurkowska i Adamiec, 1975).

Pored glikozida, lišće sadrži enzime, flavonoide, steroidne saponozide, derivate pregnana i mineralne soli. U lišću su otkriveni flavonoidni aglikoni pektolarigenin, dinatin, hrizeriol, diosmetin i luteolin (Hiermann i Springer, 1979).

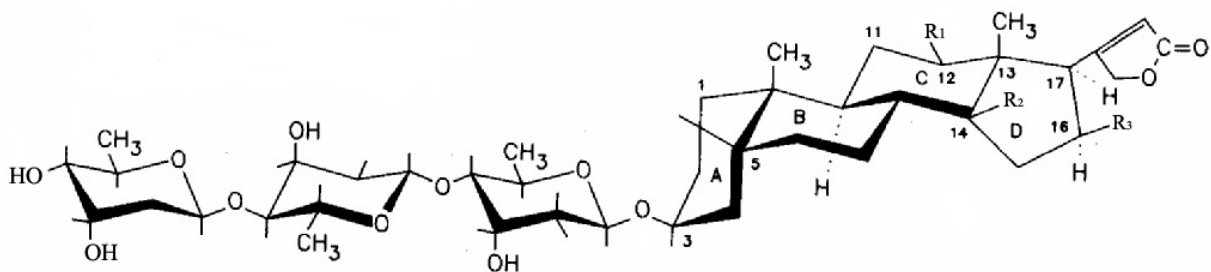
### 1.1.5 Hemija i stereochemija kardiotioničnih glikozida

Kardiotionični glikozidi *Digitalis lanata* Ehrh. spadaju u grupu steroidnih glikozida (Fieser i Fieser, 1959) i sastoje se od aglikona (genina) i oligosaharidnog lanca od tri digitoksoze (2,3-didezoksiheksosa) i glukoze kod LA, LB, LC, LD i LE, tri digitoksoze i glukoze kod Dx, Gx i Dgx ili dve digitoksoze i jedne acetyl-digitoksoze kod acetyl-derivata sekundarnih glikozida.

Ugljeni hidrati u oligosaharidnom lancu su D-reda i povezani su međusobno 1,4- $\beta$ -glikozidnom vezom. Oligosaharidni lanac je uvek povezan  $\beta$ -glikozidnom vezom sa C-3 aglikona.

Aglikoni pripadaju steroidima koji su derivati 10,13-dimetil-ciklopentano-perhidro-fenantrena, odnosno kardenolidi (butenolidi), jer imaju  $\alpha,\beta$ -nezasićeni butenolidni petočlani laktonski prsten na C-17 u  $\beta$ -položaju. Aglikoni svih glikozida imaju OH-grupu u  $\beta$ -položaju na C-3 i C-14. Glikozidi B- i C-reda imaju još po jednu OH-grupu u  $\beta$ -položaju vezanu za C-3 i C-14, respektivno. Svi glikozidi imaju metil-grupe u  $\beta$ -položaju na C-10 i C-13 aglikona. Prstenovi A i B i C i D su povezani *cis*, a B i C *trans*, odnosno svi aglikoni pripadaju 5 $\beta$ -kardenolidima (H atom na C-5 je uvek u  $\beta$ -položaju). Kod aglikona glikozida E-reda formil-grupa ( $\beta$ -OCHO) je vezana na C-16.

Na slici 1.1 prikazane su stereochemijske strukture Dx, Gx i Dgx, koje se razlikuju samo po položaju i broju hidroksilnih grupa aglikona (genina) kardenolidnog tipa, dok za C-3 geninskog dela  $\beta$ -glikozidnom vezom sa digitoksozom oligosaharidnog lanca. Sve digitoksoze su međusobno povezane u oligosaharidni lanac, takođe,  $\beta$ -glikozidnom vezom.



Slika 1.1 Stereochemijske strukture sekundarnih glikozida Dx, Gx i Dgx (Dx:  $R_1 = R_3 = H$ , Gx:  $R_1 = H$ ,  $R_3 = -OH$  i Dgx:  $R_1 = OH$ ,  $R_3 = H$ )

### 1.1.6 Farmakološke karakteristike

Kardenolidni glikozidi, koji se izdvajaju iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. imaju kardiotonično dejstvo. Kao najaktivniji, LC i Dgx se danas koriste kao osnovne komponente za proizvodnju lekova za srce, koji jačaju srčani mišić, usporavaju i regulišu srčani ritam, naročito



kod starijih osoba („staračko srce“). Dg<sub>x</sub> i njegov polusintetski derivat β–metildigoksin su najefikasniji kardiotionični glikozidi *Digitalis lanata* Ehrh. i imaju najveću primenu. Njihovo kardiotionično dejstvo (Abraham, 2003; Fieser i Fieser, 1959; Hegnauer, 1996; List i Hörnhammer, 1973) vezano je u prvom redu za *cis* povezivanje prstenova A i B i C i D, kao i *trans* povezivanje prstenova B i C, odnosno za β-položaj H-atoma na C-2. Dokazano je da se kardiotionična aktivnost gubi kada se H-atom na C-5 aglikona nađe u α-položaju. Pored toga, da da bi glikozidi bili kardioaktivni butenolidni laktonski prsten mora da se nalazi u β-položaju. Za kardiotioničnu aktivnost glikozida važna je β-glikozidna veza oligosaharidnog lanca sa C-3 aglikona i β-položaj OH-grupe na C-14 aglikona, ali nisu od odlučujućeg značaja. Za terapiju bolesti srca je značajno da glikozidi imaju dobru resorpciju u organizmu. Dobru do vrlo dobru resorpciju (resorpcija 50-100 %) imaju: Dg<sub>x</sub>, Dx, LA, β-metildigoksin, acetildigitoksin i 16-acetilgitoksin. LC se zadovoljavajuće resorbuje (25–50 %), dok se Gx i LB nezadovoljavajuće resorbuju. Resorpciona sposobnost glikozida nije vezana samo za broj i položaj OH-grupa, već i za vrstu ugljenohidratnog lanca (Abraham, 2003; Fieser i Fieser, 1959; Hegnauer, 1996; List i Hörnhammer, 1973). Uvođenjem acetyl-grupe u ostatke dezoksi–uglljenohidratnih jedinki ili glukoze u oligosaharidnom lancu značajno se povećava resorpcija (Niodner, 1973). Aglikoni glikozida *Digitalis lanata* Ehrh. nemaju kardiotionično dejstvo zbog njihove brze razgradnje u organizmu (Fieser i Fieser, 1959).

Poslednjih godina Dx i Dg<sub>x</sub> se samostalno ili u kombinaciji sa drugim biokativnim supstancama koriste kao diuretici i za lečenje tumora (Cayley, 2004; Heinrichi sar., 2004; Juillièrè i Selton-Suty, 2010; Nadav, 2012; Newman, 2008; Patel, 2011; Weiss, 2003).

### **1.1.7 Primena**

Lišće *Digitalis lanata* Ehrh.se u narodnoj medicini ne koristi zbog visokog stepena toksičnosti njenih sastojaka, posebno glikozida (Fieser i Fieser, 1959). Veoma retko se koristi u izradi farmaceutskih preparata. Kao industrijska sirovina, koristi se za dobijanje kardiotioničnih primarnih i sekundarnih glikozida, u prvom redu LC i Dg<sub>x</sub>.

## 1.2 ENZIMSKE TRANSFORMACIJE PRIMARNIH GLIKOZIDA FERMENTACIJOM LIŠĆA *Digitalis lanata* Ehrh.

Hidrolizom primarnih kardiotiničnih glikozida *Digitalis lanata* Ehrh. u toku fermentacije svežeg ili najčešće suvog usitnjenog lišća nakvašenog vodom na 37 °C, pod biokatalitičkim dejstvom enzima prisutnih u lišću ( $\beta$ -glukozidaza, digilanidaza i acetilesteraza) dobijaju se sekundarni glikozidi Dx, Gx i Dgx (Abraham, 2003; Baumgarten, 1963; Duke, 1987; Fonin i Khorlin, 2003; Hegnauer, 1996; List i Hörnhammer, 1973; Weiss, 1985, 2003). Takođe, sekundarni glikozidi se mogu dobiti hidrolizom izolovanih čistih lanatozida pod dejstvom enzimskih preparata dobijenih iz lišća *Digitalis lanata* Ehrh. (Baumgarten, 1963; List i Hörnhammer, 1973; Pitra i Herak, 1972; Stanković i Đorđević, 1987; Stanković i sar., 1983; Stoll i sar., 1935; Žurkowska i Adamiec, 1975), semena lucerke (Stoll i Kriess, 1934; Wichtl, 1978), zelenog zrna kafe (Stoll i Renz, 1956), želudačnog soka vinogradarskog puža, jetre i pankreasa preživara ili gljivica roda *Aspergillus* ili *Penicilium* (Stoll i Renz, 1951).

Uslovi enzimske hidrolize LC do Dgx u toku fermentacije lišća *Digitalis lanata* Ehrh. na 37 °C (Đorđević i Stanković, 1977; Fonin i Khorlin, 2003; Pekić, 1972; Pekić i Stanković, 1973; Stanković i sar., 1989) se kreću u različitim granicama zavisno od porekla lišća materijala: kvašenje biljnog materijala vodom u odnosu od 0,5:1-1:2 m/v i vreme fermentacije od 24-72 h. Međutim, nema podataka o optimalnom stepenu usitnjenosti na stepen enzimske hidrolize lanatozida do Dgx, Gx i Dx.

Zbog razlika u aktivnosti enzima u lišću *Digitalis lanata* Ehrh. različitog porekla, koje su genetske ili tehničke prirode (vreme berbe, način sušenja, stepen usitnjenosti, lagerovanje itd.), neophodno je za svaki biljni materijal odrediti optimalne uslove enzimske hidrolize lanatozida u toku fermentacije biljnog materijala.

## **1.3 EKSTRAKCIJA ČVRSTO-TEČNO BIOAKTIVNIH MATERIJA IZ BILJNIH SIROVINA**

### **1.3.1 Osnovne zakonitosti ekstrakcije bioaktivnih materija iz biljnih materijala**

Prva faza u najvećem broju tehnoloških procesa izolacije bioaktivnih proizvoda iz divljerastućih i kultivisanih lekovitih biljnih sirovina, koji imaju široku primenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj drugima granama hemijske industrije (fitohemikalije), jeste njihova ekstrakcija iz biljnog materijala pogodnim rastvaračem (Heinrich i sar., 2004).

Teorija i praksa ekstrakcije čvrsto-tečno se poslednjih godina intenzivno razvijaju, zahvaljujući poboljšanoj tehničkoj opremljenosti i značajnim uspesima u oblasti ispitivanja procesa prenosa mase. U farmaceutskoj industriji koriste se, uglavnom, osušeni ili tehnički obrađeni biljni materijali. Ova obrada može znatno da menja svojstva biljnog materijala, pre svega mehaničke osobine: povišena mehanička čvrstoća, krtost i dr. Menjaju se, takođe, hemijski sastav i fizičko-hemijska svojstva biljnog materijala. Dolazi do hidrolitičkih i fermentativnih procesa razgradnje prirodnih jedinjenja koja se nalaze u ćelijama. Dinamika procesa ekstrakcije biljnih materija zavisi od njihovih tehnoloških osobina (sadržaj vlage, sadržaj aktivnih i ekstraktivnih materija, stepen samlevenosti, kvalitet biljnog materijala, brzina i stepen bubrenja biljnog materijala, apsorbovana količina rastvarača za ekstrakciju u biljnom materijalu, gustina, zapreminska i nasipna masa biljnog materijala, koeficijenti ispiranja, koeficijenti unutrašnje i slobodne difuzije unutar biljnog materijala, mehanička svojstva-koeficijenti spoljašnjeg i unutrašnjeg trenja i dr.), tehnološkog postupka izvođenja procesa i primenjenog uređaja za ekstrakciju.

Ekstrakcija iz biljnog materijala (luženje) je u osnovi proces prenosa mase u sistemu čvrsto telo-tečnost (Frank i sar., 1999; Ponomarev, 1976 sa određenim specifičnostima vezanim za celularnu prirodu biljnog materijala (Coulson i sar., 1991; Heinrich i sar., 2004; Prieve, 2000; Stanković i sar., 1994; Treybal, 1985). Ostvaruje se u kontaktu između tečne faze-rastvarača za ekstrakciju (ekstragens) i čvrste faze – poroznog biljnog materijala u kojem se na zidovima ćelija (u slučaju osušenog biljnog materijala) ili u rastvoru unutar pora (u slučaju svežeg ili nabubrelog biljnog

materijala) nalaze rastvorene materije. Procesi ekstrakcije svežeg, nabubrelog (u vodi) i suvog biljnog materijala se principijelno razlikuju (Ponomarjev, 1976).

Proces ekstrakcije svežeg ili nabubrelog biljnog materijala (posle kvašenja rastvaračem za ekstrakciju) se sastoji iz tri faze:

- spiranje rastvoraka ili ćelijskog soka iz razorenih ćelija ili otvorenih pora;
- prodiranje rastvarača u ćelijske tečnosti i tečnosti sudova kroz porozne zidove ili membrana ćelije i porozne zidove biljnih sudova molekulskom difuzijom;
- prenos ekstraktivnih materija iz ćelijskih tečnosti i tečnosti biljnih sudova kroz porozne zidove ćelija ili biljnih sudova putem molekulske difuzije do spoljašnje površine biljnog materijala;
- prenos materija sa površine biljnog materijala u rastvarač za ekstrakciju, odnosno u ekstrakt.

U slučaju osušenog nesamlevenog biljnog materijala proces ekstrakcije je složeniji i sastoji se iz više faza:

- kvašenje, spiranje i rastvaranje sasušeni ekstraktivnih materija sa površina razorenih ćelija i otvorenih pora i prenos rastvorenih materija u rastvarač spiranjem i molekulskom difuzijom;
- kvašenje i prodiranje rastvarača u nerazorene ćelije i sudove biljnog materijala kroz membrane ćelija i porozne zidove biljnog materijala uz istovremeno rastvaranje ekstraktivnih materija;
- prenos rastvorenih materija molekulskom difuzijom iz nerazorenih ćelija i sudova do površine biljnog materijala i sa površine biljnog materijala u rastvor,.

U slučaju samlevenog svežeg biljnog materijala, ekstrakcija bioaktivnih sastojaka uključuje različite faze, zavisno od stepena samlevenosti:

a) potpuno samleven svež biljni materijal (100 % razorene ćelije)

- mešanje biljnih sokova izdvojenih u toku mlevenja sa rastvaračem za ekstrakciju uz istovremeno spiranje biljnog soka i ekstraktivnih materija sa površine dezintegriranog biljnog materijala;
- prenos ekstraktivnih materija u rastvarač iz biljnog soka (ćelijski sok i tečnosti iz sudova biljnog materijala) i sa površine razorenih ćelija i sudova;

- ako se rastvarač za ekstrakciju delimično ili potpuno ne meša sa biljnim sokom, u toku mešanja sa sokom istovremeno se odvija prenos ekstraktivnih materija u rastvarač kroz graničnu površinu između tečnih faza i između granične površine rastvarača i biljnog materijala;
- b) potpuno samleven osušen biljni materijal (100 % razorene ćelije)
- kvašenje, bubrenje, spiranje i rastvaranje sasušenih ekstraktivnih materija sa površina razorenih ćelija i otvorenih pora;
  - prenos rastvorenih materija u rastvarač spiranjem sasušenih delova i molekulskom difuzijom rastvorenih molekula materija sa površine biljnog materijala;
- c) nepotpuno dezintegrirani sveži biljni materijal:
- mešanje biljnih sokova izdvojenih u toku mlevenja sa rastvaračem za ekstrakciju uz istovremeno spiranje biljnog soka i ekstraktivnih materija sa površine dezintegriranog biljnog materijala i prenos materija iz unutarćelijskog soka nerazorenih ćelija i biljnih sudova kroz membrane i porozne zidove ćelija i sudova uz istovremeni prenos molekula rastvarača u suprotnom smeru;
  - prenos ekstraktivnih materija u rastvarač iz biljnog soka (ćelijski sok i tečnosti iz sudova biljnog materijala) i sa površine razorenih ćelija i sudova;
  - ako se rastvarač za ekstrakciju delimično ili potpuno ne meša sa biljnim sokom, u toku mešanja sa sokom, istovremeno se odvija prenos ekstraktivnih materija u rastvarač kroz graničnu površinu između tečnih faza i između granične površine rastvarača i biljnog materijala.

Ako se biljni materijal pre ekstrakcije kvasi rastvaračem za ekstrakciju radi bubrenja, proces bubrenja obuhvata prva tri stadijuma procesa ekstrakcije.

U slučajevima ekstrakcije bioaktivnih sastojaka iz biljnog materijala usitnjenog mlevenjem, seckanjem, rezanjem ili gnječenjem, faze ekstrakcije su više ili manje zastupljene, zavisno od stepena razorenosti ćelija. Ukoliko je manji stepen razorenosti ćelija, utoliko su pojedine faze ekstrakcije više zastupljene, i obrnuto. Faze rastvaranja i prenosa ekstraktivnih materija sa površine biljnog materijala u rastvor, utoliko su više zastupljene, ukoliko je stepen razorenosti ćelija

veći. U ovom slučaju process ekstrakcije ima dva perioda: brzi i spori (Stanković i sar., 1994). Brzi period (poznat kao period ispiranja) se odlikuje brzim spiranjem ekstraktivnih materija sa površine razorenih ćelija i njihovim rastvaranjem u rastvaraču, uz istovremenu sporu difuziju ekstraktivnih materija iz rastvora nerazorenih ćelija. Udeo ekstrahovanih materija procesom difuzije u brzom periodu ekstrakcije je relativno mali. Spori period procesa ekstrakcije se nadovezuje na brzi period i odvija se difuzijom ekstraktivnih materija iz nerazorenih ćelija biljnog materijala. Brza ekstrakcija teče znatno brže od spore i zavisi, u osnovi, od hidrodinamičkih uslova. Kvantitativna karakteristika ovog procesa ekstrakcije je koeficijent ispiranja i predstavlja deo ukupnih ekstraktivnih materija ekstrahovan u brzom periodu ekstrakcije (Stanković i sar., 1994). Spori period ekstrakcije kvantitativno se karakteriše koeficijentom spore ekstrakcije, koji zavisi od koeficijenta prenosa mase unutar biljnog materijala.

**Prodiranje rastvarača u biljni materijal.** Proces prodiranja rastvarača u biljnu sirovinu se odvija pod dejstvom kapilarnih sila. Na ovaj proces imaju uticaj hidrofilne i hidrofobne osobine tkiva iz koga su sagrađeni zidovi ćelija, pri čemu je hidrofilnost obično izražena u znatno većem stepenu od hidrofobnosti (Frank i sar., 1999; Ponomarev, 1976). Zbog toga, prodiranje rastvarača u biljnu sirovinu zavisi od hidrofilnosti rastvarača za ekstrakciju. U biljnom tkivu postoji ogroman broj pora kapilarnog tipa, zbog čega rastvarač prodire u tkivo preko kapilara, puneći ćelije i druge prazne prostore u biljnom materijalu. Vreme prodiranja može biti veoma dugo, pošto se prodiranju rastvarača suprotstavlja vazduh koji se nalazi u kapilarama ili ćelijama.

**Kvašenje materija unutar ćelija biljnog materijala.** Proces kvašenja materija unutar ćelija biljnog materijala teče istovremeno sa procesom prodiranja rastvarača i od brzine ovog procesa u većem stepenu zavisi brzina kvašenja. Pored toga, brzina kvašenja zavisi od prirode materija i rastvarača i njihove sličnosti.

**Prenos materija unutar ćelija biljnog materijala.** Brzina ovog procesa se pokorava drugom Fick-ovom zakonu, koji za jednodimenzionalni prenos mase ima sledeći oblik (Ponomarev, 1976; Treybal, 1985):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_{ef} \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (1.1)$$

gde je:  $c$  - koncentracija ekstrahovanih materija (računatih kao pseudo rastvorak) u biljnom materijalu,  $D_{ef}$  - efektivni koeficijent difuzije ekstraktivnih materija,  $x$  - rastojanje u pravcu prenosa mase i  $t$  - vreme.

**Prenos ekstraktivnih materija sa površine biljnog materijala u rastvor.** Poslednji stadijum u procesu ekstrakcije je prenos ekstraktivnih materija sa površine biljnog materijala u rastvor-ekstrakt. Brzina ovog procesa zavisi, saglasno teoriji filma, od koeficijenta molekulske difuzije, debljine difuzionog sloja, kontaktne površine između biljnih čestica i rastvarača i pogonske sile prenosa mase (Coulson i sar., 1991; Stanković i sar., 1994; Treybal, 1985):

$$\frac{dc}{dt} = k_L a \cdot (c_s - c) \quad (1.2)$$

gde je:  $k_L a$  - zapreminski koeficijent prenosa mase ekstraktivnih materija u tečnoj fazi (gde je:  $k_L = D_{ef} / \delta$  - koeficijent prenosa mase ekstraktivnih materija u tečnoj fazi,  $D_{ef}$  - efektivni koeficijent difuzije ekstraktivnih materija,  $\delta$  - debljina difuzionog sloja oko biljne čestice i  $a$  - specifična kontaktna površina između rastvarača i biljnih čestica),  $c_s$  - koncentracija zasićenog rastvora ekstraktivnih materija,  $c$  - aktuelna koncentracija rastvora ekstraktivnih materija i  $t$  - vreme.

Debljina difuzionog sloja zavisi od hidrodinamičkih uslova. Unutar biljnog materijala rastvarač se praktično ne kreće, zbog čega se uzima da je debljina difuzionog sloja jednaka veličini čestice biljnog materijala. Za materije koje se nalaze na površini čestica biljnog materijala uslovi se menjaju – poboljšani su hidrodinamički uslovi i smanjena je debljina difuzionog sloja. Brzina procesa rastvaranja materija unutar ćelija određena je brzinom prenosa mase kroz porozne zidove ćelija, a na površini čestica brzinom prenosa mase sa površine u rastvarač za ekstrakciju.

### 1.3.2 Uticaj operativnih uslova na proces ekstrakcije

Najvažniji faktori koji utiču na stepen ekstrakcije materija iz biljnog materijala i izbor opreme za ekstrakciju su: veličina čestica samlevenog biljnog materijala, hidrodinamički uslovi, priroda rastvarača, temperatura i gustina pakovanja biljnog materijala (Coulson i sar., 1991; Ponomarev, 1976).

**Veličina čestica.** Što je veličina čestica manja, veća je brzina prenosa mase ekstraktivnih materija i kraće rastojanje prelaza ekstraktivnih materija iz čvrste u tečnu fazu. Poželjno je da stepen usitnjenosti čestica bude što veći, da bi se povećala kontaktna površina između čestica i rastvarača. S druge strane, preradu fino samlevenog biljnog materijala treba izbegavati, pošto se teže odvajaju od tečne faze u slučaju suspendovanih čestica i mogu da zapuše međuprostor između čestica u sloju biljnog materijala i spreče tok rastvarača kroz sloj.

**Hidrodinamički uslovi ekstrakcije.** Hidrodinamički uslovi imaju veliki i odlučujući uticaj na stepen ekstrakcije materija iz biljnog materijala. Posebno veliki uticaj imaju na brzinu prenosa mase sa čestica u rastvor ekstraktivnih materija (smanjuju otpor prenosa mase kroz difuzioni laminarni podsloj) i na brzinu prenosa mase u glavni rastvora ekstraktivnih materija. Pri kretanju rastvarača ili čestica biljnog materijala, molekularni prenos mase u rastvoru ekstraktivnih materija zamenjuje se konvektivnim, što bitno smanjuje veličinu difuzionog podsloja. Proces mešanja može da se zanemari, ako je stepen samlevenosti biljnog materijala (odnosno stepen razorenosti ćelija biljnog tkiva) veliki, jer se ispiranje i rastvaranje ekstraktivnih materija odvija brzinom koja se ne menja bitno sa mešanjem.

Odnos biljnog materijala i zapremine rastvarača za ekstrakciju je, takođe, jedan od bitnih hidrodinamičkih faktora procesa ekstrakcije. Izbor optimalnog odnosa biljnog materijala i rastvarača, uz ostale optimalne uslove, ne utiče samo na stepen ekstrakcije ekstraktivnih materija, već i na ekonomičnost procesa. Zbog toga, ekstrakcija treba da se izvodi sa odnosom biljnog materijala i rastvarača, koji obezbeđuje visok stepen ekstrakcije ekstraktivnih materija uz što manji utrošak energije i uz primenu što jednostavnijih uređaja za ekstrakciju. Ponekad treba raditi sa znatno većim odnosom biljnog materijala i rastvarača, da bi se izbegla skupa i komplikovana ekstrakciona postrojenja. Iskustva su pokazala da je za svaki konkretan slučaj neophodno odrediti optimalne hidrodinamičke uslove ekstrakcije.

**Priroda rastvarača.** Rastvarač, primenjen za ekstrakciju određene grupe materija, ima odlučujući uticaj na stepen ekstrakcije ekstraktivnih materija. Pored toga, izbor rastvarača je odlučujući i za ekonomičnost procesa ekstrakcije. Prema stepenu hidrofилnosti, materije koje se ekstrahuju iz biljnog materijala mogu se podeliti na:

- hidrofилne, rastvorne u polarnim rastvaračima;



- hidrofilno-hidrofobne (mešovita grupa jedinjenja) i
- hidrofobne, rastvorne u nepolarnim rastvaračima.

U literaturi se predlažu različiti kriterijumi za izbor rastvarača (Ponomarjev, 1976). Kod izbora optimalnog rastvarača koriste se sledeće postavke:

- polarnost, odnosno hidrofilnost materije koja se ekstrahuje i rastvarača za ekstrakciju treba da je slična;
- što manja gustina i viskozitet, a što veći površinski napon rastvarača (zbog lakšeg prodiranja u kapilare i pore biljnog materijala);
- sličnost dielektrične konstante ekstraktivnih materija i rastvarača za ekstrakciju;
- jednokomponentan rastvarač ili sistem rastvarača sa što manjim brojem komponenti;
- selektivnost rastvarača u odnosu na aktivne materije koje treba da se bolje rastvaraju od pratećih materija;
- mogućnost nabavke u dovoljnim količinama, ako se ekstrakcija vrši u industrijskom obimu;
- cena i mogućnost nabavke na tržištu;
- što manja toksičnost i korozivnost;
- da ne zahteva posebne uslove rada i posebna postrojenja za ekstrakciju;
- bolja rastvorljivost aktivne materije na sobnoj temperaturi ili na što nižoj temperaturi (iz energetskih razloga);
- mogućnost lake regeneracije kako iz ekstrakta tako i iz biljnog materijala;
- nezapaljiv ili što manje zapaljiv i
- inertnost prema aktivnim i pratećim ekstraktivnim materijama.

**Temperatura.** Temperatura ima, takođe, veliki uticaj na stepen ekstrakcije aktivnih i ukupnih ekstraktivnih materija iz biljnog materijala. Uticaj temperature je različit i zavisi od prirode biljnog materijala, aktivnih i ukupnih ekstraktivnih materija i rastvarača za ekstrakciju, kao i stepena samlevenosti biljnog materijala.

Pri razmatranju uticaja temperature na proces ekstrakcije aktivnih i ukupnih ekstraktivnih materija iz biljnog materijala, mora se uzeti u obzir zavisnost njihove rastvorljivosti od temperature i stepena samlevenosti (Ponomarjev, 1976). U većini slučajeva se rastvorljivost ekstraktivnih materija povećava sa povećanjem temperature, što se manifestuje većom brzinom

ekstrakcije. Povišenje temperature pozitivno utiče i na koeficijent difuzije zbog smanjenja viskoziteta rastvora ekstraktivnih materija. Međutim, poznati su slučajevi kada brzina procesa ekstrakcije aktivnih materija opada zbog smanjenja njihove rastvorljivosti sa povišenjem temperature (Stanković, 1984). Takođe, postoje slučajevi da, zbog visokog stepena samlevenosti biljnog materijala, brzina ispiranja ekstraktivnih materija sa površine biljnih čestica upravlja procesom ekstrakcije, tako da povišenje temperature nema velikog uticaja na efikasnost ekstrakcije.

**Gustina pakovanja biljnog materijala.** Veoma je važna i gustina pakovanja biljnog materijala u ekstrakcionom uređaju. Ona može imati veliki uticaj na stepen i brzinu ekstrakcije ekstraktivnih materija. Pri gušćem pakovanju biljnog materijala, zbog bubrenja se smanjuje međuprostor između čestica u sloju biljnog materijala. Kod dinamičkih postupaka ekstrakcije, to zahteva veću brzinu kretanja rastvarača za prenos ekstrahovanih materija iz difuzionog sloja i povećanje efikasnosti ekstrakcije. Kod statičkih postupaka ekstrakcije, porast gustine pakovanja usporava proces ekstrakcije i smanjuje njenu efikasnost.

**Ostali faktori.** Od ostalih faktora treba pomenuti prisustvo vazduha na površini i unutar biljnog materijala, način ubacivanja rastvarača za ekstrakciju kod perkolacije (odozgo naniže ili odozdo naviše), suprotnostrujno ili istostrujno kretanje rastvarača za ekstrakciju i biljnog materijala kod kontinualnih postupaka ekstrakcije itd.

### **1.3.3 Prenos mase u toku ekstrakcije čvrsto-tečno**

Ekstrakcija ekstraktivnih materija iz biljnog materijala odigrava se u dva stupnja (Coulson i sar., 1991; Ponomarev, 1976; Stanković i sar., 1994): a) rastvaranje ekstraktivnih materija sa površine biljnih čestica (tzv. ispiranje ili brza ekstrakcija) i b) prenos mase ekstraktivnih materija kroz biljne čestice prema njihovoj spoljašnoj površini (difuzija ili tzv. spora ekstrakcija). Zbog složenosti prenosa mase, kinetika ekstrakcije ekstraktivnih materija iz biljnog materijala se najčešće opisuje uprošćenim modelima, kao što su model nestacionarne difuzije kroz biljni materijal (Ponomarev, 1976) i model zasnovan na teoriji filma (Coulson i sar., 1991; Stanković i sar., 1994).

### 1.3.3.1 Kinetički model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal

Prenos mase kroz biljni materijal u toku ekstrakcije odigrava se difuzijom. Brzina prenosa mase ekstraktivnih materija kroz biljne čestice, natopljene rastvaračem, može se opisati Fick-ovim zakonima (Ponomarev, 1976). Uslovi prenosa mase u toku ekstrakcije su, po pravilu, nestacionarni, tako da se brzina promene koncentracije ekstraktivnih materija, opisuje jednačinom drugog Fick-ovog zakona. Kada se radi o jednodimenzionalnom prenosu mase, važi jednačina (1.1). Zbog složenog analitičkog rešavanja, jednačina (1.1) se koristi za rešavanje problema nestacionarne difuzije u slučaju prostijih geometrijskih oblika biljnih čestica (ravna ploča, cilindar i sfera). Integrisanje jednačine (1.1) zahteva primenu odgovarajućih početnih i graničnih uslova, kao i uvođenje sledećih pretpostavki (Veljković i Milenović, 2002):

- biljne čestice su izotropne, jednake po veličini i sa uniformnom koncentracijom ekstraktivnih materija ( $c_0$ ), tako da se mogu predstaviti jednom pseudo-česticom;
- mešanje suspenzije biljnih čestica je intenzivno, tako da se otpor prenosu mase ekstrahovanih materija sa površine biljnih čestica u rastvor i kroz glavninu rastvora može zanemariti;
- koeficijent difuzije ekstraktivnih materija je konstantan i
- koncentracija ekstraktivnih materija na spoljašnjoj površini čestica je stalna zbog velike zapremine rastvarača.

Po potapanju biljnog materijala u rastvarač, ekstraktivne materije će difundovati kroz biljne čestice prema spoljašnjoj površini. Ako ekstrakcija traje beskonačno dugo, koncentracija ekstraktivnih materija u čestici će se smanjiti na vrednost  $c_\infty$ , tako da je razlika ( $c_0 - c_\infty$ ) mera mase ekstraktivnih materija koja se može ekstrahovati iz biljnog materijala za beskonačno dugo vreme. U nekom trenutku  $t$ , kada je srednja koncentracija ekstraktivnih materija u biljnim česticama  $\bar{c}$ , onda će razlika ( $\bar{c} - c_\infty$ ) biti mera mase ekstraktivnih materija koja je zaostala u biljnim česticama do tog trenutka. U slučaju jednostavnih geometrijskih oblika dolazi se do jednačine opšteg oblika (Ponomarev, 1976):

$$\frac{\bar{c} - c_\infty}{c_0 - c_\infty} = \alpha e^{-\beta \frac{D_{ef}}{h^2} t} \quad (1.3)$$

gde su  $\alpha$  i  $\beta$  konstante, čije vrednosti zavise od oblika čestica (za ploču  $\alpha=8/\pi$ , za sferu  $\alpha=6/\pi$ , a za cilindar pri difuziji kroz bočnu površinu  $\alpha = 0,6945$  i  $\beta = 5,76$ ) i  $h$  - geometrijski parametar (za ploču  $h = l/2$ , a za sferu i cilindar  $h = R$ , gde je  $l$  - debljina ploče, a  $R$  - poluprečnik sfere ili osnove cilindra).

Ako se pretpostavi da je  $c_\infty = 0$ , onda se jednačina (1.3) može uprostiti:

$$\frac{\bar{c}}{c_0} = \alpha e^{-\beta \frac{D_{ef} t}{h^2}} \quad (1.4)$$

Promena sadržaja ekstraktivnih supstanci u biljnom materijalu se obično opisuje transformisanim oblikom jednačine (1.4). Ako se koncentracije  $c_0$  i  $\bar{c}$  zamene odgovarajućim masama ekstraktivnih materija prisutnim u biljnoj sirovini na početku  $q_0$  i posle određenog vremena ekstrakcije  $q$  dobija se:

$$\frac{q}{q_0} = \alpha e^{-\beta \frac{D_{ef} t}{h^2}} \quad (1.5)$$

Dalje, ako se konstante  $\alpha$  i  $\beta$  zamene koeficijentom ispiranja

$$b = 1 - \alpha \quad (1.6)$$

i koeficijentom spore ekstrakcije

$$k = \frac{\beta D_{ef}}{h^2} \quad (1.7)$$

dobija se sledeća dvoparameterska jednačina:

$$\frac{q}{q_0} = (1 - b) \cdot e^{-k \cdot t} \quad (1.8)$$

Za izračunavanje parametara jednačine (1.8) koristi se njen linearizovan oblik:

$$\ln \frac{q}{q_0} = \ln(1-b) - k \cdot t \quad (1.9)$$

Ako se jednačina (1.8) razvije u Mak Lorenov red i zadrže samo prva dva člana, ona se transformiše u linearnu zavisnost:

$$\frac{q - q_0}{q_0} = b + k \cdot t \quad (1.10)$$

koja je poznata kao jednačina Ponomareva (Ponomarev, 1976).

### 1.3.3.2 Kinetički model zasnovan na teoriji fima

Ovaj model koristi teoriju filma prema kojoj se oko biljne čestice obrazuje tanak difuzioni sloj (Coulson i sar., 1991; Stanković i sar., 1994). Zasniva se na bilansu mase ekstraktivin materija koje se ekstrahuju iz biljnog materijala, definisan jednačinom (1.2) i na sledećim pretpostavkama (Veljković i Milenović, 2002):

- biljne čestice su izotropne, jednake po veličini i sa uniformnom koncentracijom ekstraktivnih materija, tako da se mogu predstaviti jednom pseudo-česticom;
- spoljašnja površina i zapremina biljnih čestica se ne menjaju u toku ekstrakcije;
- suspenzija biljnih čestica je idealno izmešana i homogena;
- ispiranje ekstraktivnih materija sa spoljašnje površine se odigrava trenutno;
- otpor prenosu mase je skoncentrisan u difuzionom sloju i
- koeficijent prenosa mase je konstantan.

Integrisanjem jednačine (1.2), uz početni uslov: za  $t = 0$ ,  $c = c_w$ , dobija se

$$-\ln \frac{c_s - c}{c_s - c_w} = k_L a \cdot t \quad (1.11)$$

Ako se uvedu smene  $b = c_w / c_s$  i  $k = k_L a$ , gde je:  $b$  - koeficijent ispiranja, a  $k$  - koeficijent spore ekstrakcije, onda je:

$$\left(1 - \frac{c}{c_s}\right) = (1 - b) \cdot e^{-k \cdot t} \quad (1.12)$$

Saglasno jednačini (1.12), kada  $t \rightarrow \infty$ , onda  $c \rightarrow c_s$ , tj. koncentracija rastvora u toku ekstrakcije približava se eksponencijalno koncentraciji zasićenog rastvora. Ako je  $b = 0$ , onda nema ispiranja, a ako je  $b = 1$ , onda je ispiranje potpuno; realno je  $0 < b < 1$ . Vrednosti parametara jednačine (1.12) se obično izračunavaju iz njenog linearizovanog oblika:

$$\ln\left(1 - \frac{c}{c_s}\right) = \ln(1 - b) - k \cdot t \quad (1.13)$$

### **1.3.4 Postupci ekstrakcije čvrsto-tečno bioaktivnih materija iz biljnih materijala**

Svi postupci ekstrakcije iz biljnih sirovina mogu se podeliti na statičke i dinamičke (Ponomarev, 1976). Kod statičkih postupaka ekstrakcije, biljni materijal se periodično zaliva rastvaračem za ekstrakciju i ostavlja određeno vreme da odstoji, dok dinamički postupci ekstrakcije podrazumevaju stalnu izmenu rastvarača i biljnog materijala. Statički i dinamički postupci ekstrakcije mogu se podeliti na diskontinualne i kontinualne. U diskontinualne spadaju svi oni postupci kod kojih se ekstrakcija jedne ili više šarži biljnog materijala izvodi u toku određenog vremena i mogu se podeliti na jednostepene i višestepene. Moguća je podela postupaka ekstrakcije prema uspostavljanju ravnoteže u toku procesa ekstrakcije na ravnotežne i neravnotežne. U odnosu na pravac kretanja rastvarača i biljnog materijala, postupci ekstrakcije se dele na istostrujne i protivstrujne.

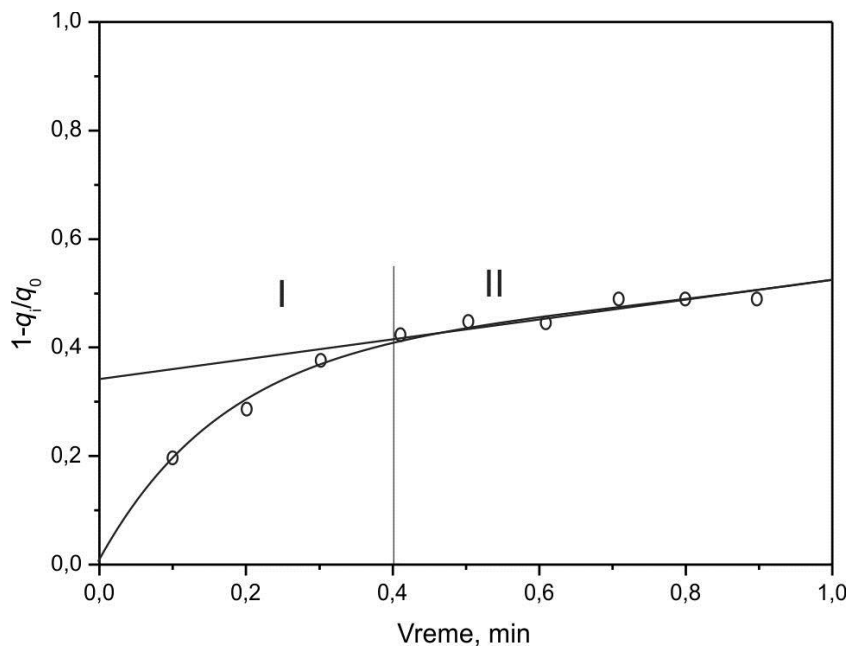
#### **1.3.4.1 Ekstrakcija maceracijom**

Maceracija je postupak ekstrakcije koji se široko primenjuje za dobijanje preparata prirodnih jedinjenja. Mehanizam maceracije može da se opiše na sledeći način. Zalivanjem biljnog materijala rastvaračem istovremeno počinju tri procesa:

- prodiranje rastvarača u biljnu sirovinu,
- ispiranje ekstraktivnih materija iz razorenih ćelija na površini biljnog materijala i

- difuzija ekstraktivnih materije kroz biljni materijal.

Proces maceracije traje do uspostavljanja ravnotežnog stanja u sistemu biljni materijal-rastvarač u kome se koncentracija materije u unutrašnjem i spoljašnjem ekstraktu izjednačava. Šematski se proces može prikazati krivom koja opisuje promenu sadržaja ekstraktivnih materija u biljnom materijalu i rastvaraču (slika 1.2). Na krivoj se uočavaju dva perioda: period brze ekstrakcije (I) i period spore ekstrakcije (II), tj. ispiranje i difuzija. U periodu brze ekstrakcije dolazi do rastvaranja materije iz razorenih ćelija na površini biljnih čestica, dok se u periodu II odigrava difuzija kroz biljne čestice prema glavnini rastvora. Saglasno jednačini Ponomareva, promena veličine  $(1 - q/q_0)$  sa vremenom u toku perioda II je linearna.



**Slika 1.2** Tipična kriva kinetike za ekstrakciju ekstraktivnih materija iz biljnog materijala

Maceracija je najčešće primenjivan postupak za ekstrakciju bioaktivnih ekstrakata iz biljnih materijala. Ona je, takođe, primenjivana za ekstrakciju sekundarnih kardiotoničnih glikozida iz fermentisanog svežeg ili osušenog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. različitim rastvaračima, kao što su: voda, vodeno-metanolni, vodeno etanolni rastvori, etilacetat, izopropanol i drugi (Fonin i Khorlin, 2003; Đorđević i Stanković, 1977; Pekić, 1972; Pekić i Stanković, 1973).

### **1.3.4.2 Ekstrakcija perkolacijom**

Perkolacija je dinamički proces ekstrakcije ekstraktivnih materija iz biljnog materijala u kome se rastvarač za ekstrakciju propušta kroz statički sloj biljnog materijala dejstvom gravitacione sile. Prodiranjem rastvarača kroz biljni materijal odvijaju se isti procesi prenosa mase kao i u slučaju maceracije, s tim što se na putu prodiranja rastvarača kroz sloj materijala istovremeno vrši razmena ekstraktivnih materija između ekstrakta i biljnog materijala, s jedne strane, tako da se ekstrakt obogaćuje lakše rastvornim materijama iz biljnog materijala i razmenom ekstrahovanih materija između zadržanog ekstrakta u biljnom materijalu (nerazorene ćelije, pore, kapilare) i ekstrakta, s druge strane. Deo teže rastvornih ekstrahovanih materija se može izdvojiti u višim slojevima biljnog materijala i u obliku taloga u nižim slojevima, tako da se biljni materijal javlja i kao filter za odvajanje istaloženih ekstraktivnih materija. Ako je potrebno izdvajanje zadržanih ekstraktivnih materija, sloj biljnog materijala se ispira dodatnim količinama rastvarača. To omogućava da se podešavanjem operativnih uslova perkolacije (prečnik perkolatora, visina sloja biljnog materijala, priroda rastvarača, protok rastvarača, odnos biljni materijal-rastvarač i gustina pakovanja biljnog materijala) može ostvariti visoka selektivnost ekstrakcije željenih sastojaka iz biljnog materijala. Procesu ekstrakcije ekstraktivnih materija iz biljnih materijala perkolacijom nisu dovoljno ispitani.

## **1.4 EKSTRAKCIJA TEČNOST-TEČNOST BIOAKTIVNIH MATERIJALA IZ BILJNIH EKSTRAKATA**

Za izdvajanje čistih bioaktivnih materija ili njihove smeše iz tečnih biljnih ekstrakata posle ekstrakcije tečno-čvrsto (luženje) koristi se ekstrakcija tečnost-tečnost pogodnim jednokomponentnim ili višekomponentnim sistemom rastvarača koji se ne meša ili se delimično meša sa ekstraktom. Posle prečišćavanja, tako dobijeni ekstrakti se najčešće uparavaju, da bi se dobili suvi ekstrakti. Primena ove metode je naročito pogodna za dobijanje materija koje se teško mogu odvojiti drugim metodama, kao naprimer, destilacijom, zbog sličnih struktura sa drugim materijama u smeši, termičke nestabilnosti ili njihove reaktivnosti sa rastvaračima, kao i zbog jednostavnosti aparatura i znatno manjih troškova proizvodnje.



Proces ekstrakcije tečnost-tečnost je proces prenosa mase koji se ostvaruje dovođenjem u neposredan kontakt dve uzajamno nerastvorne ili delimično rastvorne tečne faze između kojih se vrši raspodela materija koje se razdavaju. Proces prenosa mase iz jedne u drugu fazu podleže zakonima međufaznog prenosa mase i ravnotežne raspodele (Coulson i sar., 1991; Müller i sar., 2008; Prieve, 2000; Tolić, 1983, 1987; Treybal, 1985; Veljković i sar., 2012).

### 1.4.1 Osnovne zakonitosti ekstrakcije tečnost–tečnost

Teorija prenosa mase daje mogućnost izbora odgovarajućeg kontakta između faza za potpuno i brzo sprovođenja ekstrakcije rastvorka iz jedne u drugu fazu. Posle uravnotežavanja faza, dobijaju se ekstrakt (obogaćen rastvorkom) i rafinat (rastvor osiromašen rastvorkom). Prema ovoj teoriji, brzina razmene mase između dveju tečnih faza pokorava se opštoj jednačini (Coulson i sar., 1991, Müller i sar, 2008; Treybal, 1985):

$$\frac{dm}{dt} = K_c a \cdot \Delta c \quad (1.14)$$

gde je:  $m$  - količina materije koja prelazi iz jedne u drugu fazu,  $K_c a$  - zapreminski ukupni koeficijent prenosa mase ( $K_c$  - ukupni koeficijent prenosa mase i  $a$  - specifična međufazna površina),  $\Delta c$  - pogonska sila prenosa mase i  $t$  - vreme.

Brzina ekstrakcije može se regulisati promenom veličina na desnoj strani jednačine (1.14). Povećanje vrednosti  $K_c$  se teško može ostvariti. Za dati sistem,  $K_c$  se može povećati intenzivnijim strujanjem tečnosti, odnosno intenzifikacijom mešanja faza. Povećanje  $\Delta c$  u praksi nije izvodljivo, jer je u osnovi određeno sastavom faza i uslovima izvođenja operacije ekstrakcije tečnost–tečnost. Otuda su za regulaciju procesa ekstrakcije tečnost–tečnost najvažnije veličine međufazna površina i vreme kontakta faza. Međufazna površina se može povećavati intenzivnijim mešanjem faza, čime se ostvaruje bolje dispergovanje faza. Pri tome se mora voditi računa da intenzitet mešanja ne dovede do stvaranja stabilnih emulzija koje onemogućuju dobro razdvajanje faza i povećanja podužnog mešanja, koje može da dovede do smanjenja gradijenta prenosa mase između faza u ekstraktoru. Ovo je značajno za izbor konstrukcije ekstraktora i režima njihovog rada.

#### 1.4.1.1 Izbor rastvarača i sastava faza

Ravnotežni odnosi u sistemu tečnost-tečnost zavise u velikoj meri od hemijskih karakteristika rastvorenih materija i odabranih rastvarača. Teorija rastvora omogućuje lakši izbor rastvarača za ekstrakciju, koji trebaju da zadovolje određene zahteve, kao što su: veća razlika u gustinama između njih i polaznog rastvora smeše materija koje se razdvajaju, veća rastvorljivost rastvorka u jednoj od faza, veliki koeficijent difuzije i maksimalna selektivnost ekstrakcije željene supstance u jednoj od faza. Razdvajanje komponenti polaznog suvog biljnog ekstrakta ili njegovog rastvora ekstrakcijom tečnost-tečnost izvodi se na razne načine, što zavisi od prirode ekstraktivnih materija koje se razdvajaju i svojstva sistema rastvarača za razdvajanje.

U zavisnosti od broja rastvarača koji se koriste za ekstrakciju tečnost-tečnost, sistemi rastvarača se dele na:

- sisteme sa jednim rastvaračem koji se sastoji od najmanje tri komponente (dve komponente polaznog rastvora ili ekstrakta i rastvarač), koji se mogu uslovno smatrati trokomponentnim (ako se prateće materije prihvate kao jedna komponenta) i
- sisteme sa dva rastvarača (frakciona ekstrakcija) i najmanje četiri komponente (dve komponente polaznog rastvora od koji se jedna izdvaja iz rastvora, dok druga komponenta predstavlja prateće materije, i dva rastvarača), s tim što se rastvarači mogu sastojati i od smeše dve ili više komponenti.

Međusobna rastvorljivost rastvarača i raspodela ekstraktivnih materija između dve faze sistema rastvarača definisana je različitim uzajamnim dejstvima između molekula rastvarača i molekula rastvorenih materija. Najvažniju ulogu pri tome ima sposobnost molekula neke komponente iz smeše rastvorenih materija da gradi vodonične veze sa nekom komponentom rastvarača ili nekom komponentom rastvorene smeše. Molekuli sa aktivnim atomom vodonika imaju ulogu donora vodonika, a molekuli ili atomi u molekulu sa slobodnim elektronskim parovima ulogu akceptora vodonika. Postoje materije koji poseduju oba ova svojstva. Saglasno tome razlikuju se:

- materije koje poseduju svojstva i akceptora i donora, na primer, molekuli sa hidroksilnim grupama (voda, alkoholi, fenoli), amini, karbonske kiseline itd.;
- molekuli koji poseduju isključivo osobine akceptora, kao što su etri, ketoni, aldehidi, estri itd.;

materije sa molekulima donora, kao što su hloroform, metilhloridi i etilenhloridi;  
- materije koje ne grade vodonične veze, kao npr. ugljovodonici, hloroform, etilenhlorid, ugljentetrahlorid itd.

Molekuli koji poseduju hidrofilne i hidrofobne delove imaju osobine koje zavise od odnosa ovih delova. Ukoliko se molekulu poveća broj hidroksilnih grupa, njegova rastvorljivost u vodi se povećava. Takvim razmatranjem može se predvideti rastvorljivost nekog para rastvarača za materije koje se rastvaraju u njima. Merilo selektivnosti jednog para rastvarača je faktor selektivnosti rastvarača  $\beta$  za dati par čvrstih matreija, koji se izračunava po formuli:

$$\beta = \frac{K_1}{K_2} = \frac{E_1}{E_2} \quad (1.15)$$

gde je:  $K_1$  i  $K_2$  – koeficijenti raspodele za materije 1 i 2 ( $K_1 > K_2$ ), a  $E_1$  i  $E_2$  – ekstrakcioni brojevi za materije 1 i 2, koji se izračunavaju po jednačini (Müller i sar, 2008; Foerest, 1957):

$$E = KV_L/V_T = K \cdot v E \quad (1.16)$$

gde je:  $K$  - koeficijent raspodele odgovarajuće supstance;  $V_L$  – zapremina lake faze i  $V_T$  - zapremina teške faze i  $v$  odnos zapremina lake i teške faze. Ukoliko je  $\beta$  veće pod istim ostalim uslovima, materije se lakše razdvajaju i biće potreban manji broj stepena odvajanja, što smanjuje gubitke u vremenu, uštedi u rastvaračima i aparativnim troškovima.

Najveća selektivnost neke od dve materije se postiže kada su im ekstrakcioni brojevi međusobno recipročni (Müller i sar., 2008 ; Foerest, 1957):

$$E_1 = 1/E_2 \quad (1.17)$$

Pri izboru sistema rastvarača treba da odnos zapremina faza nije ekstreman, tj.  $V_L/V_T > 0$ , ali ne manji od 0,1. Optimalni odnos zapremina faza, saglasno jednačinama (1.15) i (1.16), je:

$$V_L/V_T = 1/(v \cdot K_1 \cdot K_2) \quad (1.18)$$

Primenom osnovnih jednačina procesa protivstrujne ravnotežne raspodele na monotonu funkciju  $\log K = f(\text{sastav faza})$ , dobijaju se odnosi kojima može da se analitički odredi sastav sistema sa kojim odvajanje supstanci teče pod najpovoljnijim uslovima. Osnovna pretpostavka ravnotežne raspodele je pogodan sistem za razdvajanje. U većini slučajeva je izbor sistema za protivstrujnu raspodele olakšan analogijama sa literaturnim podacima, te je zbog toga modifikacija eksperimentalnih uslova ograničena na određivanje optimalnog tretiranja sa odabranim komponentama rastvarača i određivanje optimalnog odnosa zapremina faza. Ovaj odnos se bira tako da se maksimum krive raspodele nađe na sredini uređaja za razdvajanje smeše supstanci ekstrakcijom tečnost–tečnost. Ova simetrija je osnovna pretpostavka protivstrujne ekstrakcije. Da bi maksimum krive raspodele, na primer, supstanci 1 i 2 bio na sredini uređaja, mora proizvod ekstrakcionih brojeva, odnosno zapreminski faktor  $\alpha$  da ispunjava uslov (Müller i sar., 2008; Foerest, 1957):

$$\alpha = E_1/E_2 = 1 \quad (1.19)$$

Imajući u vidu jednačinu (1.16), ovaj je uslov ispunjen samo tada kada je odnos zapremina lake i teške faze sistema  $v'$  (Müller i sar., 2008; Foerest, 1957):

$$v' = 1/(E_1/E_2) \quad (1.20)$$

Prema ovoj jednačini, svakoj vrednosti  $v'$  odgovara beskonačan broj parova  $K_1$  i  $K_2$ , tako da se u daljem razmatranju može doći do pretpostavke da za jednu određenu vrednost  $v'$  egzistira najmanje jedan sistem u kome koeficijenti raspodele neke supstance u spregu sa drugom supstancom moraju biti identični sa ovim parom veličina. Nađeno je da je koeficijent raspodele neke supstance u sistemu na konstantnoj temperaturi isključivo funkcija sastava faza, odnosno da je  $\log K = f(\text{sastav faza})$ . Jedan od odlučujućih uslova je da se promena jednoznačno može izraziti preko parametra promene  $p$ , na primer, sastav jedne komponenti u sistemu za razdvajanje. U tom slučaju ova funkcija ima oblik:

$$\log K = f(p) \quad (1.21)$$

Pri linearnoj raspodeli izoterma raspodele supstanci 1 i 2 izražava se jednačinom prave:

$$\log K_1 = t_1 \cdot p + a \quad (1.22)$$

odnosno

$$\log K_2 = t_2 \cdot p + b \quad (1.23)$$

gde su:  $t_1$  i  $t_2$  - koeficijenti pravaca pravih,  $a$  i  $b$  - odsecci na ordinate i  $p$  - parameter promene (npr. sastav jedne od komponenti).

Logaritmovanjem jednačine (1.18) i zamenama u jednačinama (1.22) i (1.23) dobija se:

$$\log(1/v') = (t_1 + t_2) \cdot p + a + b/2 \quad (1.24)$$

Iz ove jednačine se može analitički odrediti parameter  $p$ , odnosno udeo jedne od komponenti u sistemu za razdvajanje. Za određenu vrednost  $v'$  odgovarajućeg sistema važi:

$$p = (a + b + 2 \log v') / (t_1 + t_2) \quad (1.25)$$

Jednačina (1.25) daje sastav sistema u zavisnost od promene parametra  $p$ , odnosno promenu udela za koju važi uslov  $\alpha = 1$  i za proizvoljno odabranu vrednost  $v'$  u realnim granicama promene. Teorijski, promena nema ograničenja i kreće se u granicama od 0 do beskonačno, ali se praktično kreće u saglasnosti sa jednačinom (1.25) od  $(\log K_{1max} + \log K_{2max}) / 2$  do  $(\log K_{1min} + \log K_{2min}) / 2$ . Daljim analitičkim transformacijama dobija se jednačina:

$$\log K_1 / K_2 = (t_1 - t_2) p + a - b \quad (1.26)$$

Navedena razmatranja se tiču uglavnom izbora sastava faza pri diskontinualnoj ekstrakciji tečnost-tečnost pri kojoj se sva izračunavanja odnose na faze koje se u svakom levku nalaze u ravnotežnom stanju pre njihovog odvajanja. Pri tome se može uslovno prihvatiti da se ravnoteža odnosi na idealne uslove uravnotežavanja. U praktičnom razmatranju primene ovog postupka, mora se uzeti u obzir da uspostavljena ravnoteža odstupa od idealne ravnoteže, zbog toga se, u realnim uslovima, izbor sastava sistema rastvarača za razdvajanje komponenti neke smeše

supstanci najčešće vrši eksperimentalnim putem variranjem sastava sistema rastvarača za razdvajanje, posebno kad se koriste višekomponenti sistemi.

Ekstrakcija tečnost – tečnost se može izvoditi diskontinualno ili kontinualno.

#### **1.4.1.2 Diskontinualna ekstrakcija tečnost–tečnost**

U diskontinualnoj ekstrakciji tečnost–tečnost rastvarač i rastvor suvog ekstrakta biljnog materijala su u kontaktu sve dok se ne postigne ravnoteža sastava u obe faze, a zatim se, posle raslojavanja, faze odvajaju. Proces se obično izvodi u levcima za odvajanje. U prvi levkova doda se rastvor ekstrakta u jednoj od faza (lakoj ili teškoj fazi), zatim se doda druga faza u prvi levak, sadržaj u levku dobro izmućka i ostavi da se uravnotežene faze razdvoje. Ako je rastvor ekstrakta ubačen samo u prvi levak, dalje se u naredni levak ubacuje druga sveža faza (gornji - laka faza ili donji - teška faza), tako da u prvom levku ostaje samo polazni rastvor. U prvi levak se ponovo ubacuje čista faza, dobro izmućkaju faze i ostavi da se ponovo odvoje slojevi uravnoteženih faza. Dalje se ovaj proces ponavlja dok se ne konstatuje da se u odgovarajućoj fazi u narednim levcima ne izdvaja supstanca koja se želi dobiti u čistom stanju. Faze iz svih levkova sa sadržajem izdvojene željene supstance se spajaju i iz njih drugim operacijama izdvaja željena materija. Proces se može izvoditi istostrujno ili protivstrujno, u zavisnosti od šeme kretanja rastvarača, ali najčešće istostrujno. Najpouzdaniji podaci za svaki pojedinačni slučaj se dobijaju eksperimentalnim putem. Treba istaći da se, u zavisnosti od toga u kojoj se fazi rastvara ekstrakt, postižu različiti stepeni ekstrakcije željene supstance u jednoj od faza. U kojoj fazi će se rastvarati supstance prisutne u ekstraktu određuje se eksperimentalno. Na osnovu dobijenih rezultata razdvajanja, za rastvaranje smeše se bira ona faza sa kojom se ostavaruje veći stepen ekstrakcije željene supstance.

Za izolaciju kardiotoničnog glikozida Dgx iz izolata smeše sekundarnih glikozida fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh., ima malo podataka o primeni konvencionalne diskontinualne ekstrakcije tečnost-tečnost (Pekić, 1972).

### 1.4.1.3 Kontinualna ekstrakcija tečnost-tečnost u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj

#### koloni

Prirodne bioaktivne materije čije se strukture neznatno razlikuju obično kristališu izomorfno. Jedan od veoma efikasnih postupaka koji se može primeniti za izolaciju takvih supstanci, iz izolata ili kristalizata, jeste kontinualna frakciona ekstrakcija tečnost-tečnost na Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni. Posebno je značajna primena ove metode kada sinteza ovih supstanci nije moguća ili je veoma složena i sa komercijalnog aspekta neisplativa, kao što je slučaj sa primarnim i sekundarnim kardiotoničnim glikozidima *Digitalis lanata* Ehrh. Do sada, samo su Pekić i Tolić (1980) objavili primenu kontinualne protivstrujne ekstrakcije tečnost-tečnost za izdavanje LC iz smeše LA, LB i LC. Mali je broj radova u literaturi koji se odnose na izdvajanje drugih prirodnih bioaktivnih materija iz njihovih smeša (Haynes i Stuart, 1963; Heyberger, 2010; Pekić, 1980; Xien i sar., 2003). U literaturi nema podataka o primeni kontinualne frakcione ekstrakcije tečnost-tečnost na Karr - ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni za izolaciju Dgx iz suvih izolata ili kristalizata sekundarnih glikozida.

Ekstrakcija tečnost-tečnost se može izvoditi i u kontinualnim ekstraktorima različitog tipa sa i bez mehaničkog mešanja. Za razdvajanje bioaktivnih materija iz suvih biljnih ekstrakata, izolata i kristalizata najčešće se koriste kolonski ekstraktori različitih konstrukcija (Coulson i sar., 1991; Müller i sar., 2008; Prieve, 2000). Jedan od najefikasnijih kolonskih ekstraktora za frakciono odvajanje bioaktivnih supstanci iz rastvora njihovih izolata ili kristalizata protivstrujnom frakcionom ekstrakcijom sa dvofaznim višekomponentnim sistemim rastvarača je Karr-ova ekstrakciona vibraciona kolona sa uvođenjem napojnog rastvora smeše supstanci na dnu, vrhu ili sredini kolone. Prednost ove metode je jednostavnost postrojenja za izvođenje procesa, brz i lak eksperimentalni izbor operativnih uslova i mogućnost odvajanja supstanci vrlo sličnih struktura, koje se drugim metodama nemogu odvojiti u čistom stanju.

Osnovna pretpostavka efikasnog razdvajanja supstanci protivstrujnom raspodelom na Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni je pogodan sistem rastvarača. Izbor sistema je olakšan odgovarajućim analogijama sa podacima dobijenim pri diskontinualnoj ekstrakciji tečnost-tečnost u levkovima za odvajanje: izbor pogodnog sistema rastvarača i njihovog odnosa u fazama, uz neophodne modifikacije ostalih eksperimentalnih operativnih uslova rada kolone. Pri

tome se biraju optimalni uslovi pri kojima se maksimum krive raspodele nalazi na sredini kolone. Intenzifikacija operativnih uslova rada Karr-ove ekstrakcione vibracione kolone sa perforiranim tanjirićima postiže se dovodenjem dodatne mehaničke energije ekstrakcionom sistemu povratno-periodičnim kretanjem vibracione mešalice (tj. seta perforiranih pločica sa relativno velikom slobodnom površinom).

Ekstrakciona kolona tipa Karr-a ima važnu primenu u protivstrujnoj ekstrakciji tečnost-tečnost i frakcionoj ekstrakciji tečnost-tečnost pojedinih materija iz smeše sa materijama slične strukture (Lo i sar., 1992), što je uglavnom slučaj sa suvim izolatima iz biljnih sirovina.

**Protivstrujna ekstrakcija tečnost-tečnost.** Prorivstrujnom ekstrakcijom tečnost-tečnost se efikasno prenosi jedan ili više rastvoraka iz jedne faze u drugu. U ovom slučaju, napojni rastvor, koji sadrži željeni rastvorak, ulazi na jednom kraju kolone, a rastvarač za ekstrakciju na drugom kraju kolone. Mesto uvođenja napojnog rastvora zavisi od toga da li se rastvorak rastvara u lakoj ili teškoj fazi sistema za razdvajanje. Ako se rastvorak rastvara u lakoj fazi, napojni rastvor se uvodi na donjem kraju kolone i obrnuto. Napojni rastvor i rastvarač teku jedan nasuprot drugom, pri čemu se jedna faza disperguje u drugoj kontinualnoj fazi, vibracionom mešalicom. Ekstrakt (rastvarač obogaćen rastvorkom) i rafinat (napojni rastvor osiromašen rastvorkom) izlaze na vrhu ili dnu kolone, zavisno od toga u kojoj fazi se izdvaja željena materija.

**Prorivstrujna frakciona ekstrakcija tečnost-tečnost.** Kod ovog tipa ekstrakcije tečnost-tečnost smeša dva ili više rastvorka, rastvorena u jednoj od faza, ulazi u kolonu kao napojni rastvor na sredini kolone, a dve faze (rastvarači) koje se ne mešaju, ulaze jedna na dnu (laka faza) na jednom, a druga (teška faza) na vrhu kolone. Selekcijom rastvarača u fazama (jedan ili dva rastvarača) i podešavanjem odnosa protoka faza i odgovarajućih ostalih operativnih uslova, može se postići da se jedan od rastvorka iz napojnog rastvora bolje ekstrahuje u jednoj od faza. Iznalaženje sistema rastvarača za razdvajanje u kojem se maksimum krive raspodele nalazi oko sredine kolone pri najpovoljnijem odnosu faza, je često jako težak zadatak. Sastav sistema rastvarača koji odgovara ovom zahtevu može se odrediti računski, grafički ili eksperimentalnim putem, s tim što se poslednji smatra najpouzdanijim.



## 2. EKSPERIMENTALNI DEO

### 2.1 MATERIJAL

#### 2.1.1 Biljna sirovina

Korišćeno je suvo lišće plantažno gajenog vunastog digitalisa (*Digitalis lanata* Ehrh.), svetlo do tamno zelene boje, sa sadržajem LC 0,3-0,4 % (računato na suvi biljni materijal), vlažnosti 6,5 %, sa maksimalnim sadržajem stranih primesa oko 1 % (zemlja, pesak, kamenčići, drugi delovi biljke, nema delova drugog bilja, nema cvetova dvogodišnjeg bilja, nema plesnavo lišće, listove druge boje: braon, tamno mrke, crne i drugih boja) iusitnjeno na mlinu tipa čekićar. Za identifikaciju i ispitivanje kvaliteta lišća *Digitalis lanata* Ehrh. korišćen su oficijelni metodi propisani Ph. Eur. 7th Ed. (2012).

#### 2.1.2 Hemikalije

LC, Dx, Gx, Dgx,  $\alpha$ - i  $\beta$ -acetildigoksin, neodigoksin, digoksinen, digoksinen tetrakisdigitoksozid, digoksinen bisdigitoksozid, acetosid, diginatin, (Merck), hloroform (p.a), etanol (p.a), metanol (p.a), metilenhlorid (p.a), acetonitril (p.a), etilacetat (p.a.), anhidrovana mravlja kiselina (p.a.), glacijalna sirćetna kiselina (p.a.), hlorovodonična kiselina (p.a), 98 % m/m sumporna kiselina, petroletar ( frakcija 60-70 °C), bazni rastvor olovo(II)-acetata, amonijum-hidroksid,(p.a) (Fluka),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , MgO,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , heksametilentetramin, hidrazin-sulfat kalijum-bromid (p.a.) (prethodno sušen 1 h na 250 °C), silica gel F<sub>254</sub>, i silikagel G (Fluka), natrijum-nitrit (p.a.), natrijum-molibdat (p.a.), natrijum-hidroksid (p.a) (Merck) i destilovana voda.

#### 2.1.3 Reagensi

**Rastvor baznog olovo(II)-acetata.** U 30 % rastvor olovo(II)-acetata dodaje se koncentrovani amonijum-hidroksid sve dok proba sa 2-3 kapi ovog rastvora u prisustvu fenofalein-indikatora ne dobije obojenje belog vina (Foerest, 1957; Pekić i Stanković, 1973)

**Reagens sa ksanthidrolom.** Odmeri se 10 mg ksanthidrola, rastvori u odmernom sudu (100 cm<sup>3</sup>), doda oko 50 cm<sup>3</sup> glacijalne sirćetne kiseline i rastvori uz blago zagrevanje. Rastvoru se

doda 1 cm<sup>3</sup> 25 % rastvora hlorovodonične kiseline i odmerni sud dopuni do crte glacijalnom sirćetnom kiselinom. Za svako određivanje priprema se svež rastvor ksanthidrola.

Ostali reagensi se pripremaju prema Ph Eur. 7th Ed. (2012).

## **2.2 METODE**

### **2.2.1 Mlevenje biljne sirovine**

Lišće *Digitalis lanata* Ehrh. je samleveno u mlinu tipa čekićar. Step en usitnjenosti biljnog materijala je određen sejanjem pomoću seta standardnih sita. Pripremljene su četiri frakcije biljnog materijala srednjeg prečnika 0,5, 2,0, 5,0 i 7,0 mm.

### **2.2.2 Fermentacija biljne sirovine**

Samleveno lišće (5 g za analitičke svrhe ili u potrebnim količinama za druga ispitivanja), određenog srednjeg prečnika, kvasi se vodom (5, 10 i 15 cm<sup>3</sup>, tj. u odnosu 1:1, 1:2 i 1: 3 m/v), dobro izgnječi, stavi u plastične kese, koje se termički zatale, i biljni materijal fermentiše 12-72 h na 37 °C.

### **2.2.3 Sadržaj digitoksina, gitoksina, digoksina i ukupnih glikozida u fermentisanom biljnom materijalu**

Određuje se po procedurama opisanim u literaturi (Pekić i Stanković, 1973) i HPLC metodi propisanoj u Ph. Eur. 7th Ed., Metod 2.2.29 (2012).

#### **2.2.3.1 Priprema osnovnog rastvora**

U sud sa fermentisanim biljnim materijalom (5 g) sipa se 50 cm<sup>3</sup> 50 % vol. metanola i sadržaj u sudu mućka 1 h. Po završenoj ekstrakciji, u suspenziju se postepeno, uz mešanje, doda 5 cm<sup>3</sup> 30 % sveže pripremljenog rastvora baznog olovo(II)-acetata, sadržaj suda se izmućka i ostavi da stoji 5 min, a zatim se višak olovo(II)-acetata taloži dodatkom 5 % rastvora natrijum-sulfata. Ako rastvor u sudu daje pozitivnu reakciju na Pb<sup>2+</sup> jon sa 2 % rastvorom kalijum-jodida (2-3 kapi bistrog rastvora pomešane na sahatnom staklu sa 2-3 kapi 2 % rastvora kalijum-jodida gradi žuti talog u prisustvu Pb<sup>2+</sup> jona), dodaje se rastvor natrijum-sulfata dok se ne dobije negativna

reakcija (nema žutog taloga). Posle taloženja viška olovo(II)-acetata, suspenzija se profiltrira preko kvantitavnog filter papira na levku za brzu filtraciju. Filtrat se hvata u levak za odvajanje, s tim što se prve količine mutnog filtrata vraćaju na ponovnu filtraciju sve dok se filtrat ne izbistri. Talog na filter papiru se ispira 3 puta sa po 50 cm<sup>3</sup> 50 % vol. metanola. Filtrat, zajedno sa rastvorima od ispiranja, ekstrahuje se jednom sa 25 cm<sup>3</sup> i 4 puta sa 12,5 cm<sup>3</sup> hloroforma. Spojeni hloroformske ekstrakti se propuštaju preko bezvodnog natrijum-sulfata (natrijum-sulfat na filter papiru u levku za filtraciju) u balon sa okruglim dnom (250 cm<sup>3</sup>). Natrijum-sulfat se ispere 3 puta sa po 10 cm<sup>3</sup> hloroforma. Hloroformske ekstrakt, zajedno sa hloroformskim rastvorom od ispiranja, upari se do suva na rotacionom vakuum uparivaču na 60-70 °C.

### **2.2.3.2 Sadržaj digitoksina, gitoksina, digoksina i srodnih materija u suvim izolatima**

Suvi ostatak (50 mg) se rastvori u 100 cm<sup>3</sup> metanola (osnovni rastvor) i dobijeni rastvor koristi za određivanje Dx, Gx i Dgx metodom HPLC za određivanje sadržaja Dgx (Ph. Eur 7th Ed., Metod: 2.2.29, 2012), kao i za spektrofotometrijsko određivanje UG sa ksanthidrolnim reagensom.

**Ukupni glikozidi.** Od osnovnog rastvora pipetira se po 0,01 cm<sup>3</sup> u pet epruveta, na ključalom vodenom kupatilu, otpari rastvarač, doda po 5 cm<sup>3</sup> ksanthidrolnog reagensa, epruvete drže u ključalom vodenom kupatilu 3 min, ohlade mlazom hladne vode i izmeri apsorbancija obojenog rastvora na 530 nm. Kao slepa proba koristi se metanol. Na osnovu srednje vrednosti apsorbancije izračunava se, uz pomoć kalibracionog dijagrama, količina UG i njihov sadržaju suvom biljnom materijalu (u %).

**Standardni rastvori sekundarnih glikozida.** Po 50 mg Dx, Gx i Dgx, prethodno osušenih do konstantne mase u vakuum eksikatoru iznad fosfor(V)-oksida, rastvori se u 50 cm<sup>3</sup> metanola (analogno pripremi standardnog rastvora Dgx prema Ph. Eur. 7th Ed. (2012).

**Kalibracioni dijagram za ukupne glikozide.** Pomešaju se jednake količine standardnih rastvora Dx, Gx i Dgx i od ovog rastvora pipetira po 0,001, 0,002, 0,004, 0,005, 0,006, 0,008 i 0,01 cm<sup>3</sup> u epruvete, što odgovara količinama standarda Dx, Gx ili Dgx od 10, 20, 40, 50, 60, 80 i 100 µg. Dalje se postupa kao pri određivanju ukupnih glikozida u osnovnom rastvoru. Na

osnovu dobijenih vrednosti apsorbancije, konstruiše se kalibracioni dijagram za ukupne glikozide.

**Sadržaj izolovanog digoksina visoke čistoće.** Ispitivanje se vrši HPLC metodom za određivanje sadržaja srodnih materija (Ph. Eur. 7th Ed., Metod: 2.2.29, 2012.).

### 2.2.3.3 Određivanje sadržaja digitoksina, gitoksina i digoksina u izolatima i kristalozatu digoksina metodom HPLC

Sadržaj Dgx, Gx i Dx u izolatima, standardnom i izolovanom kristalozatu Dgx je određivan HPLC metodom prema Ph. Eur. 7th Ed., Metod: 2.2.29, 2012).

**Tabela 2.1** Vreme i sastav mobilnih faza A i B (Uređaj: Agilent 1100 Series. Kolona: dužina 0,15 m, prečnik 3,9 mm; stacionarna faza: oktadecilsilil-silika gel za hromatografiju (5 µm). Mobilna faza A: acetonitril:voda (10:90 vol). Mobilna faza B: acetonitril:voda(90:10 vol.). Detekcija: 220 nm. Brzina protoka: 1,5 cm<sup>3</sup>/min. Zapremina injektiranja: 10 µl standardnog i referentnog rastvora. Temperatura: sobna).

Vreme (min)	Mobilna faza A (% v/v )	Mobilna faza B (% v/v )
0-0	78	22
5-15	78 → 30	22 → 70
15-16	30 → 78	70 → 22
16-30	78	22

Izračunavanje sadržaja glikozida je prema jednačini (2.1) (Ph. Eur 7th Ed., Metod 2.2.29, 2012.):

$$\% \text{ Glikozida} = \frac{P_{pr} \cdot W_{st} \cdot K}{P_{st} \cdot W_{pr}} \cdot \frac{(100 - a_{st})}{(100 - a_{pr})} \quad (2.1)$$

gde je:  $P_{pr}$  - površina pika glikozida u ispitivanom osnovnom rastvoru,  $P_{st}$  - površina pika glikozida u standardnom rastvoru,  $W_{pr}$  - odmerena masa ispitivane supstance (mg),  $W_{st}$  - odmerena masa standardne supstance (mg),  $K$  - sadržaj glikozida u radnom standardu (%),  $a_{pr}$  - gubitak sušenjem ispitivane supstance (%) i  $a_{st}$  - gubitak sušenjem standardne supstance (%).

**Priprema standardnog rastvora digoksina (rastvor digoksina I).** 50.0 mg ispitivane supstance rastvori se u 100,0 cm<sup>3</sup> metanola (p.a.) (Ph. Eur. 7th Ed., Metod: 2.2.29, 2012;).

#### **2.2.3.4 Sadržaj izolovanog digoksina**

**Kvalitativna analiza izolovanog digoksina.** Organoleptičke i fizičko-hemijske karakteristike izolovanog Dgx određuju se prema propisanim metodama Ph. Eur. 7th Ed. (2012).

**FT-IR spektrofotometrija.** Snimanje FT- IR u KBr pločicama prema propisu Ph. Eur., 7<sup>th</sup> Edn, Metod: 2.2.24 (2012).

**Kvantitativna analiza sadržaja digoksina.** Koristi se HPLC metoda propisana Ph. Eur. 7th Ed. Metod 2.2.29, (2012), opisana u odeljku 2.2.3.3.

#### **2.2.3.5 Ekstrakcija sekundarnih glikozida iz fermentisanog lišća**

Sekundarni glikozidi su ekstrahovani rastvorima etanola (10 i 50 % vol.) maceracijom i perkolacijom.

**Maceracija.** Ekstrakcija Dx, Gx i Dgx maceracijom se izvodi u ovom radu prvi put modifikovanom postupku (Fonin i sar., 2003). Fermentisani biljni materijal (10 g) i rastvor etanola (100 cm<sup>3</sup>; 10 ili 50 % vol.) ubace se u sud sa mešalicom, podesi intenzitet mešanja i vrši maceracija 1,0 h na sobnoj temperaturi. Tečni ekstrakt (macerat) se odvaja od iscrpljenog biljnog materijala filtracijom pod vakuumom na Büchner-ovom levku i prebaci u levak za odvajanje (10 dm<sup>3</sup>) radi ekstrakcije sekundarnih glikozida hloroformom. Biljni materijal ekstrahuje se na isti način još dva puta. Macerati se pripoje prvom maceratu u levku za odvajanje. Sloj biljnog materijala na Büchner-ovom levku ispira se 3 puta sa po 10 cm<sup>3</sup> odgovarajućeg rastvarača. Rastvori od ispiranja se pripoje spojenim ekstraktima u levku za odvajanje.

**Perkolacija.** Ekstrakcija se izvodi u perkolatoru, unutrašnjeg prečnika 20 cm i visine 60 cm, izrađenog od nerđajućeg čelika, sa loptastom slavinom na dnu. Zapremina perkolatora je 18,84 dm<sup>3</sup>. U perkolator se ubaci najpre rastvarač, a zatim fermentisani biljni materijal određenog stepena usitnjenosti do visine 20, 30 ili 40 cm. Rastvarači su voda i vodeni rastvori metanola i etanola (10 i 50 % vol.). Perkolacija se vrši na sobnoj temperaturi pri različitim protocima

perkolata (0,5, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5 i 6 dm<sup>3</sup>/h) pri konstantnoj zapremini isteklog perkolata (24 dm<sup>3</sup>). U određenim vremenskim intervalima meri se zapremina isteklog perkolata (1-24 dm<sup>3</sup>).

Za dobijanje ekstrakta obogaćenog Dgx, perkolacija se vrši u bateriji od 10 perkolatora. Perkolati iz prethodnih perkolatora koriste se za perkolaciju u narednim perkolatorima, s tim što se prati sadržaj Dgx u perkolatima. U toku procesa, izdvajaju se perkolati u kojima je sadržaj Dgx maksimalan. Perkolat iz poslednjeg perkolatora, u kome je sadržaj Dgx ispod maksimalnog, vraća se u prvi perkolator, u kome je stepen ekstrakcije Dgx, po pravilu, preko 90 % i dalje nastavlja proces. Kad se u nekom perkolatoru postigne stepen ekstrakcije Dgx veći od 95 %, u njega se ubacuje nova količina fermentisanog biljnog materijala. Na ovaj način se obezbeđuje kontinualno odvijanje procesa ekstrakcije sa visokim sadržajem Dgx i povećanim sadržajem Dx i Gx.

## **2.3 PREČIŠĆAVANJE PERKOLATA, EKSTRAKCIJA SEKUNDARNIH GLIKOZIDA IZ PERKOLATA I DOBIJANJE SUVIH IZOLATA SMEŠE SEKUNDARNIH GLIKOZIDA**

### **2.3.1 Obrada ekstrakata sa baznim olovo(II)-acetatom i ekstrakcija hloroformom ili trihloretilenom (metod I)**

Tečni vodeni, vodeno-metanolni i vodeno-etanolni ekstrakti (perkolati) tretiraju se analogno proceduri opisanoj u odeljku 2.2.3.1 za pripremu osnovnog rastvora za analizu sadržaja Dx, Gx, Dgx i UG u fermentisanom lišću. Postupak je prvi put razvijen u ovom radu kao originalna modifikacija ranije primenjivanih postupaka Pekića (1972) i Pekića i Stankovića (1973).

### **2.3.2 Ekstrakcija tečnost-tečnost (metod II)**

Sekundarni glikozidi se ekstrahuju iz vodeno-etanolnog i vodeno-metanolnog perkolata hloroformom ili trihloretilenom (1x1/2 i 4x1/4 polazne zapremine perkolata) mućkanjem po 20 min u levku za odvajanje. Dobijeni hloroformski ili trihloretilenski ekstrakti (izolati) se uparavaju na rotacionom vakuum-uparivaču do suva i dobijeni suvi ekstrakti - suvi izolati smeše sekundarnih glikozida koriste se za izolaciju Dgx ekstrakcijom tečnost-tečnost. Postupak je prvi put razvijen i primenjen u ovom radu.

### **2.3.3 Obrada koncentrovanog hloroformskog ili trihloretilenskog ekstrakta magnezijum-oksidom (metod III)**

Hloroformski ili trihloretilenski ekstrakt (izolat) tečnog ekstrakta sekundarnih glikozida iz fermentisanog lišća, se uparava pod vakuumom na 60 °C u rotacionom vakuum uparivaču do 1/2 polazne zapremine (8 dm<sup>3</sup>). U koncentrovani ekstrakt dodaje se magnezijum-oksid (MgO: polazni biljni materijal 1:10 g/g), dobro izmeša i ostavi da stoji 45 min, uz povremeno mešanje. Suspenzija MgO se filtrira pod vakuumom na Büchner-ovom levku. Sloj MgO se ispira hloroformom ili trihloretilenom (3x250 cm<sup>3</sup>). Hloroform ili trihloretilen od ispiranja se pripoji odgovarajućem filtratu i izmeri zapremina filtrata. Filtrat se ispira vodom (najbolje 4x2 dm<sup>3</sup>). Postupak je razvijen i prvi put primenjen u ovom radu.

### **2.3.4 Obrada koncentrovanog hloroformskog ili trihloretilenskog ekstrakta aluminijumom-oksidom (metod IV)**

Hloroformski ili trihloretilenski ekstrakt (izolat) se uparava pod vakuumom na 60 °C u rotacionom vakuum uparivaču do 1/2 polazne zapremine (8 dm<sup>3</sup>). U koncentrovani ekstrakt dodaje se aluminijum-oksid (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> : polazni biljni materijal 1:10 g/g), dobro izmeša i ostavi da stoji 45 min, uz povremeno mešanje. Suspenzija Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se filtrira pod vakuumom na Büchner-ovom levku. Sloj Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se ispira hloroformom ili trihloretilenom (3x250 cm<sup>3</sup>). Hloroform ili trihloretilen od ispiranja se pripoji odgovarajućem filtratu i izmeri zapremina filtrata. Filtrat se ispira vodom (4x2 dm<sup>3</sup>) i upari do suva na rotacionom vakuum-uparivaču. Ovako dobijeni suvi ekstrakti, odnosno izolati smeše sekundarnih glikozida se koriste za analizu sadržaja sekundarnih glikozida i UG u ekstraktima i za dobijanje Dgx frakcionim rastvaranjem i ekstrakcijom tečnost-tečnost. Postupak je prvi put razvijen i primenjen u ovom radu, s tim što je umesto MgO korišćen Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (stepen aktivnosti I po Brockman-ovoj skali), koji su Fonin i Kohrlin (2003) koristili za prečišćavanje etilacetatnog ekstrakta sekundarnih glikozida iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh.

### **2.3.5 Ekstrakcija rastvorom natrijum-karbonata (metod V)**

Spojani hloroformski ili trihloretilenski ekstrakt (izolat) smeše sekundarnih glikozida iz macerata ili perkolata se ispira u levku za odvajanja rastvorom 5 % rastvorom natrijum-karbonata koncentracije  $1 \text{ mol/dm}^3$  ( $1 \times 1/5$  i  $1 \times 10$  od zapremine ekstrakta) i vodom ( $1 \times 1/4$  i  $1 \times 1/5$  od zapremine ekstrakta). Rastvor od ispiranja iz levka za odvajanje se ispušta u poseban levak za odvajanje. Slojevi od ispiranja hloroformskog ili trihloretilenskog ekstrakta (izolata) rastvorom natrijum-karbonata i vodom ispiraju se sa po  $1/2$  ukupne zapremine rastvora natrijum-karbonata upotrebljenog za ispiranje ekstrakta. Hloroformski ili trihloretilenske ekstrakti (izolati) se spoje i upare do suva. Suvi ekstrakti (izolati) koriste se za analizu sadržaja sekundarnih glikozida i UG u ekstraktima (izolatima) i za dobijanje Dgx frakcionim rastvaranjem i ekstrakcijom tečnost-tečnost. Ovaj postupak je prvi put razvijen i primenjen u ovom radu primenom natrijum-karbonata za ispiranje hloroformskih ili trihloretilenskih ekstrakata vodeno-etanolnih (10 % vol.) perkolata dobijenog u ovom radu pod optimalnim uslovima, originalnom modifikacijom etilacetatnog ekstrakta sekundarnih glikozida iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. Fonin i Kohrlin-a (2003).

### **2.3.6 Ekstrakcija smešom petroletar-etilacetat 80:20 vol. (metod VI)**

Perkolat dobijen postupkom perkolacije ekstrahuje se smešom petroletar-etilacetat (80:20 vol.;  $3 \times 100 \text{ cm}^3$ ). Petroletar je p.a kvaliteta tačke ključanja  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posle svake ekstrakcije, tečna faza se odlije, a iz preostalog čvrstog dela posle treće ekstrakcije, otpari se zaostali rastvarač pod vakuumom. Dobijeni suvi ekstrakt (izolat) se rastvori u minimalnoj količini metanola uz refluks, doda  $40 \text{ cm}^3$  vrele vode i ostavi da ohladi do sobne temperature, a zatim ostavi da kristališe 48 h na  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dobijena izomorfna smeša kristalizata sekundarnih glikozida je žućkaste boje i koristi se za izolaciju Dgx. Postupak je prvi put razvijen i primenjen u ovom radu originalnom modifikacijom postupka ekstrakcije sekundarnih glikozida iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. (Đorđević i Stanković, 1977).



## **2.4 IZOLACIJA DIGOKSINA FRAKCIONIM RASTVARANJEM IZOLATA SMEŠE SEKUNDARNIH GLIKOZIDA VODENIM RASTVORIMA ACETONA**

Hloroformski ili trihloretilenski izolat smeše sekundarnih glikozida se suši na 60 °C u vakuum sušnici do vlažnosti 6 %, izmeri se njegova masa (suvi hloroformski ili trihloretilenski izolat) i odredi sadržaj Dgx. Iz suvog hloroformskog ili trihloretilenskog izolata se uklanjaju prateći glikozidi i druge supstance frakcionim rastvaranjem acetonom (odnos izolata i acetona 1:5-1:15 m/v) uz refluks na temperaturi ključanja u toku 20 min. Talog se, uz energično mešanje, suspenduje u smeši acetona i vode i odvaja filtracijom. Talog sirovog Dgx se ispira četiri puta jednakim zapreminama smešom aceton:voda uz mešanje ( odnos sirov Dgx: zapremina smeše za ispiranje 1:7 m/v). Posle svakog ispiranja, rastvor se odvaja filtracijom. Čvrsta faza se osuši u vakuumu na 80 °C i dobija se Dgx visoke čistoće, kome se odredi se sadržaj Dgx po opisanoj HPLC metodi u Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed., Metod 2.2.29, 2012.

## **2.5 IZOLACIJA DIGOKSINA DISKONTINUALNOM EKSTRAKCIJOM TEČNOST-TEČNOST IZ RASTVORA IZOLATA SMEŠE SEKUNDARNIH GLIKOZIDA**

### **2.5.1 Izdvajanje digoksina visoke čistoće iz izolata smeše sekundarnih glikozida ekstrakcijom tečnost-tečnost**

Za izdvajanje Dgx korišćena je diskontinualna istostrujna frakciona ekstrakcija sledećim četvorokomponentnim sistemima: etanol:voda:hloroform:etilacetat (EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:EtOAc); etanol:voda:hloroform:trihloretilen (EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:THE) i etanol:voda:trihloretilen:etilacetat (EtOH:H<sub>2</sub>O:THE:EtOAc) u levcima za odvajanje (10 dm<sup>3</sup>). Uravnotežavanje faza vrši se pri odnosu faza 1:1,1 vol. na sobnoj temperaturi u levku za odvajanje.

Za razdvajanje Dgx od Dx i Gx koriste se uravnotežene faze navedenih četvorokomponentnih sistema. Zapreminski sastavi dvokomponentne lake i dvokomponentne teške faze se variraju (10:40 do 40:10 vol.) u cilju definisanja optimalnih sastava faza. Različite količine (10-30 g) hloroformskog ili trihloretilenskog izolata se ubacuju u lakoj ili teškoj fazi u prvom levku za odvajanje. Za pripremu rastvora glikozida u lakoj ili teškoj fazi koriste se hloroformski ili trihlortelenski izolat. Čista laka ili teška faza se ubacuje u jednakim zapreminama u 15 levaka za odvajanje. Odnos zapremina uravnotežene lake i teške faze za ekstrakciju tečnost-tečnost u levcima za odvajanje se varira od 1:0,8 do 1:2,0 vol. Teška ili laka faza se ubacuje redom u

naredne leveke sa lakom i teškom fazom, počev od prvog levka u kome je rastvoren izolat, uz uravnotežavanje faza u narednim levcima energičnim mućkanjem (5 min). Posle odstožavanja do potpunog odvajanja faza, analizira se sadržaj Dx, Gx i Dgx u svakoj fazi u svakom levku. Za to se uzimaju alikvotni delovi zapremine faza koji posle otparavanja daju minimalno 50 mg suvog ostatka. Lake faze koje sadrže Dgx sa sadržajem tragova Dx ili Gx se spajaju i koncentruju. Spojene teške faze koje sadrže Dx i Gx sa tragovima Dgx se, takođe, spajaju i uparavaju do suva.

### **2.5.1.1 Izbor sistema rastvarača**

U ovom delu izvršen je izbor optimalnog sastava sistema EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:THE, variranjem odnosa rastvarača u ravnotežnim uslovima ekstrakcije tečnost-tečnost i na bazi eksperimentalnih podataka o raspodeli sekundarnih glikozida i UG između lake i teške faze sistema, polazeći od osnovne pretpostavke ravnotežne ekstrakcije tečnost-tečnost, da je optimalan sastav sistema i optimalan odnos lake i teške faze za izdvajanje komponenti iz rastvora smeše čvrstih supstanci, onaj sa kojim se ostvaruje najveći stepen ekstrakcije Dgx u lakoj fazi.

### **2.5.1.2 Koncentrovanje lake faze i izdvajanje kristala digoksina**

Spojene lake faze sa sadržajem Dgx se uparavaju na rotacionom vakuum uparivaču (100-200 mm Hg) do 1/20 polazne zapremine. Kristali Dgx se izdvajaju iz koncentrovanog rastvora lake faze filtracijom pod vakuumom na Büchner-ovom levku, isperu sa malo hladnog etanola i suše na 80 °C u vakuum sušnici. Destilatu spojenom sa etanolom od ispiranja iz više šarži se podešava sastav, odnosno da gustina odgovara polaznom sastavu lake faze dodavanjem komponenti lake faze. Ovako dobivena laka faza se ponovo koristi, posle uravnotežavanja sa teškom fazom u procesu razdvajanja. Dobijeni talog se vraća u proces pri uparavanju lake faze naredne šarže.

### **2.5.1.3 Uparavanje teške faze i izdvajanje smeše digitoksina i gitoksina sa pratećim**

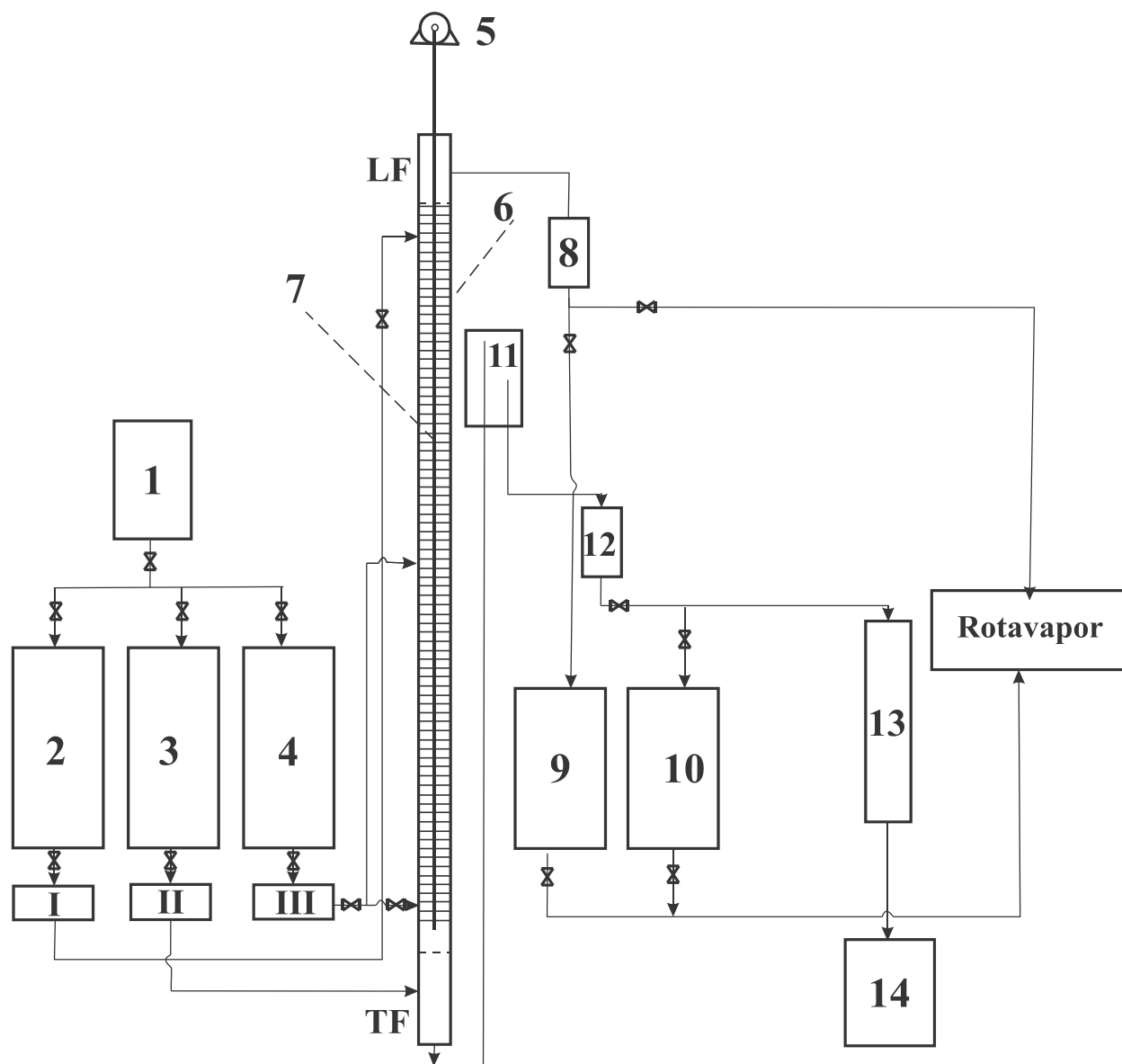
#### **materijama**

Spojene teške faze, koje sadrže Dx, Gx i druge glikozide, se uparavaju na rotacionom vakuum uparivaču (100-200 mm Hg) do suva. Destilatu se podešava sastav, odnosno gustina da gustina odgovara polaznom sastavu teške faze, koja se ponovo, posle uravnotežavanja sa lakom fazom, koristi kao teška faza u procesu razdvajanja. Suvi ostaci se sakupljaju, analiziraju i dalje koriste za razdvajanje Dx i Gx.

## **2.6 KONTINUALNA PROTIVSTRUJNA EKSTRAKCIJA TEČNOST-TEČNOST NA KARR-OVOJ EKSTRAKCIONJOJ VIBRACIONOJ KOLONI**

### **2.6.1 Opis eksperimentalnog postrojenja**

Postrojenje za protivstrujnu frakcionu ekstrakciju Dgx iz rastvora suvog hloroformskog ili trihloretilenskog ekstrakta (izolata) smeše sekundarnih glikozida iz perkolata, dobijenog pod optimalnim uslovima perkolacije, prikazano je na slici 2.1. Postrojenje uključuje Karr-ovu ekstrakcionu vibracionu kolonu, rezervoare za laku i tešku fazu, rezervoar za napojni rastvor, dozirne pumpe za laku fazu, tešku fazu i napojni rastvor suvog hloroformskog ili trihloretilenskog ekstrakta (izolata), sistem za regulaciju nivoa tečnosti u koloni, cevne vodove i destilacione uređaje za kontinualno otparavanje rastvarača iz ekstrakta lake i rafinata teške faze. Vibracionu kolonu čine staklena kolona unutrašnjeg prečnika 25 mm, visine 2 ili 4 m, i vibraciona mešalica sa perforiranim pločicama. Kolona visine 4 m se sastoji od dve kolone od 2 m spojene odgovarajućim spojnim elementima. Kolone su izrađene od vatrostalnog stakla (debljina zidova 3 mm) i imaju staklene olive (prečnik: 5 mm) na donjem i gornjem kraju, kao i na sredini. Vibracionu mešalicu čini set perforiranih pločica od teflona ili nerđajućeg čelika na zajedničkom nosaču koji se kreće gore-dole kroz kolonu. Frekvencija (do  $200 \text{ min}^{-1}$ ) i hod seta pločica (1, 1,5 i 2 cm) regulišu se preko uređaja za pokretanje seta. Vibracionu mešalicu pokreće elektromotor, a rotaciono kretanje motora pretvara se u linearno povratno-periodično kretanje seta perforiranih pločica pomoću ekscentra. Laka faza, teška faza i napojni rastvor smeše sekundarnih glikozida se transportuju iz rezervoara do kolone kroz čelične cevi pomoću klipnih pumpi (Metering Pumps Ltd., London, Velika Britanija). Laka i teška faza se uvode u kolonu na dnu i vrhu kolone, respektivno, a napojni rastvor smeša sekundarnih glikozida na sredini kolone. Rafinat i ekstrakt se hvataju u posebnim čeličnim rezervoarima ( $200 \text{ dm}^3$ ) sa vodokaznim staklom i ventilima na dnu i vrhu. Rafinat i ekstrakt se transportuje do rotacionog vakuum uparivača (Büchi) kroz teflonska creva.



**Slika 2.1** Tehnološka šema postrojenja za protivstrujnu ekstrakciju tečnost-tečnost na Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni (1-rezervoar za pripremu faza i napojnog rastvora, 2 - rezervoar za laku fazu, 3 - rezervoar za tešku fazu, 4 - rezervoar napojnog rastvora, 5 - uređaj za pokretanje vibracione mešalice, 6 – kolona, 7 - vibraciona mešalica sa perforiranim pločicama, 8 - merni sud ekstrakta, 9 - rezervoar ekstrakta u lakoj fazi, 10 - rezervoar rafinata, 11 - nivelacioni sud, 12 - merni sud rafinata, 13 - uparivač rafinata i 14 - prihvatni sud koncentrovanog rafinata).

Aparatura za destilaciju je od stakla i u njoj se koncentruje rafinat koji se dovodi iz kolone teflonskim crevom. Kroz zmiјaste cevi razmenjivača toplote se uvodi voda temperature 80-85 °C. Odozgo se uvodi rafinat koji prolazi preko površine zmiјaste cevi. Nastale pare se

kondenzuju u kondenzatoru kroz koji protiče voda za hlađenje temperature 15-20 °C. Koncentrat rafinata se kontinualno ispušta sa dna uparivača, tako da odnos koncentrata i destilata teške faze bude 1:7 do 1:10 vol.

Ekstrakt (laka faza sa sadržajem Dgx), koja izlazi na vrhu kolone, vodi se u stakleni sud za odvajanje, a zatim se ubacuje u balon (10 dm<sup>3</sup>) rotacionog vakuum uparivača (Büchi), gde se uparava do početka kristalizacije Dgx. Voda u vodenom kupatilu uparivača je zagrejana pre početka uparavanja do 80 °C. Kroz hladnjak rotacionog uparivača struji hladna voda (15-20 °C). Uređaj se priključi na vakuum (720-740 mm Hg).

Održavanje granične površine odstoynih zona između faza na visini od oko 20 cm od donjeg i gornjeg kraja kolone održava se pomoću uređaja za nivelaciju. Uređaj se sastoji od cilindričnog suda sa vodokaznim staklom u kome se nalaze dve čelične cevi koje služe za dovod i odvod rafinata. Cev za dovod rafinata je na višem nivou od cevi za odvod rafinata. Cev za dovod rafinata spojena je teflonskim crevom sa slavinom za regulaciju odvoda rafinata sa dna kolone, a cev za odvod rafinata iz suda za nivelaciju nivoa razdvajanja rafinata i ekstrakta na dnu i vrhu kolone spojena je sa prihvatnim rezervoarom, takođe, teflonskim crevom. Da bi se omogućilo merenje protoka rafinata na izlazu iz nivelacionog suda, rafinat se preko teflonskog creva, odvodi u sud za odvajanje koji je prethodno izbaždaren, a odatle dalje u prihvatni sud rafinata.

## **2.6.2 Priprema sistema rastvarača za razdvajanje i napojnog rastvora suvih ekstrakata sekundarnih glikozida**

Za razdvajanje suvih ekstrakata smeše sekundarnih glikozida usvojen je optimalni sistem rastvarača EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15:20:30 vol. definisan na osnovu eksperimentalnih ispitivanja na koloni u ovom radu. Priprema sistema za razdvajanje i napojnog rastvora suvih hloroformskih ili trihloretilenskih suvih ekstrakata (izolata) smeše sekundarnih glikozida u lakoj ili teškoj fazi vrši se u staklenom sudu (100 dm<sup>3</sup>) sa mešalicom i slavinom na dnu suda, preko odgovarajućih ventila. Sud je postavljen na nosećoj platformi postrojenja. U sud se ubacuju pojedini rastvarači koji ulaze u sastav sistema za razdvajanje, snažno mešaju dok se ne dobije kompaktna bela emulzija. Posle odvajanja, laka i teška faza, koje su zasićene jedne drugom, ubacuju se iz ovog suda u prihvatne rezervoare ispod suda.

### **2.6.3 Ravnotežna raspodela digoksina između lake i teške faze u sistemu**

**EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15: 20:30 vol.**

Ispitivanja ravnotežne raspodele D<sub>gx</sub> između lake i teške u zavisnosti od sastava smeše sekundarnih glikozida izvršena su sa sistemom EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:THE= 35:15:20:30 vol. (koji je bio optimalan za diskontinualni postupak) i pri konstantnom optimalnom odnosu lake i teške faze 1:1,1 vol. Smeša sekundarnih glikozida pripremana je mešanjem D<sub>x</sub>, G<sub>x</sub> i D<sub>gx</sub>, pri čemu je odnos D<sub>x</sub>:G<sub>x</sub> bio 2:1, 2,5:1, 2,8:1, 3:1, 3,5:1 i 4:1 g/g. Za svaku od ovih smeša D<sub>x</sub> i G<sub>x</sub> varirana je količina D<sub>gx</sub>, tako da je njegov sadržaj u smeši bio: 5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0, 50,0 i 60,0 %. Pripremljene smeše sekundarnih glikozida su ekstrahovane zasićenom smešom lake i teške faze u levcima za odvajanje. Smeša sekundarnih glikozida (200 mg) se rastvori u lakoj fazi (10 cm<sup>3</sup>), doda se teška faza zasićena lakom fazom (11cm<sup>3</sup>) i energično mućknje dok se ne dobije bela kompaktna emulzija. Posle odvajanja faza, rastvarač se otparava iz rastvora lake faze (ekstrakt), a ostatak posle otparavanja rastvarača lake faze se suši u vakuum sušnici do konstantne mase i sadržaj u njemu određuje HPLC metodom.

### **2.6.4 Definisanje optimalnih operativnih uslova rada ekstrakcione kolone**

Početna ispitivanja izvršena su sa optimalnim sistemom EtOH: H<sub>2</sub>O: CHCl<sub>3</sub>: THE = 35:15: 20:30 i optimalnim odnosom zapreminskih protoka lake i teške faze 1:1,1 vol. Ukupan protok lake faze je zbir protoka lake faze i napojnog rastvora smeše sekundarnih glikozida rastvorenih u lakoj fazi, s tim što je odnos lake i teške faze 1:1,1 vol. Polazna koncentracija rastvora suvih hloroformskih ili trihloretilenskih izolata smeše sekundarnih glikozida u lakoj ili teškoj fazi je varirana između optimalne koncentracije ekstrakta određenog za diskontinualnu ekstrakciju tečnost-tečnost od 10 g/dm<sup>3</sup> i maksimalne količine hloroformskih ili trihloretilenskih ekstrakata (izolata) koji su rastvarani u lakoj ili teškoj fazi: 10, 20, 30, 40, 45 i 50 g/dm<sup>3</sup>. Smeša napojnog rastvora hloroformskog ili trihloretilenskog suvog ekstrakta (izolata) smeše sekundarnih glikozida se uvodi na dnu kolone (rastvor izolata u lakoj fazi, vrhu (rastvor izolata u teškoj fazi) i sredini (rastvor u lakoj ili u teškoj fazi) kolone. Pri ovim polaznim uslovima izvršena su ispitivanja uticaja rastojanja između pločica (1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0 i 5,0 cm), frekvencije vibracionog kretanja (90, 100, 110, 120, 130, 150 i 200 min<sup>-1</sup>), hod seta (1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 i

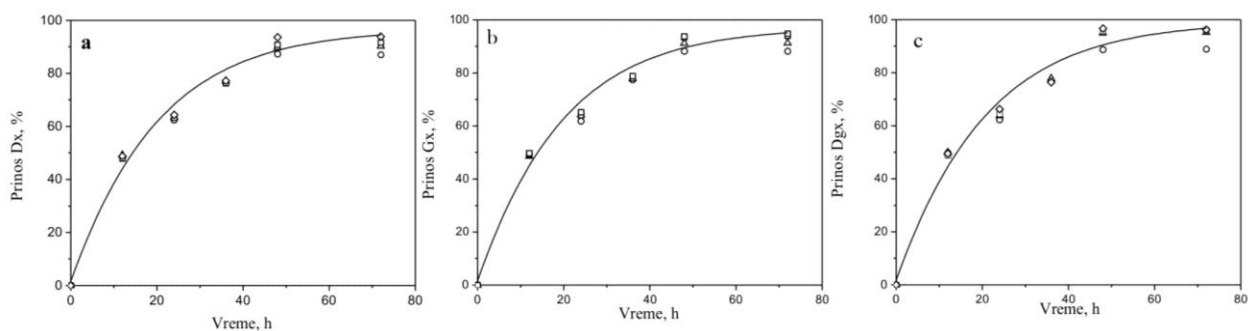
5;0 cm) na stepen ekstrakcije Dgx u lakoj ili teškoj fazi u odnosu na polazni sadržaj u napojnom rastvoru suvog izolata smeše sekundarnih glikozida.

### 3. REZULTATI I DISKUSIJA

#### 3.1 FERMENTACIJA BILJNOG MATERIJALA

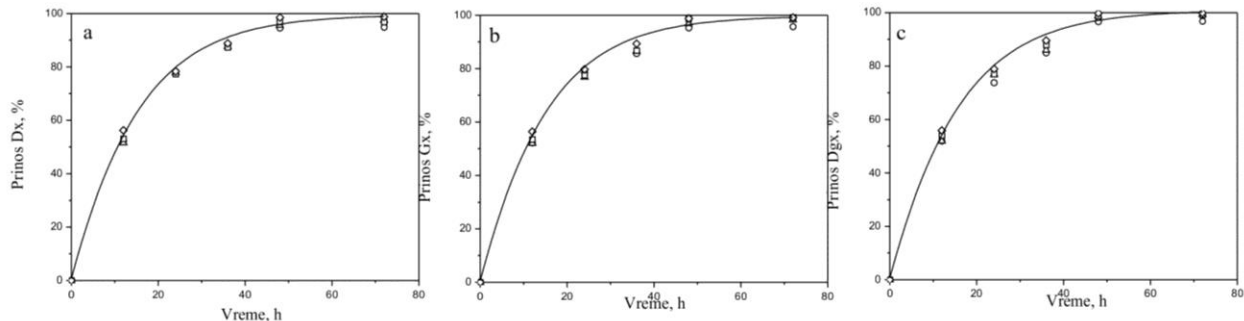
##### 3.1.1 Uticaj operativnih uslova fermentacije na prinos digitoksina, gitoksina i digoksina

Rezultati ispitivanja uticaja odnosa kvašenja biljni materijal-voda (1:1, 1:2 i 1:3 m/v) i stepena usitnjenosti ( $d_{sr} = 0,5, 2, 5$  i  $7$  mm) na enzimsku hidrolizu LA, LB i LC do Dx, Gx i Dgx u toku fermentacije biljnog materijala (lišće *Digitalis lanata* Ehrh.) na  $37$  °C prikazani su na slikama 3.1, 3.2 i 3.3. Maksimalni prinosi Dx, Gx i Dgx kreću se u granicama 89-100 % (u odnosu na polazni sadržaj u fermentisanom biljnom materijalu), nezavisno od odnosa kvašenja biljni materijal-voda i stepena usitnjenosti. Najveći prinos Dgx (skoro 100 %) ostvaruje se sa najkrupnijim biljnim materijalom ( $d_{sr} = 7$  mm) posle 48 h pri odnosu kvašenja biljni materijal-voda 1:2 m/v (slika 3.2c). Na osnovu dobijenih rezultata, usvojeno je da su optimalni uslovi fermentacije: odnos kvašenja biljni materijal-voda 1:2 m/v, stepen usitnjenosti  $d_{sr} = 7$  mm i vreme trajanja fermentacije 48 h. Ovi uslovi su korišćeni za fermentaciju biljnog materijala u daljim ispitivanjima izolacije Dgx.

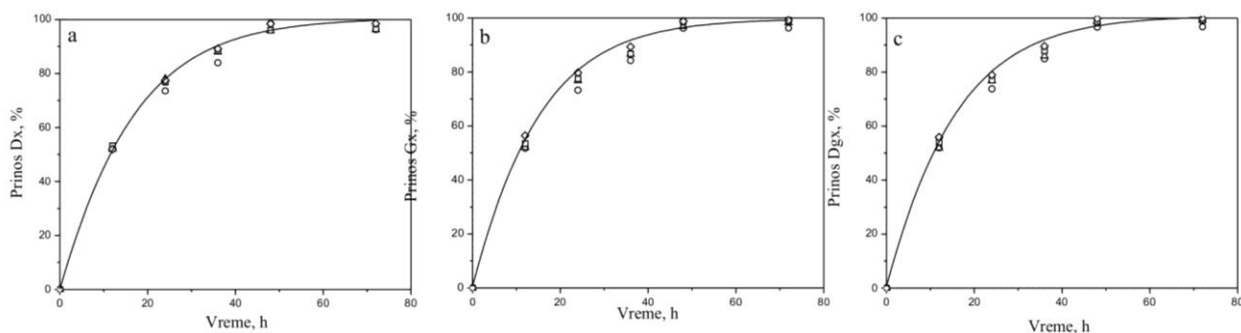


**Slika 3.1** Promena prinosa a) Dx, b) Gx i c) Dgx (% u odnosu na suvi fermentisani biljni materijal) u toku fermentacije biljnog materijala pri odnosu odnos kvašenja biljni materijal-voda 1:1 m/v na  $37$  °C (srednji prečnik čestica samlevenog biljnog materijala, mm: 0,5 - ○, 2 - △, 5 - □ i 7 - ◇)





**Slika 3.2** Promena prinosa a) Dx, b) Gxi c) Dgx (% u odnosu na suvi fermentisani biljni materijal) u toku fermentacije biljnog materijala pri odnosu odnosa kvašenja biljni materijal–voda 1:2 m/v na 37 °C (srednji prečnik čestica samlevenog biljnog materijala, mm: 0,5 -○, 2 - Δ, 5 - □ i 7 - ◇)



**Slika 3.3** Promena prinosa a) Dx, b) Gxi c) Dgx (% u odnosu na suvi fermentisani biljni materijal) u toku fermentacije biljnog materijala pri odnosu kvašenja biljni materijal–voda 1:3 m/v na 37 °C (srednji prečnik čestica samlevenog biljnog materijala, mm: 0,5 -○, 2 - Δ, 5 - □ i 7 - ◇)

## 3.2 EKSTRAKCIJA SEKUNDARNIH GLIKOZIDA I UKUPNIH GLIKOZIDA IZ FERMENTISANOG BILJNOG MATERIJALA

### 3.2.1 Ekstrakcija sekundarnih glikozida i ukupnih glikozida maceracijom

Vrednosti stepena ekstrakcije sekundarnih glikozida i UG rastvorima etanola (10 i 50 % vol.) postupkom maceracije pri odnosu fermentisani materijal–rastvarač 1:10 g/cm<sup>3</sup> na sobnoj temperaturi (vreme ekstrakcije: 3x1 h; srednji prečnik biljnih čestica: 7 mm) prikazane su u tabeli 3.1. Oba rastvora etanola osiguravaju visok stepen ekstrakcije sekundarnih glikozida i UG (preko 96 %), s tim što se nešto veće vrednosti ostvaruju su koncentrovanim rastvorom etanola.

**Tabela 3.1** Stepen ekstrakcije Dx, Gx, Dgx i UG iz fermentisanog biljnog materijala rastvorima etanola (10 i 50 % vol.), ostvareni maceracijom i perkolacijom na sobnoj temperaturi (srednji prečnik čestica biljnog materijala: 7 mm)

Glikozid <sup>a</sup>	Stepen ekstrakcije (%) <sup>b</sup>			
	Maceracija <sup>c</sup>		Perkolacija <sup>d</sup>	
	10 % vol.	50 % vol.	10 % vol.	50 % vol.
Dx	96,0	98,0	97,5	98,5
Gx	95,0	96,0	97,0	97,5
Dgx	97,0	98,0	98,5	99,5
UG	101,0	102,0	101,5	102,5

<sup>a</sup> Dx - digitoksin, Gx - gitoksin, Dgx - digoksin i UG - ukupni glikozidi. <sup>b</sup> relativno u odnosu na sadržaj u fermentisanom biljnom materijalu; <sup>c</sup> odnos fermentisanibiljni materijal-rastvarač 1:10 g/cm<sup>3</sup>; vreme ekstrakcije 3x1 h; <sup>d</sup> 10 % vol. rastvor etanola; visina punjenja 30 cm i vreme zadržavanja rastvarača 4 h.

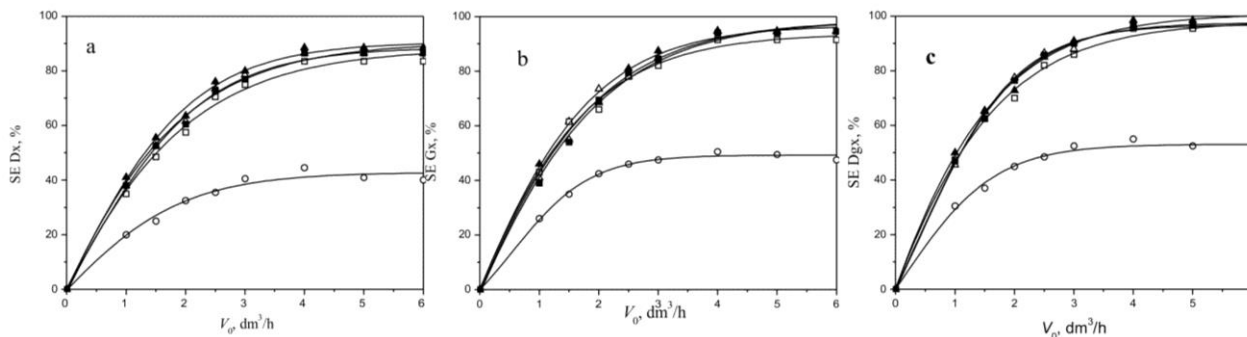
### 3.2.2 Ekstrakcija sekundarnih i ukupnih glikozida perkolacijom

Očekuje se da stepen ekstrakcije sekundarnih glikozida i UG prinos suvih ekstraktivnih materija (SEM) zavise od operativnih uslova perkolacije: protoka rastvarača (odnosno vremena zadžavanja perkolata u pekolatoru), visine punjenja perkolatora fermentisanim biljnim materijalom, zapremine perkolata, vrste rastvarača (voda i rastvori metanola i etanola koncentracije 10 i 50 % vol.) i stepena usitnjenosti biljnog materijala. Uticaj operativnih uslova perkolacije na stepen ekstrakcije sekundarnih glikozida i UG, prinos SEM iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. nije do sada ispitivan.

#### 3.2.2.1 Uticaj protoka rastvarača na stepen stepen ekstrakcije digitoksina, gitoksina i digoksina

Slika 3.4 prikazuje promenu stepena ekstrakcije Dx, Gx i Dgx sa povećanjem zapreminskog protoka rastvarača pri visini punjenja perkolatora 30 cm i vremenu zadržavanja rastvarača 4 h. Maksimalne vrednosti stepena ekstrakcije Dx, Gx i Dgx sa svim korišćenim rastvaračima (slika 3.4a, b i c, respektivno) ostvaruju se pri protoku rastvarača 4 dm<sup>3</sup>/h. Kao što se može videti iz tabele 3.2, najveći stepen ekstrakcije Dgx (98,7 %), ostvaruje sa 50 % vol. rastvorom metanola, a nešto manji stepen ekstrakcije (97,0 %) sa rastvorima etanola koncentracije 10 i 50 % vol. Pošto je etanol manje toksičan od metanola, a rad sa razblaženijim rastvorom ekonomičniji, to je

rastvor etanola koncentracije 10 % vol. izabran kao rastvarač za ekstrakciju sekundarnih glikozida iz fermentisanog biljnog materijala perkolacijom. U daljim istraživanjima je primenjen protok rastvarača od 4 dm<sup>3</sup>/h.



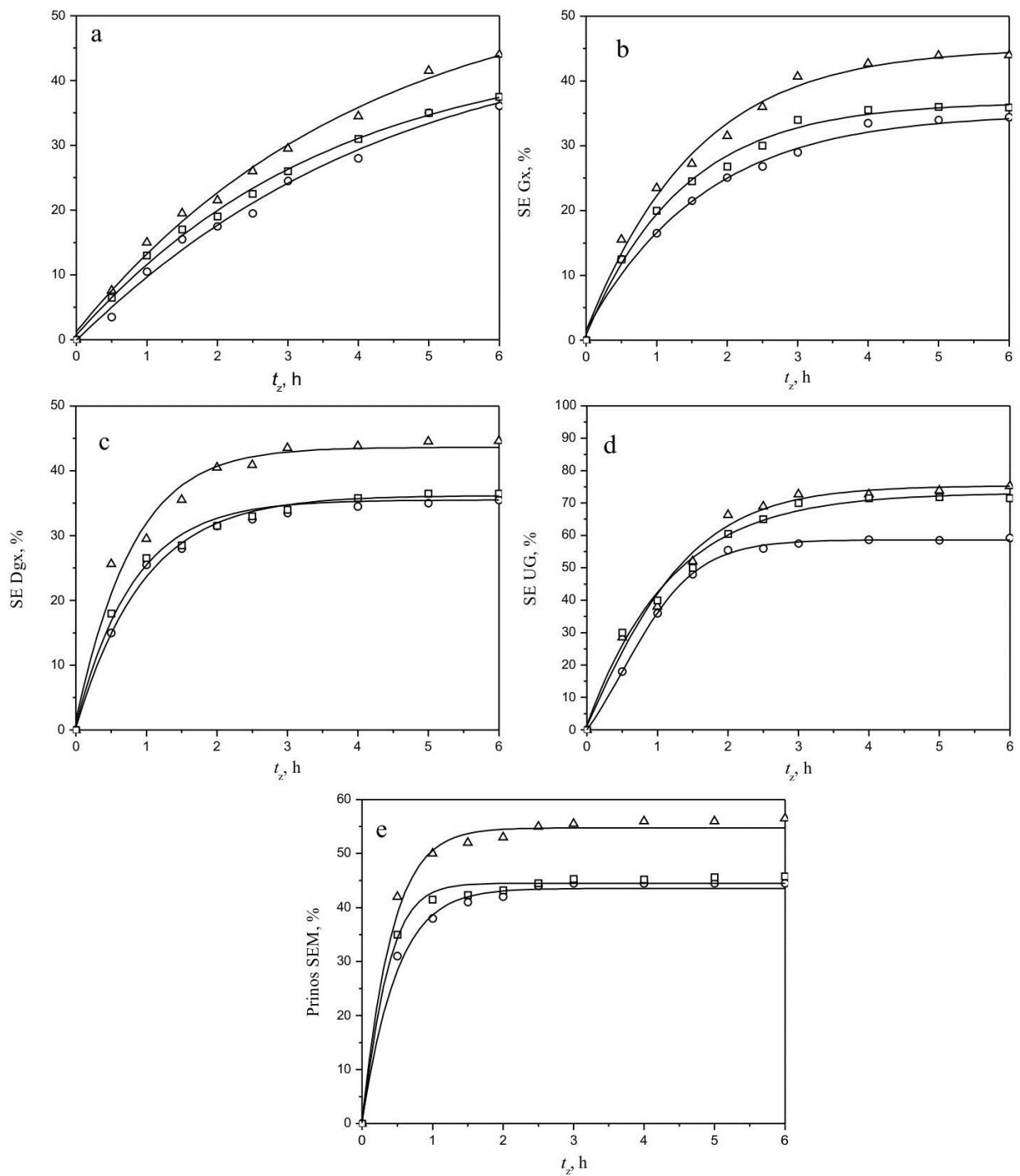
**Slika 3.4** Zavisnost stepena ekstrakcije a) Dx, b) Gx i c) Dgx od protoka rastvarača pri visini punjenja perkolatora 30 cm i vremenu zadržavanja rastvarača u perkolatoru 4 h na sobnoj temperaturi (rastvarač: voda - ○; metanol, 10 % vol. - Δ, metanol, 50 % vol. - ▲, etanol, 10 % vol. - □, etanol, 50 % vol. - ■; usitnjenost biljne sirovine: 7 mm)

**Tabela 3.2** Stepen ekstrakcije Dx, Gx i Dgx iz fermentisanog biljnog materijala vodom i rastvorima metanola i etanola (10 i 50 % vol.), ostvareni i perkolacijom na sobnoj temperaturi (srednji prečnik čestica biljnog materijala: 7 mm)

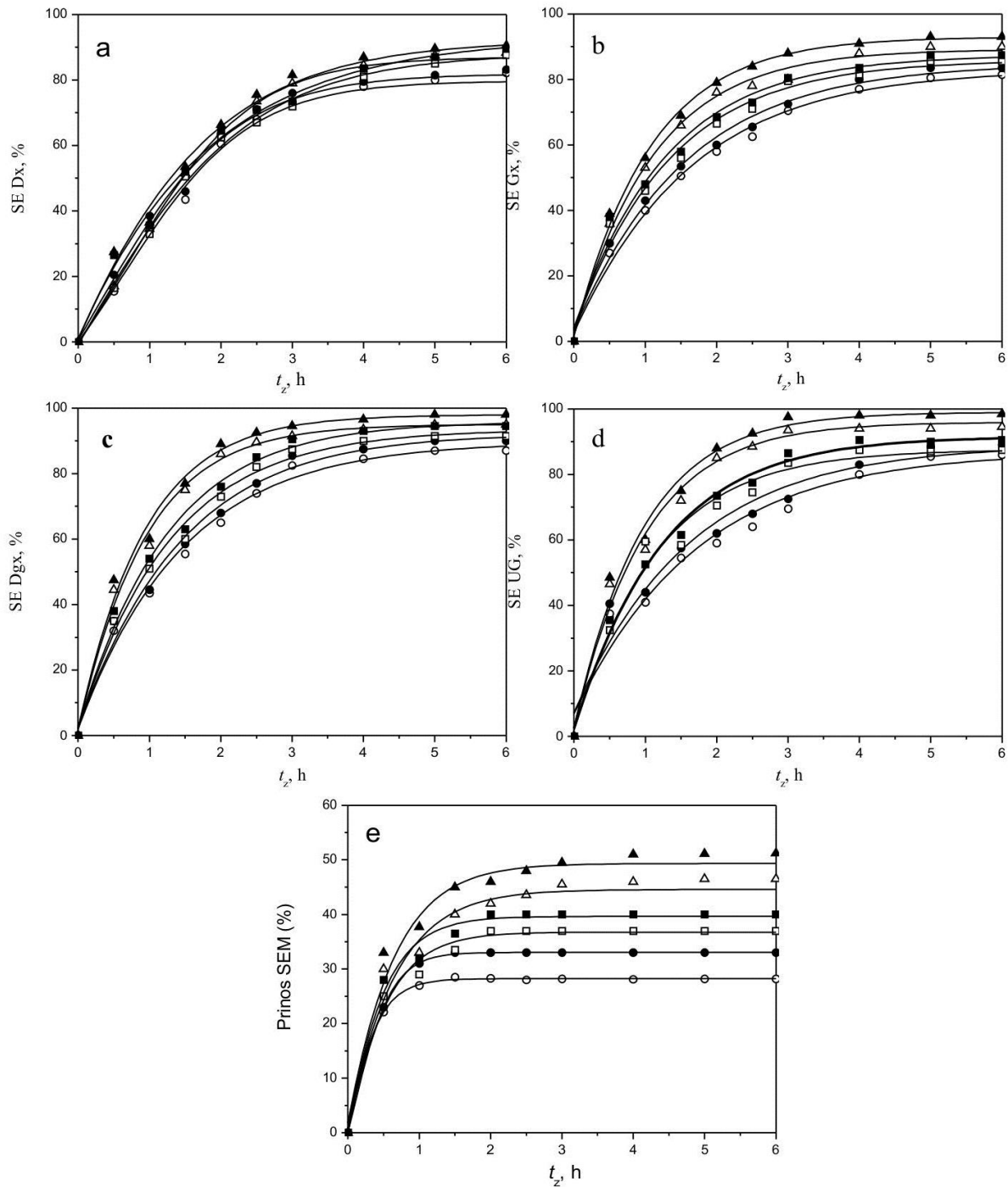
Rastvarač	Koncentracija (% vol.)	Dx	Gx	Dgx
Voda	-	44,5	50,5	55,0
Rastvor metanola	10	91,5	94,8	96,5
	50	94,5	96,0	98,7
Rastvor etanola	10	93,5	94,0	97,0
	50	92,3	90,0	97,0

### 3.2.2.2 Uticaj visine punjenja perkolatora na efikasnost perkolacije vodom

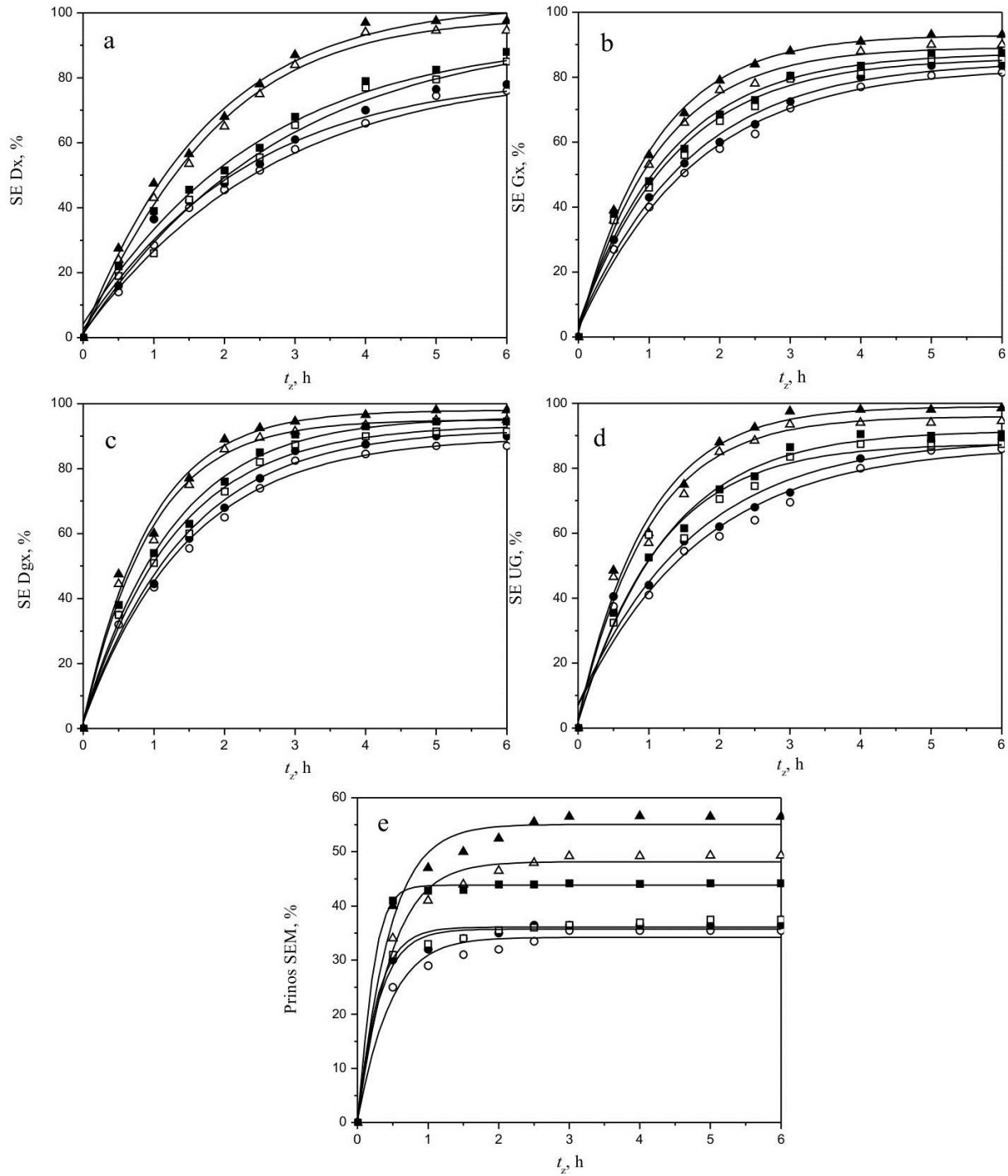
Slike 3.5, 3.6 i 3.7 pokazuju zavisnosti stepena ekstrakcije sekundarnih glikozida i UG i prinosa SEM, koji se postižu perkolacijom vodom, rastvorima metanola i rastvorima etanola, respektivno od vremena zadržavanja rastvarača pri različitim visinama punjenja perkolatora (20, 30 i 45 cm), protoku rastvarača 4 dm<sup>3</sup>/h i srednjem prečniku biljnih čestica 7 mm. Nezavisno od visine punjenja perkolatora i vrste rastvarača, stepen ekstrakcije Dx vodom povećava se sa povećanjem



**Slika 3.5** Uticaj vremena zadržavanja rastvarača i visine punjenja perkolatora fermentisanim biljnim materijalom na stepen ekstrakcije Dgx (a), Dx (b), Gx (c) UG (d) i prinos SEM (e) ekstrakcijom sa vodom pri protoku rastvarača  $4 \text{ dm}^3/\text{h}$  (visina punjenja, cm: 20 -  $\circ$ , 35 -  $\Delta$  i 45 -  $\square$ ; usitnjenost biljne sirovine: 7 mm)



**Slika 3.6** Uticaj vremena zadržavanja rastvarača i visine punjenja perkolatora fermentisanim biljnim materijalom na stepen ekstrakcije Dgx (a), Dx (b), Gx (c), UG (d) i prinos SEM (e) ekstrakcijom sa rastvorima metanola (10 i 50 % vol.) pri protoku rastvarača 4 dm<sup>3</sup>/h (visina punjenja, cm: 20 - ○, ●, 35 - △, ▲ i 45 - □, ■; rastvor metanola, % vol.: 10 - ○, △, □ i 50 - ●, ▲, ■; srednji prečnik čestica, mm: usitnjenost biljne sirovine: 7 mm)



**Slika 3.7** Uticaj vremena zadržavanja rastvarača i visine punjenja perkolatora fermentisanim biljnim materijalom na stepen ekstrakcije Dgx (a), Dx (b), Gx (c), UG (d) i prinos SEM (e) ekstrakcijom sa rastvorima etanola (10 i 50 %vol.) pri protoku rastvarača  $4 \text{ dm}^3/\text{h}$  (visina punjenja, cm: 20 -  $\circ$ ,  $\bullet$ , 35 -  $\Delta$ ,  $\blacktriangle$  i 45 -  $\square$ ,  $\blacksquare$ ; rastvor metanola, % vol.: 10 -  $\circ$ ,  $\Delta$ ,  $\square$  i 50 -  $\bullet$ ,  $\blacktriangle$ ,  $\blacksquare$ ; srednji prečnik čestica, mm: usitnjenost biljne sirovine: 7 mm)

vremena zadržavanja rastvarača do 6 h (slika 3.5a, 3.6a i 3.7a), dok se stepeni ekstrakcije Gx, Dgx i UG povećavaju sa povećanjem vremena zadržavanja rastvarača do 4 h, kada dostižu maksimalne vrednosti, koje se ne menjaju sa daljim povećanjem vremena zadržavanja rastvarača (slika 3.5b, c i d, respektivno). Slične promene se uočavaju sa rastvorima metanola (slika 3.6b, c i d) i rastvorima etanola (slika 3.7b, c i d). Drugačije ponašanje Dx je posledica njegove manje rastvorljivosti u vodi u odnosu na Gx i Dgx. Prinos SEM se povećava sa povećanjem vremena zadržavanja rastvarača, dostiže maksimalnu vrednost, posle čega ostaje nepromenjen (slika 3.5e, 3.6e i 3.7e). Tabela 3.3 sadrži podatke o maksimalnim vrednostima stepena ekstrakcije sekundarnih glikozida i UG i prinosa SEM koji se postižu vodom i rastvorima metanola i etanola.

**Tabela 3.3** Maksimalne vrednostima stepena ekstrakcije sekundarnih glikozida i prinosa SEM koji se postižu vodom i rastvorima metanola i etanola (visina punjenja perkolatora 30 cm i srednji prečnik čestica biljnog materijala 7 mm; vreme zadržavanja: 4h )

Rastvarač	Stepen ekstrakcije, %				Prinos SEM (%)
	Dx	Gx	Dgx	Ukupni glikozidi	
Voda	45,0	50,7	53,5	42,7	55,5
Rastvor metanola, 10% vol.	92,5	92,5	94,5	93,5	51,5
Rastvor metanola, 50 % vol.	97,0	95,5	95,5	97,0	54,5
Rastvor metanola, 10 % vol.	89,9	94,5	96,5	97,0	43,0
Rastvor metanola, 50 % vol	98,5	98,0	98,0	98,0	47,0

Visina punjenja perkolatora fermentisanim biljnim materijalom utiče na efikasnost perkolacije vodom. Sa povećanjem visine punjenja perkolatora od 20 do 45 cm, pri datom vremenu zadržavanja rastvarača, stepen ekstrakcije sekundarnih i UG i prinos SEM postiže najveću vrednost pri visini punjenja od 30 cm. Stepen ekstrakcije sekundarnih glikozida, kao i prinos SEM, približno je isti za punjenja visine 20 i 45 cm, dok je stepen ekstrakcije ukupnih glikozida za oko 11-12 % veći za punjenje visine 45 cm nego za punjenje visine 20 cm. Porast stepena ekstrakcije sekundarnih i ukupnih glikozida i prinosa suvih ekstraktivnih materija sa povećanjem visine punjenja u perkolatoru od 20 do 30 cm je rezultat povećanja mase fermentisanog biljnog materijala. Smanjenje stepena ekstrakcije sekundarnih i ukupnih glikozida i prinosa suvih ekstraktivnih materija sa daljim

povećanjem visine punjenja (45 cm), uprkos povećanju mase fermentisanog biljnog materijala, rezultat je verovatno slabijeg bubrenja pri većem sabijanju biljnog materijala i boljeg rastvaranja pratećih materija od sekundarnih glikozida. Moguća je, takođe, preraspodela ekstrahovanih materija između perkolata i čestica biljnog materijala od ulaza do izlaza iz perkolatora.

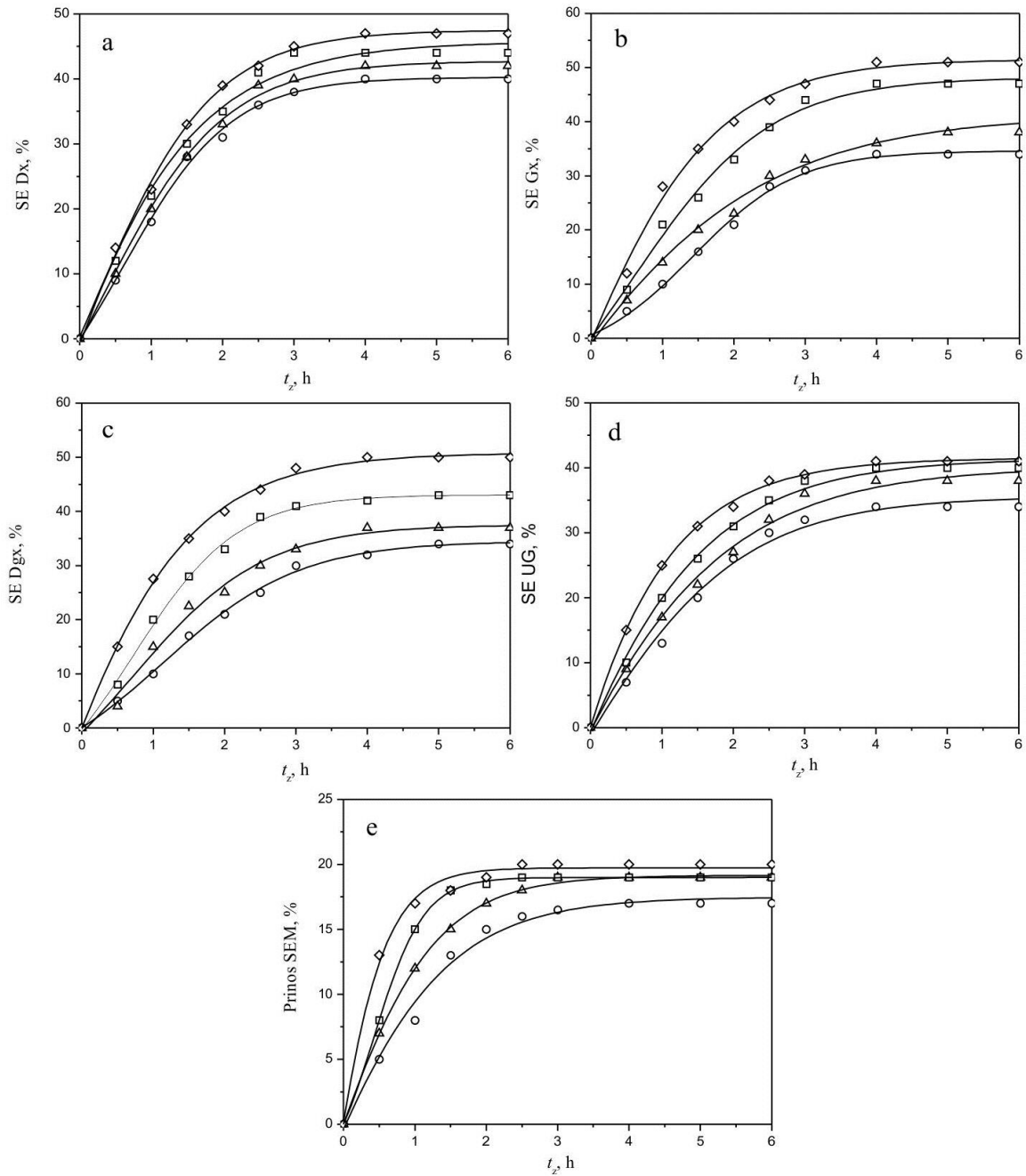
S obzirom da su stepeni ekstrakcije sekundarnih glikozida i UG perkolacijom sa 10 % vol. rastvorima metanola i etanola manji za samo 2-3 % u odnosu na perkolaciju sa 50 % vol. rastvorima metanola i etanola, ali sa boljom selektivnošću ekstrakcije glikozida zbog manjeg prinosa suvih ekstraktivnih materija, 10 % vol. rastvori se mogu preporučiti kao rastvarači za ekstrakciju sekundarnih glikozida iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. perkolacijom. Između dva alkohola, etanol je manje toksičan od metanola, ali je njegov rastvor nešto slabije efikasan rastvarač sekundarnih glikozida od rastvora metanola iste koncentracije.

Maksimalni prinos Dgx 10 % vol. rastvorom etanola pri visini punjenja 30 cm postiže se za vreme zadržavanja 4 h, pa je ono izabrano kao optimalno za perkolaciju. Pri optimalnim operativnim uslovima (10 % vol. rastvor etanola, visina punjenja 30 cm i vreme zadržavanja rastvarača 4 h), vrednosti stepena ekstrakcije Dx, Gx, Dgx i UG iznose 94, 88,0 93,5 i 94,5 %, respektivno, dok je prinos SEM 49 %. Ovi optimalni uslovi su korišćeni za dalju optimizaciju ekstrakcije sekundarnih glikozida perkolacijom.

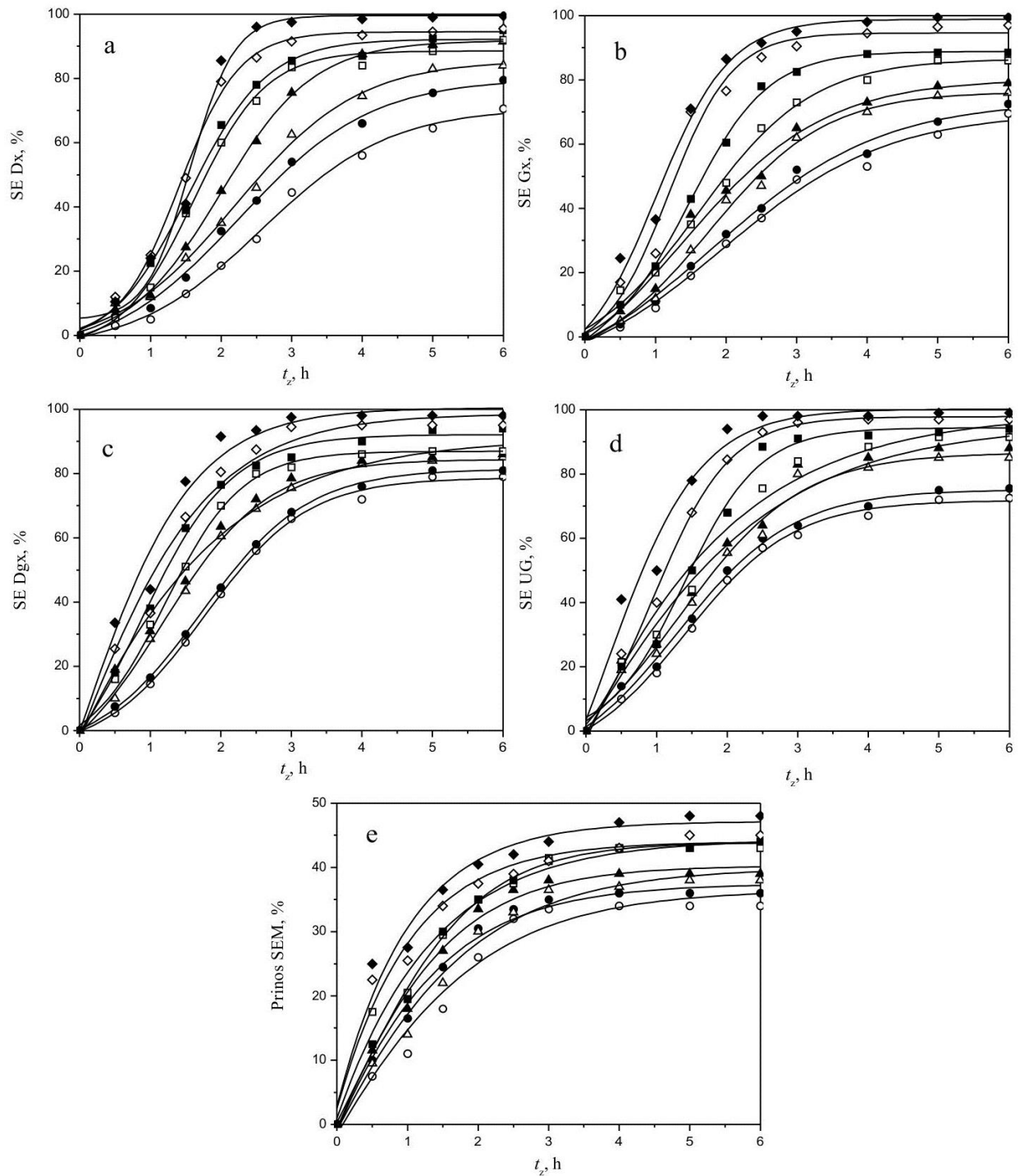
### **3.2.2.3 Uticaj stepena usitnjenosti biljnog materijala na efikasnost perkolacije**

Slike 3.8, 3.9 i 3.10 pokazuju promenu stepena ekstrakcije sekundarnih glikozida, UG i prinosa, SEM koji se postižu perkolacijom vodom, rastvorima metanola i rastvorima etanola, respektivno, od vremena zadržavanja rastvarača pri različitom stepenu usitnjenosti biljnog materijala (srednji prečnik biljnih čestica: 0,5, 2, 5 i 7 mm) pri visini punjenja perkolatora 30 cm i protoku rastvarača 4 dm<sup>3</sup>/h. I vreme zadržavanja rastvarača i stepen usitnjenosti biljnog materijala utiču na stepene ekstrakcije sekundarnih i ukupnih glikozida i prinos suvih ekstraktivnih materija. Svi parametri ekstrakcije se brzo povećavaju sa povećanjem vremena zadržavanja rastvarača, dostižu maksimalnu vrednost pri vremenu zadržavanja od oko 4h, a zatim ostaju nepromenjeni.

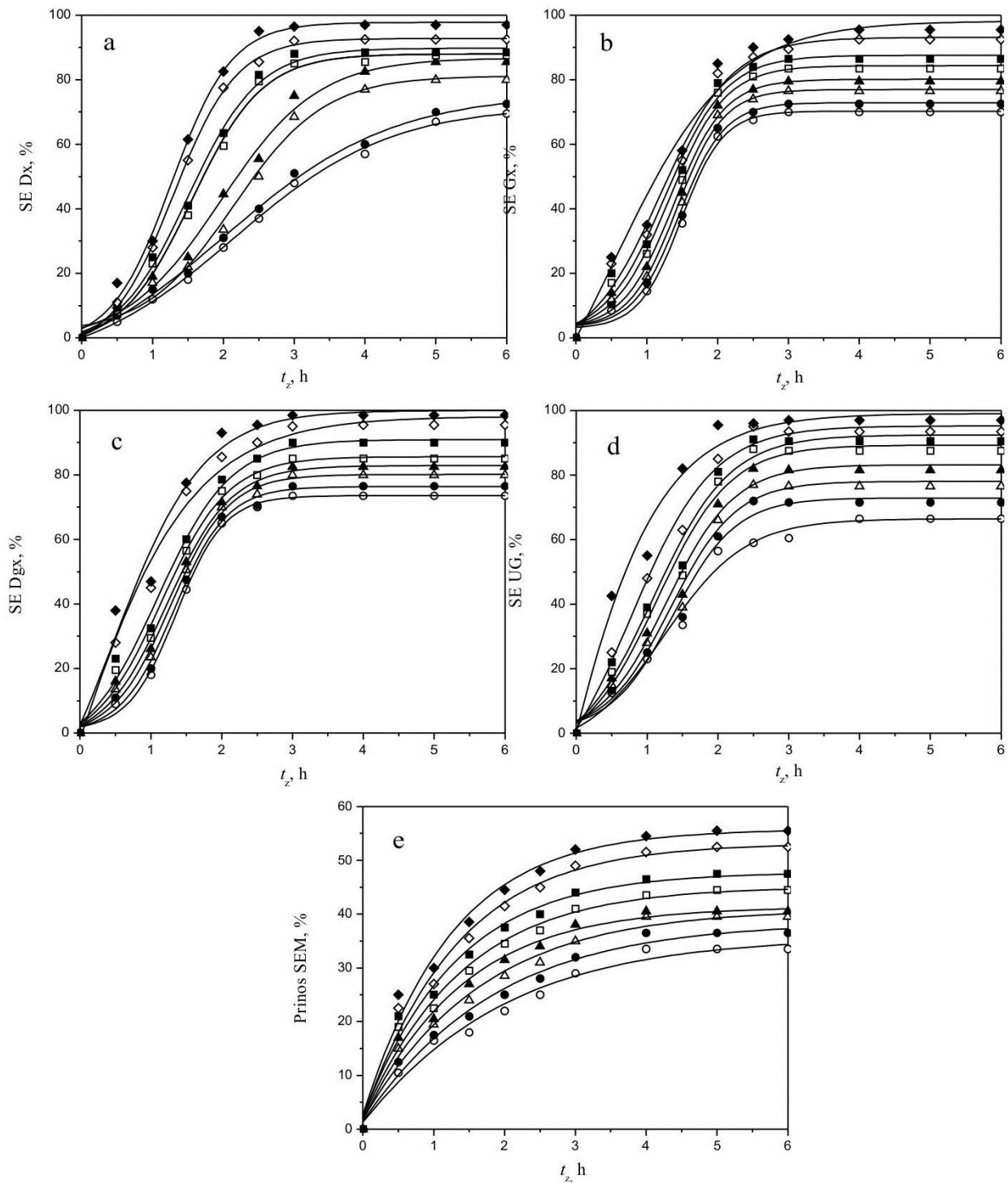




**Slika 3.8** Uticaj vremena zadržavanja rastvarača i stepena usitnjenosti biljnog materijala na stepen ekstrakcije Dgx (a), Dx (b), Gx (c), UG (d) i prinos SEM (e) ekstrakcijom sa vodom pri protoku rastvarača 4 dm<sup>3</sup>/h (visina punjenja perkolatora 30 cm; (srednji prečnik čestica samlevenog biljnog materijala, mm: 0,5 -○, 2 - Δ, 5 - □ i 7 - ◇))



**Slika 3.9** Uticaj vremena zadržavanja rastvarača i stepena usitnjenosti biljnog materijala na stepen ekstrakcije Dgx (a), Dx (b), Gx (c), UG (d) i prinos SEM (e) ekstrakcijom sa rastvorima metanola (10 i 50 % vol.) pri protoku rastvarača  $4 \text{ dm}^3/\text{h}$  (visina punjenja perkolatora 30 cm; usitnjenost biljne sirovine: mm: 0,5 -  $\circ$ ,  $\bullet$ , 2 -  $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ , 5 -  $\square$ ,  $\blacksquare$  i 7 -  $\diamond$ ,  $\blacklozenge$ ; rastvor metanola, % vol.: 10 -  $\circ$ ,  $\Delta$ ,  $\square$ ,  $\diamond$  i 50 -  $\bullet$ ,  $\blacktriangle$ ,  $\blacksquare$ ,  $\blacklozenge$ )



**Slika 3.10** Uticaj vremena zadržavanja rastvarača i stepena usitnjenosti biljnog materijala na stepen ekstrakcije Dgx (a), Dx (b), Gx (c), UG, (d) i prinos SEM (e) ekstrakcijom sa rastvorima etanola (10 i 50 % vol) pri protoku rastvarača  $4 \text{ dm}^3/\text{h}$  (visina punjenja perkolatora 30 cm; usitnjenost biljne sirovine: mm: 0,5 - ○, ●, 2 - △, ▲, 5 - □, ■ i 7 - ◇, ◆; rastvor etanola, % vol.: 10 - ○, △, □, ◇ i 50 - ●, ▲, ■, ◆)

Visina punjenja perkolatora 30 cm i protoku rastvarača 4 dm<sup>3</sup>/h. I vreme zadržavanja rastvarača i stepen usitnjenosti biljnog materijala utiču na stepene ekstrakcije sekundarnih glikozida i UG i prinos SEM. Svi parametri ekstrakcije se brzo povećavaju sa povećanjem vremena zadržavanja rastvarača, dostižu maksimalnu vrednost pri vremenu zadržavanja od oko 4 h, a zatim ostaju nepromenjeni. Maksimalne vrednosti stepena ekstrakcije sekundarnih glikozida i UG i prinosa SEM postižu se sa najkрупnijim biljnim materijalom (srednji prečnik čestica 7 mm). Nešto veće vrednosti stepena ekstrakcije sekundarnih glikozida i UG i prinosa SEM postižu se koncentrovanijim rastvorom (50 % vol.) metanola i etanola, pri čemu je prvi rastvarač malo efikasniji od drugog.

Sa većim stepenom usitnjenosti biljnog materijala, zbog većeg stepena razorenosti ćelija biljnog materijala i veće kontaktne površine, ekstraktivne materije se brže ekstrahuju, kao što je slučaj kod maceracije. Međutim, procesi maceracije i perkolacije se principijelno razlikuju. U procesu maceracije ekstraktivne materije se prenose sa površine biljnih čestica u rastvarač gde ostaju kao ekstrakt. U slučaju perkolacije, ekstrahovane materije, posle rastvaranja u rastvaraču, kreću se kroz sloj biljnog materijala do izlaza iz perkolatora. Na tom putu može doći do preraspodele ekstraktivnih materija između ekstrakta i biljnog materijala.

Saglasno dobijenim rezultatima ispitivanja uticaja stepena usitnjenosti biljnog materijala na stepen ekstrakcije sekundarnih glikozida i UG i prinos SEM, najkрупnija frakcija biljnog materijala, sa srednjim prečnikom čestica 7 mm, odabrana je kao optimalna za perkolaciju fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. Maksimalne vrednosti stepena ekstrakcije sekundarnih glikozida i UG rastvorima etanola su veći od 95 % (tabela 3.3). Zbog neznatno manjeg stepena ekstrakcije sekundarnih glikozida (1-2 %), znatno manje toksičnosti i manje potrošnje etanola (u odnosu na 50 % vol. rastvor etanola), rastvor etanola koncentracije 10 % vol. je odabran kao najpogodniji za ekstrakciju sekundarnih glikozida iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. perkolacijom.

Korišćene metode ekstrakcije – maceracija i perkolacija – imaju svoje specifičnosti. Perkolacija zahteva primenu 10 perkolatora, dok se maceracija ponavlja tri puta. Obe metode, uz korišćenje rastvora etanola koncentracije 10 % vol. kao rastvarača, mogu se koristiti za dobijanje sekundarnih glikozida iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh., ali se prednost daje perkolaciji zbog kontinualnog i jednostavnog izvođenja.

### 3.3 PREČIŠĆAVANJE EKSTRAKATA FERMENTISANOG LIŠĆA *Digitalis lanata*

**Ehrh.**

Zbog veoma sličnih struktura Dx, Gx i Dgx se izdvajaju iz ekstrakta fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. uglavnom u obliku njihove izomorfne smeše koja sadrži i druge ekstrahovane materije. Prateće ekstraktivne materije otežavaju izolaciju smeše ili pojedinačnih sekundarnih glikozida iz macerata ili perkolata. Da bi se dobili izolati ili kristalizati sekundarnih glikozida, neophodno je prethodno ukloniti veći deo pratećih ekstraktivnih materija iz ekstrakta fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. Različite metode se mogu koristiti za prečišćavanje ekstrakta (macerata ili perkolata), ali se njima dobijaju izolati različitog sastava. Radi izbora optimalne metode, šest metoda je primenjeno za prečišćavanje ekstrakta fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. od kojih se neke poznate iz literature, s tim što su modifikovane (metode I, V i VI), dok su ostale razvijene u okviru ovog doktorskog rada (metode II, III i IV). Kriterijum za izbor najbolje metode prečišćavanja ekstrakta je bio sadržaj Dgx u izolatu ili kristalizatu. Prethodno su glikozidi ekstrahovani iz ekstrakta (macerata ili perkolata) hloroformom ili trihloretilenom.

Ekstrakcija glikozida iz tečnog vodeno-etanolnog ekstrakta fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. izvršena je hloroformom ili trihloretilenom u četiri ciklusa ( $1 \times 1:2 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$  i  $3 \times 1:4 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ ; 20 min po ciklusu). Vrednosti stepena ekstrakcije sekundarnih i ukupnih glikozida su date u tabeli 3.4 Najveće vrednosti stepena ekstrakcije pojedinačnih sekundarnih glikozida iz macerata, odnosno perkolata iznose 95-96 %, odnosno 93-94 %, dok su najveće vrednosti stepena ekstrakcije UG 99 % iz macerata i 102 % iz perkolata.

Rezultati primene šest različitih metoda prečišćavanja pokazuju da su dobijeni izolati smeše sekundarnih glikozida razlikuju po sadržaju pojedinih sekundarnih glikozida i UG, kao što se može zaključiti iz podataka prikazanih u tabeli 3.5. Sastav izolata zavisi, takođe, i od vrste rastvarača koji je korišćen za ekstrakciju iz ekstrakta fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh., pri čemu trihloretilenski ekstrakt ima veće sadržaje sekundarnih glikozida i UG u odnosu na hloroformski ekstrakt. Osim toga, trihloretilen je selektivniji rastvarač za ekstrakciju sekundarnih glikozida iz etanolnih ekstrakata. Prema tome, trihloretilen je bolji rastvarač za ekstrakciju sekundarnih glikozida iz tečnih ekstrakata (macerata i perkolata) od hloroforma.

**Tabela 3.4** Stepen ekstrakcije sekundarnih glikozida i UG ostvaren ekstrakcijom hloroformom i trihloretilenom iz macerata i perkolata dobijenih sa 10 % vol. rastvorom etanola pod optimalnim uslovima

Tip ekstrakta	Ekstrakcioni ciklus	Stepen ekstrakcije (%)							
		Hloroformski ekstrakt				Trihloretilenski ekstrakt			
		Dx <sup>b</sup>	Gx	Dgx	UG	Dx	Gx	Dgx	UG
Macerat	1	72	75	80	83	75	82	83	90
	2	86	84	86	88	92	89	87	92
	3	89	88	90	92	90	90	91	95
	4	93	93	94	96	94	95	95	100
Perkolat	1	84	79	84	86	83	86	85	91
	2	87	86	88	90	88	90	90	93
	3	90	91	92	96	92	92	93	98
	4	95	96	96	99	100	100	100	102

<sup>a</sup> Dx - digitoksin, Gx - gitoksin i Dgx - digoksin; UG - ukupni glikozidi.

**Tabela 3.5** Sadržaj sekundarnih i ukupnih u suvim hloroformskim i trihloretilenskim ekstraktima

Glikozid <sup>a</sup>	Sadržaj glikozida <sup>b,c</sup> (%)											
	Hloroformski ekstrakt						Trihloretilenski ekstrakt					
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
Dx	22,5	24,0	23,0	26,5	28,5	27,5	35,2	30,5	38,5	39,0	37,5	38,0
Gx	5,5	6,0	7,0	7,5	8,5	7,0	10,6	11,5	10,5	12,0	10,5	9,5
Dgx	27,0	28,5	26,5	29,0	28,0	26,5	40,2	41,5	42,0	50,0	43,0	44,0
UG	60,0	60,5	62,0	64,0	66,0	65,5	95,0	92,0	99,0	102,0	100,0	99,5

<sup>a</sup> Dx - digitoksin; Gx - gitoksin; Dgx - digoksin; UG - ukupni glikozidi. <sup>b</sup> Relativno u odnosu na suhu masu ekstrakta. <sup>c</sup> Metode: I - obrada baznim olovo acetatom; II - ekstrakcija hloroformom ili trihloretilenom; III - obrada magnezijumoksidom; IV - obrada aluminijum(III)-oksidom; V - ekstrakcija rastvorom natrijum-karbonata; VI - ekstrakcija smešom etilacetat-petroler 80 : 20 vol.

Na osnovu podataka iz tabele 3.5 može se zaključiti da je za prečišćavanje hloroformskog i trihloretilenskog ekstrakta fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. najbplja metoda III koja uključuje ekstrakciju polaznog ekstrakta fermentisanog biljnog materijala hloroformom ili trihloretilenom, obradu dobijenog ekstrakta magnezijum(II)-oksidom, otparavanje rastvarača pod

vakuumom na 60 °C do suva. Ovom metodom dobijeni su suvi hloroformski ili trihloretilenski izolati sa najvećim sadržajem pojedinačnih sekundarnih glikozida, na primer sa najvećim sadržajem Dgx od 29 i 50 %, respektivno. Pošto trihloretilenski ekstrakt (izolat) smeše sekundarnih glikozida ima najveći sadržaj Dgx (40,2–50 % u odnosu na suvi izolat), korišćen je u daljem istraživanju razdvajanja sekundarnih glikozida .

### **3.4 IZOLACIJA DIGOKSINA IZ TRIHLORETILENSKOG IZOLATA SMEŠE SEKUNDARNIH GLIKOZIDA**

Razdvajanje sekundarnih glikozida iz suvih trihloretilenskih izolata izvršeno je frakcionim rastvaranjem u smeši voda-aceton i diskontinualnom istostrujnom ekstrakcijom u levkovima za odvajanje ili kontinualnom protivstrujnom frakcionom ekstrakcijom.

#### **3.4.1 Frakciono rastvaranje u smeši voda-aceton**

Rezultati ispitivanja uticaja sastava smeše voda-aceton na prinos Dgx dobijenog trostrukim frakcionim rastvaranjem suvih trihloretilenskih izolata smeše sekundarnih glikozida prikazani su u tabeli 3.6. Najveći prinos sirovog Dgx (preko 90 % u odnosu na sadržaj u suvom fermentisanom biljnom materijalu), čistoće oko 96 %, dobija se trostrukim frakcionim rastvaranjem trihloretilenskog izolata u smeši voda-aceton 1:7 vol. Kvalitativne i kvantitativne karakteristike dobijenog Dgx odgovaraju propisanim karakteristikama ( Ph. Eur. 7th Ed., 2012).

**Tabela 3.6** Uticaj sastava smeše aceton-voda na prinos Dgx dobijenog trostrukim frakcionim rastvaranjem trihloretilenskog izolata smeše sekundarnih glikozida na temperaturi ključanja uz refluks (odnos smeše voda-aceton i izolata = 1:7 cm<sup>3</sup>/g)

Glikozid <sup>a</sup>	Prinos (%) <sup>c</sup>											
	Macerat						Perkolat					
	1:5 <sup>b</sup>	1:6	1:8	1:10	1:12	1:15	1:5	1:6	1:8	1:10	1:12	1:15
Dx	8,0	4,0	7,5	8,5	10,0	10,5	6,0	4,0	4,5	5,0	5,5	5,0
Gx	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3
Dgx	83,5	93,5	88,5	86,0	85,0	84,0	91,0	96,0	90,0	88,5	87,5	88,0
UG	93,0	98,0	97,0	98,5	98,0	98,5	98,0	99,5	97,5	96,5	97,5	98,5

<sup>a</sup> Dx - digitoksin, Gx - gitoksin, Dgx - digoksin i UG - ukupni glikozidi. <sup>b</sup>Zapreminski odnos voda - aceton (cm<sup>3</sup>/g).

<sup>c</sup>Relativno u odnosu na suhu masu trihloretilenskog ekstrakta.

### 3.4.2 Diskontinualna istostrujna ekstrakcija tečnost-tečnost u levcima za odvajanje

#### 3.4.2.1 Izbor sistema za razdvajanje digitoksina, gitoksina i digoksina

U tabelama 3.7, 3.8 i 3.9 dati su rezultati razdvajanja Dx, Gx i Dgx iz trihloretilenskog izolata korišćenjem dvofaznih ternarnih sistema: EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:EtOAc, EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE i EtOH:H<sub>2</sub>O-THE:EtOAc. Optimalni sistemi, koji obezbeđuje najveći sadržaj Dgx u lakoj fazi od 78, 76 i 85 %, su: EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:EtOAc = 25:25:30:20 vol., EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE = 30:20:30:20 vol. i EtOH:H<sub>2</sub>O - THE:EtOAc = 35:15:20:30 vol., respektivno.

Na osnovu rezultata iz tabela 3.7, 3.8 i 3.9 najveći stepen ekstrakcije Dgx (85 %) sa skoro najmanjim stepenom ekstrakcije Dx (30 %) i Gx (20 %) u lakoj fazi ostvaruje sa sistemom za razdvajanje EtOH:H<sub>2</sub>O: CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15:20:30 vol. Zbog toga je ovaj sistem usvojen kao optimalni za dalja ispitivanja. U tabeli 3.10 date su vrednosti stepena ekstrakcije Dx, Gx i Dgx iz suvih hloroformskih i trihloretilenskih izolata za optimalnu laku i optimalnu tešku fazu dobijeni diskontinualnom ekstrakcijom tečnost-tečnost sa optimalnim dvofaznim sistemima. Najveći stepen ekstrakcije Dgx u lakoj fazi ostvaren u prvih 10 levaka za odvajanje (slike 3.11 i 3.12 ) bio je u opsegu između 92,0 i 99,8 %, dok je sadržaj Dx i Gx bio zanemarljiv (0,0-0,5 %).



**Tabela 3.7** Rezultati razdvajanja Dx, Gx i Dgx u dvofaznom sistemu etanol-voda-hloroform-etilacetat (EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:EtOAc, vol.) u levkovima za odvajanje (zapremina levka: 10 dm<sup>3</sup>, polazna koncentracija izolata u lakoj fazi: 15 g/dm<sup>3</sup>, odnos lake i teške faze: 1:1, vol, zapremina lake faze: 3 dm<sup>3</sup> i sobna temperatura)

Zapreminski odnos kompo- nenti	Sadržaj glikozida <sup>a</sup> (%)					
	Laka faza (EtOH:H <sub>2</sub> O)			Teška faza (CHCl <sub>3</sub> :EtOAc)		
	Dx	Gx	Dgx	Dx	Gx	Dgx
10:40:10:40	45,5	26,7	35,0	64,5	63,3	65,0
10:40:20:30	35,0	28,0	45,5	65,0	72,0	54,5
10:40:30:20	25,7	33,0	42,5	74,3	67,0	57,5
10:40:35:15	22,5	37,0	44,6	77,5	63,0	55,4
10:40:40:10	18,8	41,0	46,0	81,2	59,0	64,0
20:25:10:40	34,6	55,5	48,0	65,4	45,5	32,0
20:25:20:30	28,5	45,7	52,0	71,5	54,3	40,0
20:25:30:20	25,0	34,0	55,5	75,0	56,0	44,5
20:25:35:15	20,4	27,0	60,0	74,6	63,0	55,0
20:25:40:10	17,0	15,5	63,0	83,0	84,5	70,0
25:25:10:40	40,5	45,0	62,0	65,0	55,0	44,5
25:25:20:30	35,0	40,8	64,0	68,0	59,2	55,0
25:25:30:20	22,5	35,0	78,0	72,0	65,0	22,0
25:25:35:15	20,5	30,5	58,0	69,5	69,5	42,0
25:25:40:10	19,0	20,0	60,5	71,0	80,0	39,5
30:20:10:40	35,0	30,0	52,5	65,0	70,0	47,5
30:20:20:30	24,0	27,0	48,5	76,0	73,0	51,5
30:20:30:15	15,5	20,0	45,5	84,5	80,0	55,5
30:20:40:10	12,0	17,0	40,5	88,0	83,0	59,5
35:15:10:40	25,0	25,5	55,0	75,0	74,5	45,0
35:15:20:30	21,0	21,0	50,0	79,0	79,0	50,0
35:15:30:20	18,0	16,0	45,5	82,0	84,0	54,5
35:15:35:15	16,5	13,0	42,0	83,5	87,0	48,0
35:15:40:10	15,0	11,5	40,0	85,0	88,5	60,0
40:10:10:40	20,0	20,5	38,0	80,0	79,5	62,0
40:10:20:30	16,0	15,5	35,5	84,0	84,5	64,5
40:10:30:20	14,0	14,0	32,5	86,0	86,0	68,5
40:10:35:15	12,0	12,5	31,0	88,0	87,5	69,0
40:10:40:10	10,0	11,0	30,0	90,0	89,0	70,0

<sup>a</sup> Relativno u odnosu na polazni rastvor suvog trihloretilenskog ekstrakta iz lake faze.

**Tabela 3.8** Rezultati razdvajanja Dx, Gx i Dgx u dvofaznom sistemu etanol : voda :hloroform:etilacetat vol. (EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:EtOAc, vol.) u levkovima za odvajanje (zapremina levka: 10 dm<sup>3</sup>, polazna koncentracija izolata u lakoj fazi: 15 g/dm<sup>3</sup>, zapreminski odnos lake i teške faze: 1:1,1 vol. , zapremina lake faze: 3 dm<sup>3</sup> i sobna temperatura)

Zapreminski odnos kompo- nenti	Sadržaj glikozida <sup>a</sup> (%)					
	Laka faza (EtOH:H <sub>2</sub> O)			Teška faza (THE:EtOAc)		
	Dx	Gx	Dgx	Dx	Gx	Dgx
10:40:10:40	56,5	24,7	30,0	43,5	75,3	70,0
10:40:20:30	45,0	30,0	34,5	55,0	70,0	65,5
10:40:30:20	35,5	35,0	40,5	64,5	65,0	59,5
10:40:35:15	30,5	41,0	46,6	69,5	49,0	53,4
10:40:40:10	28,0	43,0	20,0	72,0	80,0	80,0
20:25:10:40	24,6	20,5	25,0	79,5	79,5	75,0
20:25:20:30	36,5	20,7	38,0	63,5	79,3	62,0
20:25:30:20	35,0	25,0	33,0	65,0	87,0	77,0
20:25:35:15	35,0	30,0	37,0	65,0	70,0	63,3
20:25:40:10	30,0	36,0	40,0	70,0	64,0	60,0
25:25:10:40	50,0	40,0	46,0	50,0	60,0	54,0
25:25:20:30	53,0	42,8	50,0	47,0	57,2	50,0
25:25:30:20	46,0	35,0	45,0	54,0	65,0	55,0
25:25:35:15	38,0	27,5	49,0	72,0	72,5	51,0
25:25:40:10	35,0	20,0	57,0	65,0	80,0	43,0
30:20:10:40	30,0	17,0	65,0	70,0	83,0	35,0
30:20:20:30	25,0	15,0	70,0	75,0	85,0	30,0
30:20:30:20	20,0	12,0	76,0	80,0	88,0	24,0
30:20:30:15	18,5	10,0	68,5	81,5	90,0	31,5
30:20:40:10	15,0	8,0	56,5	85,0	92,0	43,5
35:15:10:40	45,0	37,5	60,0	55,0	62,5	40,0
35:15:20:30	36,0	30,0	50,0	74,0	70,0	50,0
35:15:30:20	30,0	25,0	46,0	70,0	75,0	54,0
35:15:35:15	25,0	20,0	36,0	75,0	80,0	64,0
35:15:40:10	18,0	15,0	30,0	82,0	85,0	70,0
40:10:10:40	30,0	28,5	48,0	70,0	71,5	62,0
40:10:20:30	22,0	25,0	38,5	78,0	75,0	61,5
40:10:30:20	18,0	20,0	36,5	82,0	80,0	63,5
40:10:35:15	14,0	16,5	33,0	86,0	83,5	67,0
40:10:40:10	12,0	14,0	31,0	88,0	86,0	69,0

<sup>a</sup> Relativno u odnosu na polazni rastvor suvog trihloretilenskog ekstrakta iz lake faze.

**Tabela 3.9** Rezultati razdvajanja Dx, Gx i Dgx u dvofaznom sistemu etanol-voda-hloroform: trihloretelin, vol. (EtOH:H<sub>2</sub>O: CHCl<sub>3</sub>: THE, vol.) u levkovima za odvajanje (zapremina levka: 10 dm<sup>3</sup>, polazna koncentracija izolata u lakoj fazi: 15 g/dm<sup>3</sup>, zapreminski odnos lake i teške faze: 1:1,1 vol., zapremina faze: 3 dm<sup>3</sup> i sobna temperatura)

Zapreminski odnos kompo- nenti	Sadržaj glikozida <sup>a</sup> (%)					
	Laka faza (EtOH:H <sub>2</sub> O)			Laka faza (CHCl <sub>3</sub> : THE)		
	Dx	Gx	Dgx	Dx	Gx	Dgx
10:40:10:40	36,5	6,7	35,0	65,5	43,3	65,0
10:40:20:30	35,0	60,0	54,5	65,0	40,0	45,5
10:40:30:20	30,5	58,0	48,5	69,5	42,0	41,5
10:40:35:15	26,5	51,0	46,6	73,5	49,0	26,5
10:40:40:10	25,0	42,0	50,0	75,0	58,0	50,0
20:25:10:40	44,6	65,5	60,0	55,4	35,5	40,0
20:25:20:30	38,5	55,7	65,0	61,5	47,3	35,0
20:25:30:20	30,0	43,0	70,0	70,0	67,0	30,0
20:25:35:15	26,5	35,0	67,0	73,5	65,0	43,0
20:25:40:10	21,0	24,5	65,0	79,0	75,5	35,0
25:25:10:40	50,5	57,0	73,0	49,5	43,0	27,0
25:25:20:30	43,0	52,8	78,0	57,0	47,2	22,0
25:25:30:20	30,5	43,0	82,0	69,5	67,0	28,0
25:25:35:15	26,5	37,5	69,0	73,5	62,5	31,0
25:25:40:10	22,0	27,0	66,5	78,0	73,0	33,5
30:20:10:40	40,0	42,0	80,0	60,0	58,0	20,0
30:20:20:30	44,0	37,0	85,5	66,0	23,0	14,5
30:20:30:20	48,0	44,0	89,0	52,0	56,0	11,0
30:20:35:15	26,5	32,0	58,5	73,5	68,0	41,5
30:20:40:10	25,0	29,0	52,5	75,0	71,0	47,5
35:15:10:40	35,0	33,5	60,0	65,0	66,5	40,0
35:15:20:30	30,0	20,0	85,0	70,0	80,0	15,0
35:15:30:20	25,0	22,0	50,5	75,0	78,0	49,5
35:15:35:15	20,0	16,0	48,0	80,0	84,0	88,0
35:15:40:10	18,0	15,0	45,0	82,0	85,0	55,0
40:10:10:40	30,0	28,5	48,0	70,0	71,5	62,0
40:10:20:30	22,0	25,0	38,5	78,0	75,0	61,5
40:10:30:20	18,0	20,0	36,5	82,0	80,0	63,5
40:10:35:15	14,0	16,5	33,0	86,0	83,5	67,0
40:10:40:10	12,0	14,0	31,0	88,0	86,0	69,0

<sup>a</sup> Relativno u odnosu na polazni rastvor suvog trihloretilenskog ekstrakta iz lake faze;

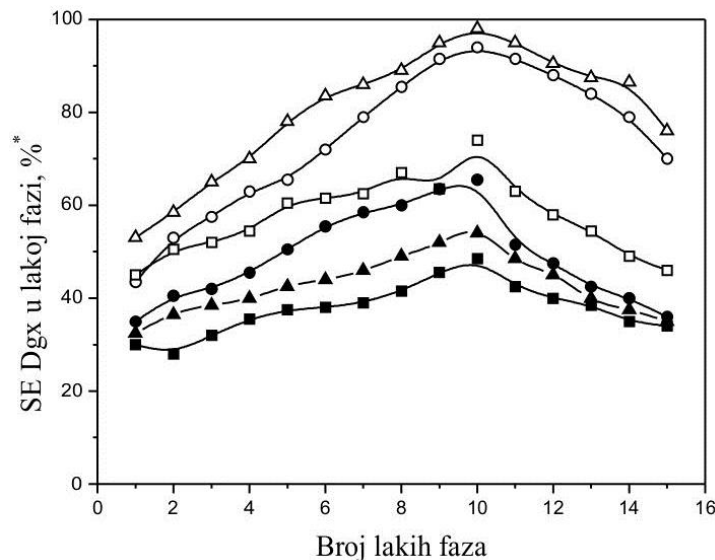
**Table 3.10** Vrednosti stepena ekstrakcije Dx, Gx and Dgx hloroformskih i trihloretilenskih izolata za optimalne lake i teške faze

Sistem	Stepen ekstrakcije <sup>a</sup> (%)											
	Laka faza						Teška faza					
	Dx		Gx		Dgx		Dx		Gx		Dgx	
	H <sup>b</sup>	THE <sup>c</sup>	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE
EtOH:H <sub>2</sub> O- CHCl <sub>3</sub> :EtOAc 25:25:30:20 vol.	0,5	0,3	0,0	0,0	92,0	99,5	99,5	97,7	100,0	100,0	8,0	0,5
EtOH:H <sub>2</sub> O- CHCl <sub>3</sub> :EtOAc 30:20:30:20 vol.	0,5	0,5	0,0	0,0	94,0	95,5	99,5	99,5	100,0	100,0	6,0	5,5
EtOH:H <sub>2</sub> O- CHCl <sub>3</sub> :THE 35:15:20:30 vol.	0,3	0,2	0,0	0,0	99,5	99,8	99,7	99,8	100,0	100,0	0,5	0,2

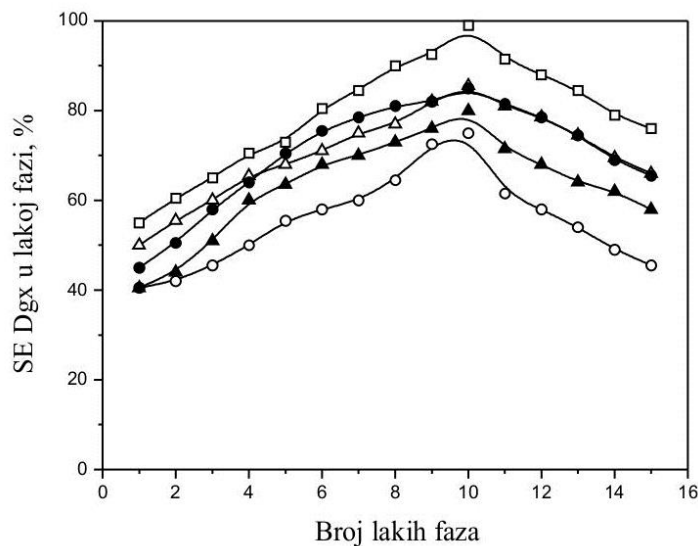
<sup>a</sup>Relativno u odnosu na sadržaj u polaznom rastvoru. <sup>b</sup>H – hloroformski izolat i <sup>c</sup>THE – trihloretilenski izolat.

Najbolji dvofazni sistem je EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15:20:30 vol. sa kojim je ostvaren najveći stepen ekstrakcije Dgx u prvih 10 lakih faza tj. Levkova za odvajanje: 99,5 i 99,8 % iz polaznih rastvora hloroformskih i trihloretilenskih izolata. Ovaj sistem je prihvaćen kao optimalni za izdvajanje Dgx iz suvih hloroformskih i trihloretilenskih izolata.

Na slikama 3.11 i 3.12 prikazana je raspodela Dgx u lakoj fazi optimalnog sistema (EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15:20:30 vol.) u 15 levkova za odvajanje za različite odnose faza (slika 3.11) i različite količine trihloretilenskih izolata rastvorenih u lakoj fazi u prvom levku za odvajanje (slika 3.12). Stepen ekstrakcije Dgx se povećava sa povećanjem broja levkova za razdvajanje do desetog levka, a zatim se smanjuje, nezavisno od odnosa zapremina faza i polazne količine suvih ekstrakata u lakoj fazi. Najveći stepen ekstrakcije Dgx ostvaren je sa odnosom faza 1:1,1 vol. (98 %, slika 3.11) i količinom trihloretilenskog izolata od 10 g/dm<sup>3</sup> (99 %, slika 3.12). Zbog toga je prihvaćeno da je optimalan odnos faza 1:1,1 vol., a optimalna količina polaznog trihloretilenskog izolata u lakoj fazi u prvom levku za odvajanje 10 g/L. Prinos Dgx (uzimajući u obzir sadržaj u trihloretilenskom izolatu) iz koncentrata spojenih lakih faza iz prvih 10 levkova je 89 %, dok je njegova čistoća 99 %.



**Slika 3.11** Raspodela Dgx u lakim fazama sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE 35:15:20:30 vol. u levkovima za odvajanje za različite odnose lake i teške faze (polazna količina trihloretilenskog izolata u prvom levku za odvajanje: 10 g/dm<sup>3</sup>; zapremina faza: 3 dm<sup>3</sup>; sobna temperatura; mućkanje faza u levcima: 5 min; odnos lake i teške faze: 1:1 - ○, 1:1,1 - △, 1:1,3 - □, 1:1,5 - ●, 1:1,8 - ▲ i 1:2 - ■)

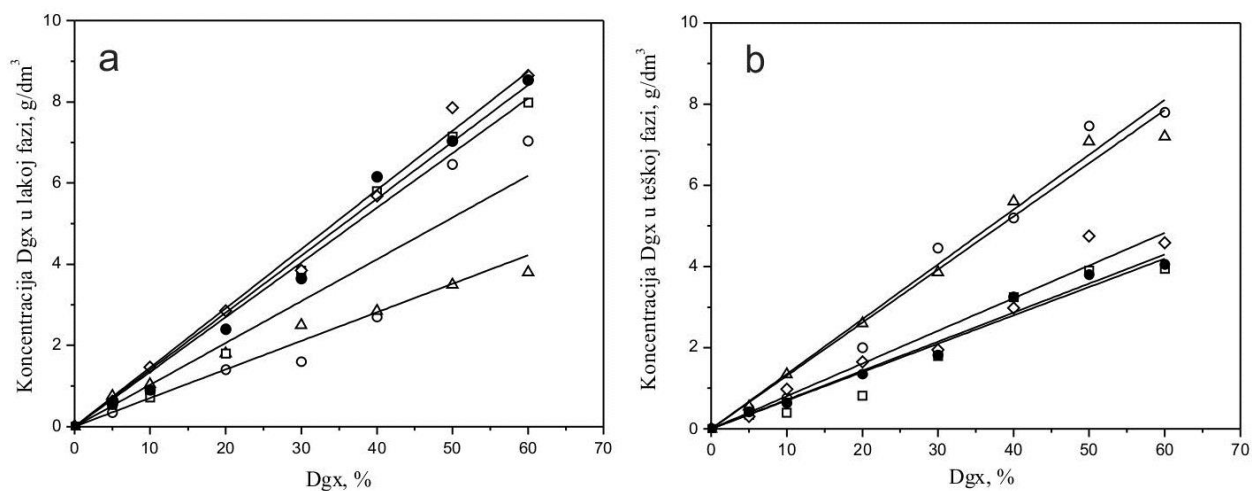


**Slika 3.12** Raspodela Dgx u lakoj fazi sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE 35:15:20:30 vol. u levcima za odvajanje za različite polazne količine trihloretilenskog izolata u lakoj fazi u prvom levku za odvajanje (odnos lake i teške faze: 1:1,1 vol.; zapremina faza: 3 dm<sup>3</sup>; sobna temperatura; mućkanje faza u levcima za odvajanje: 5 min; polazna količina izolata u lakoj fazi, g/dm<sup>3</sup>: 5 - ○, 10 - △, 15 - □, 20 - ● i 25 - ▲)

### 3.4.2.2 Ravnotežna raspodela digoksina u sistemu EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:THE = 35: 15:20: 30 vol.

Ravnotežna raspodela Dgx između lake i teške faze u zavisnosti od sastava smeše Dx, Gx i Dgx je određena za optimalni sistem za izdvajanje Dgx diskontinualnom ekstrakcijom tečnost-tečnost EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15:20:30 vol. i optimalni odnos lake i teške faze 1:1,1 vol. Ove ravnotežne zavisnosti su prikazane na slici 3.13. Vrednosti koeficijenta raspodele i prilagođeni koeficijent determinacije su date u tabeli 4.11. Sa slike 3.13 mogu se izvući sledeći zaključci:

- za odnose Dx:Gx u smeši sekundarnih glikozida 2:1 i 2,5:1 g/g, ravnotežna koncentracija Dgx u teškoj fazi se povećava u odnosu na njegovu ravnotežnu koncentraciju u lakoj fazi sa povećanjem udela Dgx u smeši sekundarnih glikozida u opsegu 5 do 60 %;
- za odnose Dx:Gx u smeši sekundarnih glikozida 3:1 do 4:1 g/g, ravnotežna koncentracija Dgx u teškoj fazi se povećava u odnosu na njegovu ravnotežnu koncentraciju u lakoj fazi sa povećanjem udela Dgx u smeši sekundarnih glikozida u opsegu 5 do 60 %;
- odnos Dx:Gx u smeši sekundarnih glikozida ima bitnog uticaja na ravnotežnu raspodelu Dgx između lake i teške faze za udele Dgx u smeši u opsegu 5-60 %, pri čemu su ravnotežne zavisnosti pravolinijske.



**Slika 3.13** Ravnotežna raspodela Dgx u a) lakoj i b) teškoj fazi sistema EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15:20:30 vol. u zavisnosti od masenog udela Dgx u smeši sekundarnih glikozida ( THE-trihloretilen; odnos lake i teške faze 1:1,1 vol; napojni rastvor suvog izolata smeše sekundarnih glikozida u lakoj fazi 10 g/L; ; odnos Dx:Gx u smeši, g/g: 2:1 - ○, 2,5:1 - △, 3:1 - □, 3,5:1 - ◇ i 4:1 - ●)

**Tabela 4.11** Ravnotežna raspodela Dgx u lakoj i teškoj fazi sistema EtOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15:20:30

Odnos Dx:Gx u smeši, g/g	Ravnotežna raspodela Dgx u lakoj fazi sistema EtOH:H <sub>2</sub> O:CHCl <sub>3</sub> :THE <sup>a</sup> = 35:15:20:30		Ravnotežna raspodela Dgx u teškoj fazi sistema EtOH:H <sub>2</sub> O:CHCl <sub>3</sub> :THE = 35:15:20:30	
	Koeficijent raspodele	Prilagođeni koeficijent determinacije	Koeficijent raspodele	Prilagođeni koeficijent determinacije
2,0:1	0,1030	0,921	0,1351	0,989
2,5:1	0,0704	0,981	0,1308	0,994
3,0:1	0,1347	0,989	0,0699	0,976
3,5:1	0,1457	0,996	0,0805	0,983
4,0:1	0,1402	0,993	0,0716	0,991

<sup>a</sup> Trihloretilen

Ova ispitivanja pokazuju da za dobijanje Dgx ekstrakcijom tečnost-tečnost treba koristiti izolate u kojima je sadržaj Gx znatno manji u odnosu na Dx, odnosno u kojima je odnos Dx:Gx što veći.

### 3.4.3 Kontinualna protivstrujna frakciona ekstrakcija tečnost-tečnost

Kontinualna protivstrujna ekstrakcija tečnost-tečnost izvedena je u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni. Sprovedena su istraživanja koja su imala za cilj određivanje:

- optimalnih uslova razdvajanja sekundarnih glikozida,
- uticaja sastava sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE na stepen ekstrakcije sekundarnih glikozida u lakoj i teškoj fazi,
- uticaja rastojanja između perforiranih pločica, kao i amplitude i frekvencije vibracije, na efikasnost razdvajanja sekundarnih glikozida i
- uticaja početne koncentracije trihloretilenskih izolata u napojnom rastvoru na efikasnost razdvajanja sekundarnih glikozida

#### 3.4.3.1 Optimalni uslovi razdvajanja sekundarnih glikozida

Optimalni uslovi razdvajanja sekundarnih glikozida iz trihloretilenskog i hloroformskih izolata smeše sekundarnih glikozida u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni, koja radi sa hodom 3 cm i frekvencijom 120 min<sup>-1</sup>, određeni su variranjem sastava sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE oko

optimalnog sastava (35:15:20:30 vol.) za diskontinualnu ekstrakciju tečnost-tečnost, pri optimalnom odnosu lake i teške faze 1:1,1 vol. Polazna koncentracija izolata u napojnom rastvoru je bila 10 g/dm<sup>3</sup>. Rezultati optimizacije su prikazani u tabelama 3.12-3.19.

Uvođenjem rastvora napojne smeše suvog izolata smeše sekundarnih glikozida rastvorenog u lakoj fazi, na dnu Karr-ove ekstrakcione vibracione kolone visine 2 i 4 m, najveći stepen ekstrakcije Dgx ostvaruje se iz napojnog rastvora hloroformskog (65 i 70 %, respektivno) i trihloretilenskog (70 i 82 %, respektivno) izolata (tabele 3.12 i 3.13) u sistemu EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE = 35: 15:20: 30 vol. U koloni visine 4 m ostvaruje se veći stepen ekstrakcije Dgx u lakoj fazi iz napojnog rastvora hloroformskih i trihloretilenskih izolata smeše sekundarnih glikozida rastvorenih u teškoj fazi (70 i 80 %, respektivno), pri čemu je stepen ekstrakcije Dgx veći iz napojnog rastvora trihloretilenskog izolata za oko 12 %.

Analognom analizom rezultata frakcione ekstrakcije Dgx iz napojnog rastvora suvih izolata smeše sekundarnih glikozida rastvorenih u teškoj fazi (tabele 3.14 i 3.15), pod istim uslovima kao u prethodnom slučaju, rastvaranjem smeše u teškoj fazi i uvođenjem napojnog rastvora na vrhu kolone, ostvaruju se veći stepen ekstrakcije Dgx u lakoj fazi sa istim sastavom sistema za razdvajanje (EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE = 35: 15:20: 30 vol. u kolonama visine 2 i 4 m, kako za rastvore hloroformskih izolata (70 i 80 %, respektivno), tako i za rastvore trihloretilenskih izolata (86 i 90 %, respektivno). I u ovom slučaju najveći stepen ekstrakcije Dgx (90 % u odnosu na sadržaj u izolatu) ostvaruje se frakcionom ekstrakcijom iz napojnog rastvora suvih trihloretilenskih izolata rastvorenih u teškoj fazi.

Uvođenjem napojnog rastvora suvih izolata smeše sekundarnih glikozida rastvorenih u lakoj ili teškoj fazi (tabele 3.16 i 3.17) na sredini kolone visine 2 m, najveći stepen ekstrakcije Dgx iz napojnog rastvora izolata rastvorenog u lakoj fazi (80 i 84 %, respektivno) i iz napojnog rastvora izolata rastvorenog u teškoj fazi (82 i 86 %, respektivno) postiže se u sistemu EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE istog sastava 35:15:20:30 vol. Stepen ekstrakcije Dgx je veći za oko 12 % od stepena ekstrakcije Dgx dobijenih sa istim sistemom rastvarača pri uvođenju napojnog rastvora na dnu ili vrhu kolone visine 2 m.



**Tabela 3.12** Uticaj sastava sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE na stepen ekstrakcije glikozida u lakoj i teškoj fazi u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni visine 2 m pri uvođenju napojnog rastvora izolata rastvorenog u lakoj fazi na dnu kolone (protok napojnog rastvora: 1,5 dm<sup>3</sup>/h; protok lake faze koja se uvodi na dnu kolone: 1,5 dm<sup>3</sup>/h; protok teške faze koja se uvodi na vrhu kolone: 3,3 dm<sup>3</sup>/h ; odnos protoka lake i teške faze: 1:1,1 vol.)

Zapreminski odnos kom- ponenti	Sadržaj glikozida <sup>a</sup> (%)											
	Laka faza (EtOH:H <sub>2</sub> O)						Teška faza (CHCl <sub>3</sub> :THE)					
	Dx		Gx		Dgx		Dx		Gx		Dgx	
	H <sup>b</sup>	THE <sup>c</sup>	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE
20:30:20:30	20,0	38,0	20,0	30,0	52,0	60,0	80,0	62,0	80,0	70,0	48,0	40,0
25:25:20:30	23,0	40,0	24,0	32,0	54,0	62,0	67,0	60,0	76,0	68,0	46,0	38,0
30:15:20:30	25,0	43,0	38,0	36,5	56,0	66,0	75,0	57,0	72,0	63,5	44,0	34,0
35:15:20:30	23,0	33,0	35,0	33,0	65,0	70,0	77,0	67,0	65,0	67,0	35,0	30,0
35:15:30:20	26,0	34,0	26,0	32,0	58,0	64,0	74,0	76,0	64,0	78,0	42,0	36,0
35:15:35:15	25,5	32,0	24,0	33,0	56,0	62,0	74,5	68,0	76,0	67,0	64,0	38,0
35:15:40:10	20,5	30,0	22,5	31,0	54,0	59,0	79,5	70,0	77,5	69,0	56,0	41,0

<sup>a</sup>Relativno u odnosu na sadržaj u polaznom rastvoru suvog izolata u lakoj fazi. <sup>b</sup> Hloroformski izolat.

<sup>c</sup>Trihloretilenski izolat. EtOH- etilalkohol;

**Tabela 3.13** Uticaj sastava sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE na stepen ekstrakcije glikozida u lakoj i teškoj fazi u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni visine 4 m pri uvođenju napojnog rastvora izolata rastvorenog u lakoj fazi na dnu kolone (protok napojnog rastvora glikozida koja se uvodi na dnu kolone:1,5 dm<sup>3</sup>/h; protok lake faze koja se uvodi na dnu kolone: 1,5 dm<sup>3</sup>/h; protok teške faze koja se uvodi na vrhu kolone: 3,3 dm<sup>3</sup>/h; odnos protoka lake i teške faze: 1:1,1 vol.)

Zapreminski odnos kom- ponenti	Glikozidi (%) <sup>a</sup>											
	Laka faza (EtOH:H <sub>2</sub> O)						Teška faza (CHCl <sub>3</sub> :THE)					
	Dx		Gx		Dgx		Dx		Gx		Dgx	
	H <sup>b</sup>	THE <sup>c</sup>	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE
20:30:20:30	30,0	48,0	42,0	41,0	60,0	71,0	70,0	62,0	58,0	69,0	40,0	29,0
25:25:20:30	35,0	50,0	45,0	43,0	63,0	74,0	65,0	50,0	55,0	57,0	37,0	26,0
30:20:20:30	38,0	55,0	53,0	44,5	65,0	77,0	62,0	45,0	47,0	55,5	35,0	23,0
35:15:20:30	45,0	53,0	55,0	45,0	70,0	80,0	55,0	47,0	45,0	55,0	30,0	20,0
35:15:25:25	38,0	52,0	43,0	42,0	68,0	75,0	62,0	48,0	67,0	68,0	32,0	25,0
35:15:30:20	36,0	46,0	40,0	45,0	66,0	73,0	64,0	54,0	60,0	55,0	34,0	27,0
35:15:35:25	34,0	47,0	38,0	41,0	62,0	70,0	76,0	53,0	62,0	59,0	28,0	30,0

<sup>a</sup>Relativno u odnosu na sadržaj u polaznom rastvoru suvog izolata u lakoj fazi. <sup>b</sup> Hloroformski izolat.

<sup>c</sup>Trihloretilenski izolat; EtOH- etilalkohol.

**Tabela 3.14** Uticaj sastava sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE na SE glikozida u lakoj i teškoj fazi u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni visine 2 m pri uvođenju napojnog rastvora rastvorenog izolata rastvorenog u teškoj fazi na vrhu kolone (protok napojnog rastvora glikozida u teškoj fazi koja se uvodi na sredini kolone: 1,65 dm<sup>3</sup>/h; protok teške faze koja se uvodi na sredini kolone: 1,65 dm<sup>3</sup>/h; protok lake faze koja se uvodi na dnu kolone: 3 dm<sup>3</sup>/h; odnos protoka lake i teške faze: 1:1,1 vol.).

Zapreminski odnos kom- ponenti	Glikozidi (%) <sup>a</sup>												<sup>a</sup> Rel- ativn o u od- nosu na sadrž aj u po- lazno m rastv oru su- vog
	Laka faza (EtOH:H <sub>2</sub> O)						Teška faza (CHCl <sub>3</sub> :THE)						
	Dx		Gx		Dgx		Dx		Gx		Dgx		
	H <sup>b</sup>	THE <sup>c</sup>	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE	
20:30:20:30	28,0	39,0	27,0	30,0	68,0	72,0	72,0	61,0	73,0	70,0	32,0	28,0	
25:25:20:30	27,0	37,0	28,0	32,0	72,0	74,0	73,0	63,0	72,0	68,0	28,0	26,0	
30:20:20:30	26,0	35,0	30,0	36,5	73,0	76,0	74,0	65,0	70,0	63,5	27,0	24,0	
35:15:20:30	25,0	20,0	25,0	40,0	75,0	85,0	75,0	80,0	75,0	60,0	25,0	20,0	
35:15:25:25	27,0	24,0	27,0	37,0	70,0	78,0	73,0	76,0	73,0	63,0	30,0	22,0	
35:15:30:20	28,0	26,0	28,0	33,0	70,0	76,0	72,0	74,0	72,0	67,0	30,0	24,0	
35:15:35:25	30,0	28,0	30,0	35,0	67,0	74,0	70,0	72,0	70,0	65,0	33,0	26,0	

izolata u lakoj fazi; <sup>b</sup> Hloroformski izolat.

<sup>c</sup> Trihloretilenski izolat; EtOH- etilalkohol.

**Tabela 3.15** Uticaj sastava sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE na stepen ekstrakcije glikozida u lakoj i teškoj fazi u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni visine 4 m pri uvođenju napojnog rastvora izolata rastvorenog u teškoj fazi, na vrhu kolone (protok napojnog rastvora glikozida u teškoj fazi koji se uvodi na sredini kolone: 1,65 dm<sup>3</sup>/h; protok teške faze koja se uvodi na dnu kolone: 1,65 dm<sup>3</sup>/h; protok lake faze koja se uvodi na vrhu kolone: 3 dm<sup>3</sup>/h; odnos protoka lake i teške faze: 1:1,1 vol.)

Zapreminski odnos kom- ponenti	Glikozidi (%) <sup>a</sup>											
	Laka faza (EtOH:H <sub>2</sub> O)						Teška faza (CHCl <sub>3</sub> :THE)					
	Dx		Gx		Dgx		Dx		Gx		Dgx	
	H <sup>b</sup>	THE <sup>c</sup>	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE
20:30:20:30	41,0	53,0,0	36,0	41,0	79,0	80,0	59,0	47,0	64,0	59,0	21,0	20,0
25:25:20:30	40,0	49,0	39,0	42,0	82,0	85,0	60,0	51,0	61,0	68,0	28,0	25,0
30:20:20:30	39,0	47,0	42,0	45,5	83,0	87,0	61,0	53,0	58,0	54,5	17,0	13,0
35:15:20:30	37,0	30,0	38,0	48,0	86,0	90,0	63,0	70,0	72,0	52,0	24,0	10,0
35:15:25:25	40,0	35,0	39,0	35,0	82,0	88,0	60,0	65,0	61,0	65,0	18,0	12,0
35:15:30:20	42,0	37,0	42,0	32,0	80,0	84,0	58,0	63,0	58,0	68,0	20,0	16,0
35:15:35:25	44,0	34,0	44,0	30,0	77,0	82,0	56,0	66,0	56,0	70,0	23,0	18,0

<sup>a</sup>Relativno u odnosu na sadržaj u polaznom rastvoru suvog izolata u lakoj fazi. <sup>b</sup> Hloroformski izolat.

<sup>c</sup> Trihloretilenski izolat.. EtOH- etilalkohol.

**Tabela 3.16** Uticaj sastava sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE na stepen ekstrakcije (SE) glikozida u lakoj i teškoj fazi u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni visine 2 m pri uvođenju napojnog rastvora izolata rastvorenog u lakoj fazi, na sredini kolone (protok napojnog rastvora koji se uvodi na sredini kolone: 1,5 dm<sup>3</sup>/h; protok lake faze koja se uvodi na vrhu kolone: 1,5 dm<sup>3</sup>/h; protok teške faze koja se uvodi na dnu kolone: 3,3 dm<sup>3</sup>/h; odnos protoka lake i teške faze : 1:1,1 vol.)

Zapreminski odnos kompo- nenti	Glikozidi (%) <sup>a</sup>											
	Laka faza (EtOH:H <sub>2</sub> O)						Teška faza (CHCl <sub>3</sub> :THE)					
	Dx		Gx		Dgx		Dx		Gx		Dgx	
	H <sup>b</sup>	THE <sup>c</sup>	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE
30:20:35:15	21,0	24,0	22,0	30,0	70,0	78,0	79,0	76,0	78,0	70,0	30,0	22,0
30:20:40:10	22,0	28,0	20,0	32,0	74,0	88,0	78,0	72,0	80,0	68,0	26,0	22,0
35:15:10:40	24,0	31,0	24,0	36,0	82,0	86,0	76,0	69,0	76,0	64,0	18,0	14,0
35:15:20:30	28,0	34,0	28,0	40,0	80,0	84,0	72,0	76,0	82,0	60,0	20,0	16,0
35:15:30:20	26,0	30,0	14,0	37,0	83,0	84,0	74,0	70,0	86,0	63,0	17,0	16,0
35:15:35:15	23,0	28,0	12,0	33,0	78,0	82,0	77,0	72,0	88,0	67,0	22,0	18,0
35:15:40:10	22,0	26,0	10,0	32,0	76,0	79,0	78,0	74,0	90,0	68,0	22,0	21,0

<sup>a</sup>Relativno u odnosu na sadržaj u polaznom rastvoru suvog izolata u lakoj fazi. <sup>b</sup> Hloroformski izolat.

<sup>c</sup> Trihloretilenski izolat. EtOH- etilalkohol.

**Tabela 3.17** Uticaj sastava sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE na stepen ekstrakcije glikozida u lakoj i teškoj fazi u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni visine 2 m pri uvođenju napojnog rastvora suvog izolata smeše glikozida rastvorenog u teškoj fazi, na sredini kolone (protok napojnog rastvora: 1,65 dm<sup>3</sup>/h; protok TF koja se uvodi na vrhu kolone :1,65 dm<sup>3</sup>/h; protok lake faze koja se uvodi na vrhu kolone: 3,0 dm<sup>3</sup>/h; odnos protoka lake i teške faze: 1:1,1 vol. )

Zapreminski odnos kompo- nenti	Glikozidi (%) <sup>a</sup>											
	Laka faza (EtOH:H <sub>2</sub> O)						Teška faza (CHCl <sub>3</sub> :THE)					
	Dx		Gx		Dgx		Dx		Gx		Dgx	
	H <sup>b</sup>	THE <sup>c</sup>	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE
30:20:35:15	18,0	21,0	16,0	24,0	74,0	78,0	82,0	79,0	84,0	76,0	26,0	22,0
30:20:40:10	20,0	24,0	18,0	28,0	78,0	80,0	76,0	72,0	82,0	72,0	22,0	20,0
35:15:10:40	21,0	27,0	20,0	32,0	80,0	82,0	79,0	73,0	80,0	68,0	20,0	18,0
35:15:20:30	25,0	30,0	24,0	36,0	82,0	86,0	75,0	70,0	76,0	64,0	18,0	14,0
35:15:30:20	22,0	26,0	12,0	32,0	88,0	84,0	78,0	74,0	88,0	68,0	12,0	16,0
35:15:35:15	20,0	24,0	10,0	29,0	80,0	82,0	80,0	76,0	90,0	71,0	20,0	18,0
35:15:40:10	19,0	20,0	8,0	26,0	78,0	79,0	81,0	80,0	92,0	74,0	22,0	21,0

<sup>a</sup>Relativno u odnosu na sadržaj u polaznom rastvoru suvog izolata u lakoj fazi. <sup>b</sup> Hloroformski izolat.

<sup>c</sup> Trihloretilenski izolat; EtOH- etilalkohol.

Uvođenjem napojnog rastvora izolata smeše sekundarnih glikozida rastvorenih u lakoj fazi sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE različitog sastava na sredini kolone visine 4 m, najveći stepen ekstrakcije Dgx u lakoj fazi je 88 i 90 % iz rastvora hloroformskih i trihloetilenskog izolata, respektivno (tabela 3.18). Kad se napojni rastvor izolata u teškoj fazi uvodi na sredini kolone, stepen ekstrakcije Dgx u lakoj fazi iznose 94 i 98 % iz rastvora hloroformskih i trihloetilenskih izolata, respektivno (tabela 3.19). Najveći stepen ekstrakcije Dgx u lakoj fazi ostvaruje se uvođenjem napojnog rastvora trihloetilenskog izolata rastvorenog u teškoj fazi na sredini kolone visine 4 m sa sistemom rastvarača EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE sastava 35:15:20:30 vol.

**Tabela 3.18** Uticaj sastava sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE na stepen ekstrakcije glikozida u lakoj i teškoj fazi u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni visine 4 m pri uvođenju napojnog rastvora izolata rastvorenog u lakoj fazi na sredini kolone (protok napojnog rastvora koji se uvodi na sredini kolone: 1,5 dm<sup>3</sup>/h; protok LF koja se uvodi na dnu kolone: 3 dm<sup>3</sup>/h; protok teške faze koja se uvodi na vrhu kolone: 3,3 dm<sup>3</sup>/h; odnos protoka lake i teške faze: 1:1,1 vol. )

Zapreminski odnos kom- ponenti	Glikozidi (%) <sup>a</sup>											
	Laka faza (EtOH:H <sub>2</sub> O)						Teška faza (CHCl <sub>3</sub> :THE)					
	Dx		Gx		Dgx		Dx		Gx		Dgx	
	H <sup>b</sup>	THE <sup>c</sup>	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE
30:20:35:15	15,0	17,0	18,0	30,0	80,0	81,0	85,0	83,0	82,0	70,0	20,0	19,0
30:20:40:10	17,0	19,0	20,0	32,0	81,0	84,0	83,0	81,0	80,0	68,0	19,0	16,0
35:15:10:40	20,0	21,0	22,0	36,0	83,0	86,0	80,0	79,0	88,0	64,0	17,0	14,0
35:15:20:30	22,0	24,0	26,0	40,0	86,0	90,0	78,0	76,0	74,0	60,0	14,0	10,0
35:15:30:20	24,0	26,0	34,0	47,0	94,0	98,0	76,0	74,0	66,0	53,0	6,0	4,0
35:15:35:15	21,0	22,0	24,0	33,0	80,0	90,0	79,0	78,0	76,0	67,0	20,0	10,0
35:15:40:10	22,0	20,0	23,0	32,0	75,0	73,0	78,0	80,0	77,0	68,0	25,0	27,0

<sup>a</sup>Relativno u odnosu na sadržaj u polaznom rastvoru suvog izolata u teškoj fazi. <sup>b</sup> Hloroformski izolat; <sup>c</sup> Trihloetilenski izolat; EtOH- etilalkohol.

**Tabela 3.19** Uticaj sastava sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE na stepen ekstrakcije glikozida u lakoj i teškoj fazi u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni visine 4 m pri uvođenju napojnog rastvora izolata rastvorenog u teškoj fazi na sredini kolone (protok napojnog rastvora :1,65 dm<sup>3</sup>/h; protok teške faze:1,65 dm<sup>3</sup>; protok lake faze koja se uvodi na dnu kolone: 3 dm<sup>3</sup>/h; protok teške faze koja se uvodi na vrhu kolone: 1,65 dm<sup>3</sup>/h; odnos protoka lake i teške faze: 1:1,1 vol.)

Zapreminski odnos kom- ponenti	Glikozidi (%) <sup>a</sup>											
	Laka faza (EtOH:H <sub>2</sub> O)						Teška faza (CHCl <sub>3</sub> :THE)					
	Dx		Gx		Dgx		Dx		Gx		Dgx	
	H <sup>b</sup>	THE <sup>c</sup>	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE	H	THE
30:20:35:15	10,0	13,0	20,0	27,0	70,0	76,0	90,0	87,0	80,0	73,0	30,0	24,0
30:20:40:10	12,0	14,0	24,0	28,0	72,0	80,0	88,0	86,0	76,0	72,0	28,0	20,0
35:15:10:40	15,0	16,0	18,0	33,0	76,0	84,0	85,0	64,0	82,0	77,0	24,0	16,0
35:15:20:30	18,0	22,0	32,0	38,0	80,0	88,0	82,0	78,0	68,0	62,0	20,0	12,0
35:15:30:20	20,0	24,0	30,0	43,0	88,0	90,0	80,0	66,0	70,0	57,0	12,0	10,0
35:15:35:15	18,0	22,0	24,0	30,0	76,0	87,0	82,0	78,0	76,0	70,0	24,0	13,0
35:15:40:10	16,0	20,0	23,0	28,0	70,0	72,0	84,0	80,0	77,0	72,0	30,0	28,0

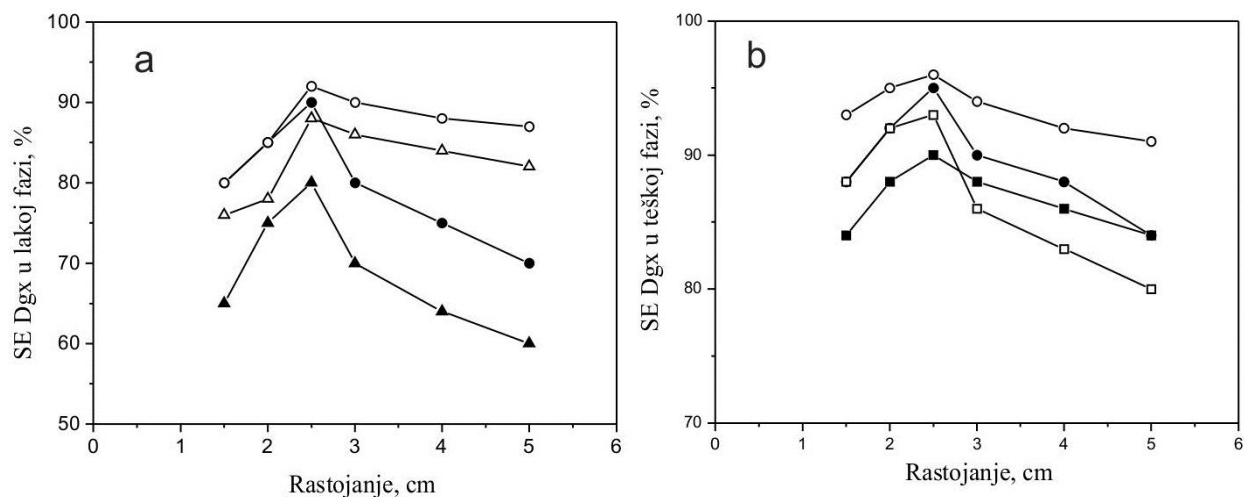
<sup>a</sup>Relativno u odnosu na sadržaj u polaznom rastvoru suvog izolata u lakoj fazi. <sup>b</sup> Hloroformski izolat.

<sup>c</sup> Trihloretilenski izolat; EtOH- etilalkohol.

### 3.4.3.2 Uticaj rastojanja između pločica na efikasnost kontinualne protivstrujne frakcione ekstrakcije tečnost-tečnost

Rastojanje između perforiranih pločica vibracione mešalice, odnosno broj pločica u vibracionom setu, utiče na disipacionu energiju i intenzitet mešanja u sistemu, što se odražava na veličinu kapi i zadržavanje (hold-up) dispergovane faze i brzinu međufaznog prenosa mase, pa otuda i na efikasnost razdvajanja sekundarnih glikozida kontinualnom ekstrakcijom tečnost-tečnost. Rezultati ispitivanja uticaja rastojanja između perforiranih pločica u kolonama visine 2 i 4 m na stepen ekstrakcije Dgx u lakoj i teškoj fazi iz napojnog rastvora izolata smeše sekundarnih glikozida rastvorenih u zasićenoj teškoj fazi sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15:20:30 vol., pri uvođenju napojnog rastvora na dnu, sredini i vrhu kolone prikazani su na slici 3.14, respektivno. Uticaj rastojanja između pločica vibracione mešalice na raspodelu Dgx u lakoj i teškoj fazi, pod istim ostalim operativnim uslovima, zavisi od mesta uvođenja napojnog rastvora u kolonu i visine kolone. Kada se napojni rastvor izolata uvodi na dnu ili sredini kolona visine 2 i 4 m, najveći stepen

ekstrakcije Dgx u lakoj fazi (EtOH:H<sub>2</sub>O=35:15 vol.) postiže se pri rastojanju između perforiranih pločica od 2,5 cm. Maksimalni stepen ekstrakcije Dgx u lakoj fazi iz napojnog rastvora izolata smeše sekundarnih glikozida rastvorenih u lakoj fazi iznosi oko 98 %, kada se napojni rastvor uvodi na sredini kolone visine 4 m.

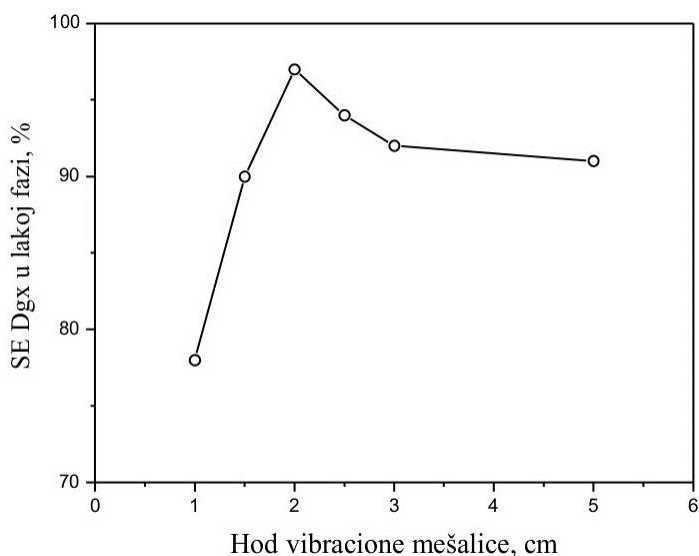


**Slika 3.14** Stepen ekstrakcije Dgx u a) lakoj i b) teškoj fazi sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE = 35:15:20:30 vol. u zavisnosti od rastojanja između perforiranih pločica i visine kolone (visina kolone, m: 2 - ■ i 4 - ●; mesto uvođenja napojnog rastvora izolata rastvorenih u lakoj fazi u kolonu: na dnu - puni simboli i na sredini - prazni simboli; polazna koncentracija izolata rastvorenog u lakoj fazi: 10 g/dm<sup>3</sup>; vibracije mešalice: 3 cm; frekvencija vibracije: 120 min<sup>-1</sup>; protok napojnom rastvoru izolata rastvorenog u lakoj fazi koja se uvodi na dnu i sredini: 3 i 1,5 dm<sup>3</sup>/h, respektivno; protok lake faze koja se uvodi na dnu kolone kolone kada se napojni rastvor uvodi na sredini kolone: 1,50 dm<sup>3</sup>/h: protok teške faze koja se uvodi na vrhu kolone: 3,3 dm<sup>3</sup>/h)

### 3.4.3.3 Uticaj hoda seta na efikasnost kontinualne protivstrujne frakcione ekstrakcije tečnost-tečnost

Uticaj veličine hoda vibracionog seta na efikasnost kontinualne protivstrujne frakcione ekstrakcije tečnost-tečnost ispitivan je u koloni visine 4 m u koju je napojni rastvor izolata smeše sekundarnih glikozida rastvorenih u teškoj fazi sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE sastava 35:15:20:30 vol. uveden na sredini kolone. Koncentracija izolata u napojnom rastvoru je bila 10 g/dm<sup>3</sup>. Odnos protoka lake i teške faze je bio 1:1,1 vol. Hod vibracionog seta je variran u opsegu 1-5 cm, dok su rastojanje između pločica (2,5 cm) i frekvencija vibracije (120 min<sup>-1</sup>) bili nepromenjeni. Rezultati ispitivanja uticaja hoda vibracionog seta na stepen ekstrakcije Dgx prikazani su na slici 3.15. Sa povećanjem

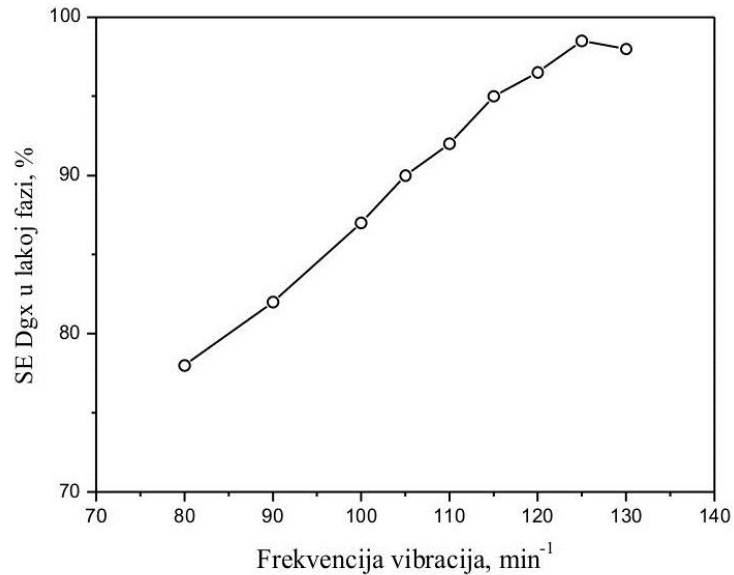
hoda vibracionog seta do 2 cm povećava se stepen ekstrakcije Dgx, a zatim opada. Najveći stepen ekstrakcije Dgx u koloni visine 4 m iznosi 97 % i ostvaruje se pri hodu vibracionog seta od 2 cm.



**Slika 3.15** Uticaj hoda vibracione mešalice na stepen ekstrakcije Dgx u koloni visine 4 m pri uvođenju napojnog rastvora izolata smeše sekundarnih glikozida rastvorenih u teškoj fazi sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE sastava 35:15:20:30 vol. na sredini kolone (koncentracija izolata smeše sekundarnih glikozida u teškoj fazi: 10 g/dm<sup>3</sup>; odnos protoka lake i teške faze: 1:1,1 vol.; rastojanje između pločica: 2,5 cm; frekvencija vibracije: 120 min<sup>-1</sup>)

#### 3.4.3.4 Uticaj frekvencije vibracije na efikasnost kontinualne protivstrujne frakcione ekstrakcije tečnost-tečnost

Uticaj frekvencije vibracije na efikasnost kontinualne protivstrujne frakcione ekstrakcije tečnost-tečnost ispitivan je u koloni visine 4 m. Napojni rastvor izolata smeše sekundarnih glikozida rastvorenih u teškoj fazi sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE sastava 35:15:20:30 vol. uvođen je na sredini kolone. Koncentracija izolata u napojnom rastvoru je bila 10 g/dm<sup>3</sup>. Odnos protoka lake i teške faze je bio 1:1,1 vol. Frekvencija vibracije je varirana u opsegu 80-130 min<sup>-1</sup> (slika 3.16), dok su rastojanje između pločica (2,5 cm) i vibracije seta (2 cm) bili nepromenjeni. Rezultati ispitivanja uticaja frekvencije vibracije na stepen ekstrakcije Dgx prikazani su na slici 3.16. Najveći stepen ekstrakcije Dgx od 97 % ostvaruje se pri frekvenciji vibracije 125 min<sup>-1</sup>.



**Slika 3.16** Uticaj frekvencija vibracije na stepen ekstrakcije Dgx u koloni visine 4 m pri uvođenju napojnog rastvora izolata smeše sekundarnih glikozida rastvorenih u teškoj fazi sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE sastava 35:15:20:30 vol. na sredini kolone (koncentracija izolata smeše sekundarnih glikozida u teškoj fazi: 10 g/dm<sup>3</sup>; odnos protoka lake i teške faze: 1:1,1 vol.; rastojanje između pločica: 2,5 cm; hoda vibracionog seta: 2 cm)

### 3.4.3.5 Uticaj koncentracije napojnog rastvora izolata smeše sekundarnih glikozida na efikasnost kontinualne protivstrujne frakcione ekstrakcije tečnost-tečnost

Uticaj koncentracije napojnog rastvora izolata smeše sekundarnih glikozida na efikasnost kontinualne protivstrujne frakcione ekstrakcije tečnost-tečnost ispitivan je u koloni visine 4 m. Napojni rastvor izolata smeše sekundarnih glikozida rastvorenih u teškoj fazi sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE sastava 35:15:20:30 vol. uveden je na sredini kolone. Koncentracija izolata u napojnom rastvoru je varirana u opsegu 10-50 g/dm<sup>3</sup>. Odnos protoka lake i teške faze je bio 1:1,1 vol. Frekvencija vibracije (125 min<sup>-1</sup>), rastojanje između pločica (2,5 cm) i hod vibracionog seta (2 cm) bili su nepromenjeni. Rezultati ispitivanja koncentracije napojnog rastvora izolata smeše sekundarnih glikozida na stepen ekstrakcije Dgx prikazani su u tabeli 3.20. Sa povećanjem koncentracije izolata smeše sekundarnih glikozida u teškoj fazi koja se uvodi na sredini kolone kao napojni rastvor do 45 g/dm<sup>3</sup> ostvaruje se visok stepen ekstrakcije Dgx iz teške u laku fazu (preko 99 %).



**Tabela 3.20** Uticaj koncentracije napojnog rastvora izolata smeše sekundarnih glikozida na stepen ekstrakcije Dgx iz napojnog rastvora izolata u teškoj fazi sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE sastava 35:15:20:30 vol. pri uvođenju napojnog rastvora na sredini kolone visine 4 m (odnos protoka lake i teške faze: 1:1,1 vol; rastojanje između pločica: 2,5 cm; hod seta: 2,0 cm; frekvencija vibracije (125 min<sup>-1</sup>))

Koncentracija izolata u napojnom rastvoru (g/L)	Stepen ekstrakcije Dgx u lakoj fazi iz napojnog rastvora izolata u teškoj fazi (%)
10	98,0
20	98,5
30	99,0
40	99,0
45	99,0
50	88,0

Pod optimalnim uslovima za kolonu visine 4 m na eksperimentalnom postrojenju je proizvedeno 300 g kristalnog digoksina visoke čistoće 99,90 % i stepen ekstrakcije (99 %) iz trihloretilenskog izolata smeše sekundarnih glikozida (sastav trihloretilenskog izolata dobijenog iz perkolata: Dx 39 %, Gx 12 %, Dgx 50,0 % i ukupni glikozidi 102 %).

### **3.5 KVALITATIVNE I KVANTITATIVNE KARAKTERISTIKE IZOLOVANOG DIGOKSINA**

Kvalitativne i kvantitativne karakteristike pet uzoraka Dgx izolovanog metodama frakcionog rastvaranja suvih trihloretilenskog izolata u smeši aceton-voda, diskontinualnom ekstrakcijom tečnost-tečanost u levcima za odvajanje i kontinualnom protivstrujnom frakcionom ekstrakcijom tečnost-tečanost u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni određene su metodama propisanim u Ph. Eur., 7<sup>th</sup> Ed.(2012) i date u tabelama 3.21 i 3.22. Kvalitativne i kvantitativne karakteristike svih izolovanih uzoraka odgovaraju zahtevima ove farmakopeje i pokazuju da je izolovani Dgx visoke čistoće (98,6-100,2 %, tabela 3.20), što potvrđuju i uporedni HPLC hromatogrami (slika 3.17) i uporedni FT-IR spektri (slika 3.18) standarda i izolovanog Dgx.

**Tabela 3.22** Kvalitativne karakteristike izolovanog Dgx

<b>Parametar<sup>a</sup></b>	<b>Uzorak 1</b>	<b>Uzorak 2</b>	<b>Uzorak 3</b>	<b>Uzorak 4</b>	<b>Uzorak 5</b>
<b>Izgled</b> (beo ili skoro beo prašak ili bezbojni kristali)	Odgovara	Odgovara	Odgovara	Odgovara	Odgovara
<b>Identifikacija</b> Vrši se na osnovu FT-IC spectra (Metod: 2.2.24)	Odgovara	Odgovara	Odgovara	Odgovara	Odgovara
<b>Bistrina rastvora:</b> Bistar (Metod: 2.2.1)	Odgovara	Odgovara	Odgovara	Odgovara	Odgovara
<b>Boja:</b> Bezbojan (Metod: 2.2.2 - metod II)	Odgovara	Odgovara	Odgovara	Odgovara	Odgovara
<b>Specifična optička rotacija (°):</b> +13,9 do +15,9 izračunato na suhu supstancu (Metod: 2.2.7)	14,5	15,2	15,2	14,0	15,0
<b>Gubitak sušenjem (%):</b> max 1,0 (Metod: 2.2.32)	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2
<b>Sulfatni ostatak:</b> max 0,1 % (Metod: 2.4.14)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

<sup>a</sup> Određivanje parametara izvršeno metodama propisanim Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed., (2012).

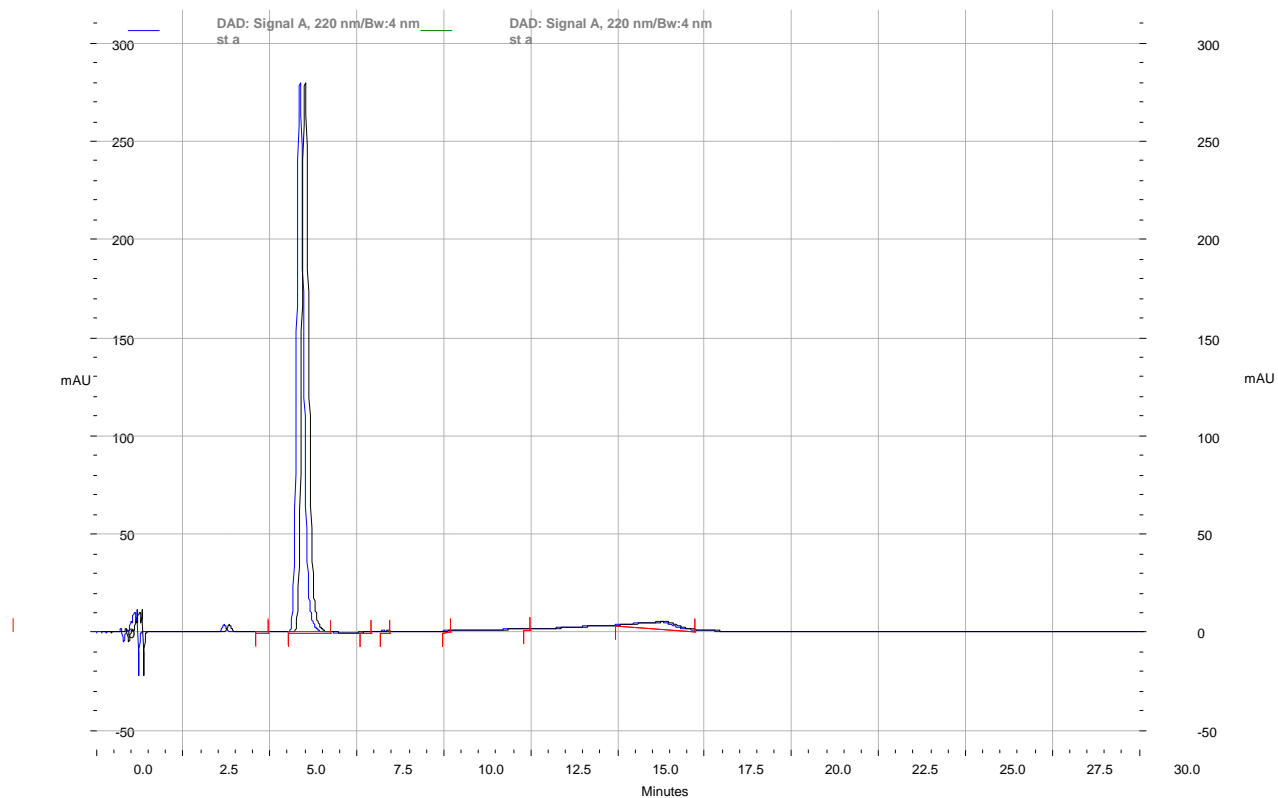
**Tabela 3.19** Kvantitativne karakteristike izolovanog Dgx

Parametar <sup>a</sup>	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	Uzorak 4	Uzorak 5
<b>Sadržaj necistoca E (diginatin) (%) :</b> max 1,0 (Metod: 2.2.29.)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Sadržaj necistoca K (digoksi-igenin tetrakis-digitoksozide) (%) :</b> max 1,0 (Metod: 2.2.29.)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Sadržaj necistoće L (%)</b> max 0,3 (Metod: 2.2.29.)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Sadržaj necistoće G (neodigoksin) (%) :</b> max 0,8 (Metod: 2.2.29.)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Sadržaj necistoće A(digitoksin) (%) :</b> max 0,5 (Metod: 2.2.29.)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Sadržaj necistoće B (gitoksin) (%) :</b> max 0,5 (Metod: 2.2.29.)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Sadržaj necistoće F (digoksigenin bisdigitoksozid) (%) :</b> max 2,5 (Metod: 2.2.29.)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Sadržaj necistoće C(digoxigenin) (%) :</b> max 1,0 (Metod: 2.2.29.)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Sadržaj bilo koje druge necistoće (%) :</b> max 0,2 (Metod: 2.2.29.)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Sadržaj digoksina (%) :</b> HPLC:96,0-102,0 (Metod: 2.2.29.)	99,8	98,7	100,2	98,8	98,6
<b>FT-IC-spektar</b> (Metod: 2.2.24)	Odgovara	Odgovara	Odgovara	Odgovara	Odgovara

<sup>a</sup> Određivanje parametara izvršeno metodama propisanim Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed., (2012).

### 3.5.1 HPLC hromatogrami izolovanog i standardnog digoksina

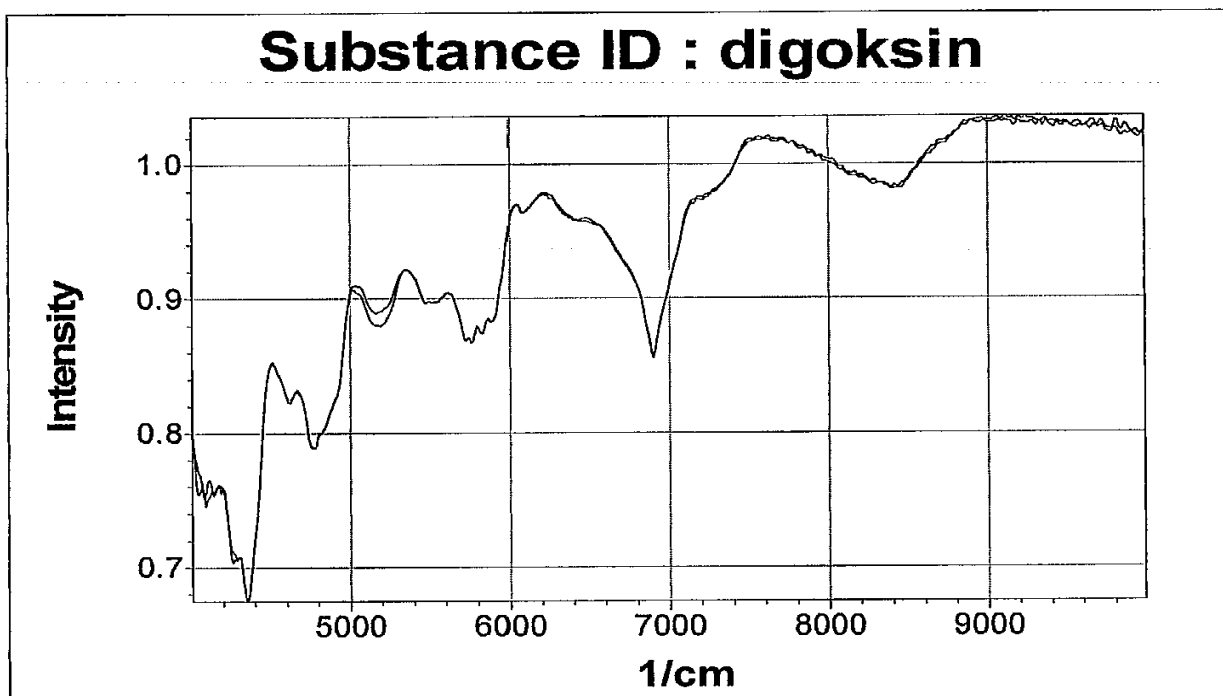
Dobijeni rezultati HPLC analizom potvrđuju rezultate sadržaja i čistoće pet izolovanih uzoraka digoksina, čije su karakteristike date u tabeli 3.22. Hromatogrami izolovanog i standardnog Dgx su identični, kao što potvrđuje slika 3.17. Izolovani Dgx odgovara zahtevima Ph. Eur. 7<sup>th</sup> Ed. (2012), Metod: 2.2.29, i visoke je čistoće 98-100,2 % u odnosu na standardni Dgx.



**Slika 3.17** HPLC hromatogrami izolovanog i standardnog Dgx (Uređaj: Agilent 1100 Series. Kolona: dužina = 0,15 m,  $\text{\O} = 3,9$  mm; stacionarna faza: oktadecilsilil-silikagel za hromatografiju (5  $\mu\text{m}$ ). Mobilna faza A: acetonitril:voda 10:90 vol. Mobilna faza B: acetonitril:voda 90:10 vol. Promenljiv gradijent koncentracija faza prema Ph. Eur. 7th Ed., Metod: 2.2.29. (2012). Detekcija: 220 nm. Brzina protoka: 1,5 ml/min. Zapremina injektiranja: 10  $\mu\text{l}$ . Sobna temperatura).

### 3.5.2. FT-IR spektri izolovanog i standardnog digoksina

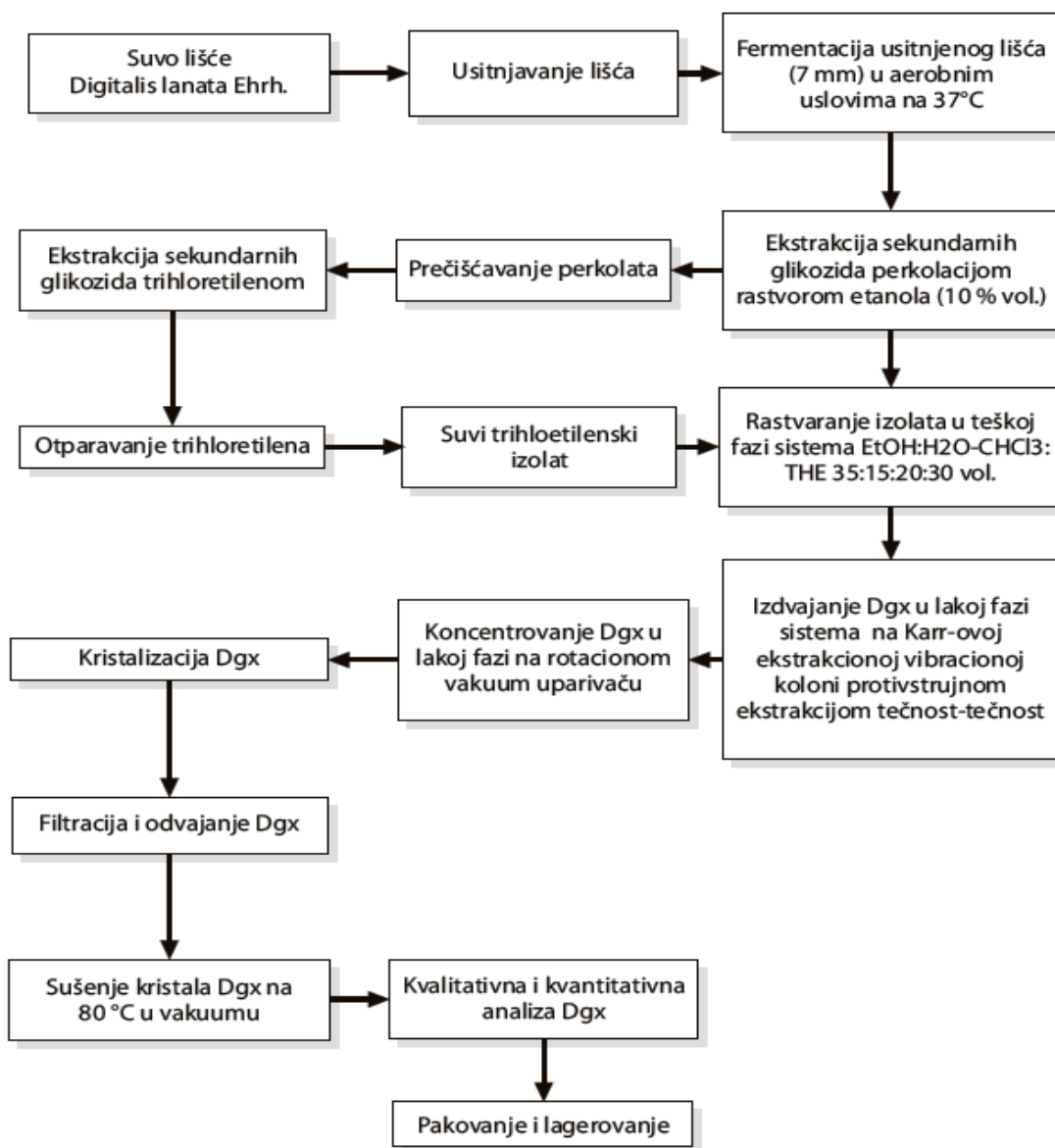
Snimanje FT-IR spektara izvršeno je u KBr pastili prema Ph. Eur., 7<sup>th</sup> Ed. (2012), Metod: 2.2.24. Uporedni FT-IR spektri izolovanog i standard Dgx prikazani su na slici 3.18, koji potvrđuju njihovu identičnost.



**Slika 3.18.** FT-IR spektri izolovanog i standardnog Dgx u KBr pastili (uređaj: FT-IR spektrophotometer Bomem, Hartman & Braun MB-series 100, USA)

### 3.6 TEHNOLOŠKI POSTUPAK DOBIJANJA DIGOKSINA IZ LIŠĆA *Digitalis lanata* Ehrh.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja u ovom radu definisan je optimalni tehnološki postupak izolacije Dgx iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. koji je prikazan na slici 3.19. Glavne faze tehnološkog postupka su: 1) usitnjavanje suvog lišća *Digitalis lanata* Ehrh., 2) fermentacija nakvašenog biljnog materijala, 3) ekstrakcija sekundarnih glikozida perkolacijom rastvorom etanola (10 % vol.), 4) prečišćavanje perkolata, 5) ekstrakcija sekundarnih glikozida trihloretilenom, 6) dobijanje suvog ekstrakta otparavanjem trihloretilena, 7) rastvaranje izolata u teškoj fazi sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-CHCl<sub>3</sub>:THE 35:15:20:30 vol., 8) izdvajanje Dgx u lakoj fazi sistema na Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni protivstrujnom ekstrakcijom tečnost-tečnost, 9) koncentrovanje rastvora Dgx u lakoj fazi, 10) kristalizacija Dgx, 11) filtracija i sušenje kristala i 12) pakovanje i lagerovanje.



**Slika 3.19** Optimalni tehnološki postupak izolacije Dgx iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh.

## 4. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivana fermentacija suvog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. kojom se LA, LB i LC transformišu u sekundarne glikozide Dx, Gx i Dgx, ekstrakcija sekundarnih glikozida perkolacijom vodeno-alkoholnim rastvorima (10-50 % vol.), prečišćavanje dobijenih perkolata, dobijanje suvih hloroformskih i trihloretilemskih ekstrakata (izolata) smeše sekundarnih glikozida iz perkolata i izolacija digoksina visoke čistoće (preko 96 %) iz rastvora izolata frakcionim rastvaranjem i ekstrakcijom tečnost-tečnost. Sprovedenim istraživanjima došlo se do sledeći najvažnijih rezultata:

**4.1** Definisani su optimalni operativni uslovi fermentacije samlevenog suvog lišća *Digitalis lanata* Ehrh. u anaerobnim uslovima na 37 °C: srednji prečnik delova samlevenog biljnog materijala 7 mm i odnos voda-biljni materijal 1:2 m/v.

**4.2** Određeni su optimalni operativni uslovi ekstrakcije Dgx perkolacijom iz fermentisanog biljnog materijala: srednji prečnik delova samlevenog biljnog materijala 7 mm, visina punjenja perkolatora biljnim materijalom 30 cm, rastvarač za perkolaciju (rastvor etanola 10% vol.) i protok perkolata 4 dm<sup>3</sup>/h (odnosno vreme zadržavanja perkolata u perkolatoru 4 h), pri kojima je ostvaren stepen ekstrakcije Dgx veći od 95 %.

**4.3** Šest novih postupaka prečišćavanja tečnih ekstrakata sekundarnih glikozida dobijenih perkolacijom su razvijena i primenjena u ovom radu. Optimalni postupak uključuje ekstrakciju hloroformom ili trihloretilenom, koncentrovanje dobijenog tečnog ekstrakta uparavanjem pod vakuumom, obradu sa magnezijum-oksidiom, filtraciju pod vakuumom i isparavanje rastvarača pod vakuumom (60 °C). Ovim postupkom je dobijen suvi ekstrakt (izolat) sa sadržajem smeše sekundarnih glikozida od oko 80 %.

**4.4** Dgx visoke čistoće (preko 96 %) je izolovan frakcionim rastvaranjem nečistoća suvog izolata smeše sekundarnih glikozida u smeši aceton-voda (7:1 do 10:1 vol.) uz refluks.

**4.5** Diskontinualnim ili kontinualnim postupkom ekstrakcije tečnost-tečnost izvršeno je dalje prečišćavanje Dgx iz suvih ekstrakata (izolata). Prvi postupak je izveden u levkovima za odvajanje (15 levkova sa lakom fazom i 15 levkova sa teškom fazom) korišćenjem sistema EtOH:H<sub>2</sub>O-

$\text{CHCl}_3:\text{THE} = 35: 15:20: 30$  vol. čije su laka i teška faza međusobno zasićene pri koncentraciji sekundarnih glikozida rastvorenih u lakoj fazi od  $15 \text{ g/dm}^3$  i odnosu zapremina lake i teške faze 1:1,1 vol. Laka faza je uparena do  $1/3$  polazne zapremine, posle čega su kristali Dgx odvojeni filtracijom pod vakuumom i sušeni. Prinos Dgx je bio 98 %, a čistoća 99 %. Drugi postupak kontinualnog prečišćavanja je izveden u Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni sa protivstrujnim proticanjem lake i teške faze. Najveći stepen ekstrakcije Dgx (preko 99 %) u lakoj fazi ostvaruje se uvođenjem napojnog rastvora smeše sekundarnih glikozida (izolata), koncentracije  $45 \text{ g/dm}^3$  u teškoj fazi, na sredini kolone visine 4 m korišćenjem sistema rastvarača  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}-\text{CHCl}_3:\text{THE} = 35: 15:20: 30$  vol. Pri odnosu protoka lake i teške faze 1:1,1 vol., rastojanju između pločica 2,5 cm, hodu vibracionog seta 2 cm i frekvenciji vibracije  $125 \text{ min}^{-1}$ . Ovim postupkom dobijen je Dgx čistoće oko 99 %. Metodama propisanim oficijelnom farmakopejom (Ph. Eur., 7<sup>th</sup>Edition, 2012) potvrđeno je da finalni proizvod sadrži 98,6-100,2 % Dgx.

**4.6** Razvijen je optimalni tehnološki postupak dobijanja Dgx visoke čistoće (99 %) iz fermentisanog lišća *Digitalis lanata* Ehrh., koji se sastoji iz sledećih glavnih faza: 1) usitnjavanje suvog lišća *Digitalis lanata* Ehrh., 2) fermentacija nakvašenog biljnog materijala, 3) ekstrakcija sekundarnih glikozida perkolacijom rastvorom etanola (10 % vol.), 4) prečišćavanje perkolata, 5) ekstrakcija sekundarnih glikozida trihloretrenom, 6) dobijanje suvog ekstrakta otparavanjem trihloretrena, 7) rastvaranje izolata u teškoj fazi sistema  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}-\text{CHCl}_3:\text{THE} 35:15:20:30$  vol., 8) izdvajanje Dgx u lakoj fazi sistema na Karr-ovoj ekstrakcionoj vibracionoj koloni protivstrujnom ekstrakcijom tečnost-tečnost, 9) koncentrovanje rastvora Dgx u lakoj fazi, 10) kristalizacija Dgx, 11) filtracija i sušenje kristala i 12) pakovanje i lagerovanje.



## LITERATURA

Abraham D.J. (ed.), Burger's medicinal chemistry and drug discovery, 4 Sixth Edition, Vol. 3: Cardiovascular agents and endocrines, Wiley, Hoboken, N.J. (2003).

Baumgarten G., Herzwirksame glycoside in Digitalis Arten, Verlag Georg Thieme, Leipzig (1963).

Baird M.H.I., Rama Rao N.V., The reciprocating plate coloumn-development and applications, Chem. Eng. Comm. 116 (1992) 67-88.

Cayley W.E. Jr., Digoxin in chronic heart failure, Fam. Pract. 21 (2004) 469–472.

Coulson J. M. Richardson J.F., Backhurst J. R., Harker J. H., Chemical Engineering, Vol. 2, 4<sup>th</sup> ed., Particle technology and separation processes, Pergamon Press, Oxford (1991).

Cusack, R., Karr, A., A Fresh look at liquid-liquid extraction. Extractor design and specification, 98(4) Chem. Eng. (1991).

Duke J.A., CRC Handbook of medicinal herbs, CRC Press, Boca Raton, Florida (1987).

Dorđević S., Stnković M., Određivanje uslova ekstrakcije vunastog digitalisa smešom rastvarača, Hem. Ind. 12 (1977) 633-690.

Felth J., Rickardson L., Rosén J., Wickström M., Fryknäs M., Lindskog M., Bohlin L., Gullbo J., Cytotoxic effects of cardiac glycosides in colon cancer cells, alone and in combination with standard chemotherapeutic drugs, J. Nat. Prod. 72(11) (2009) 1969–1974.

Fonin V.S., Khorlin A.Y., Preparation of biologically transformed raw material of woolly foxglove (*Digitalis lanata* Ehrh.) and isolation of digoxin therefrom, Appl. Biochem. Microbiol. 39(5) (2003) 588 - 592.

Foerest W. (Ed.), Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, Urban and Schwarzenberg, München-Berlin, Bd. 8 (1957) 222-236.

Fuchs L., Jachs H., Untersuchungen über die fermentative Aktivität von Digitalisblättern. 5. Mitteilung über Digitalisglykoside, Pharmaz., 15 (1960) 648-650

Hegnauer R., Chemotaxonomie der Pflanzen, Band 4, Birkhauser Verlag, Basel and Stuttgart, (1996).

Heinrich M, Barnes J, Gibbons S., Williamson E. M., Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Luis, Sydney, Toronto, (2004).

Haynes L.J., Stuart K.L., Alkaloids from croton species. I. Isolation of alkaloids from *C. linearis*, and the detection of alkaloids in *C. glabellus*, *C. humilis*, and *C. flavens*, J. Chem. Soc. (1963) 1784-1748. DOI:10.1039/jr9630001784.

Heyberger A.; Triska J, Rouskova, M., Krticka M., Method and apparatus for obtaining phytosterols, Czech. Rep. CZ 301716 B6 20100602 (2010).

Hiermann, A.; Springer, U., Studies on the flavonoid content in leaves and blooms of *Digitalis lanata* Ehrh. during various stages of development, Scient. Pharmac. 47(3) (1979) 173-81.

Hu, X.; Wang, X.; Yang, H., Caffeine extraction with a Karr reciprocating plate column, Engin. Life Sci. 3(10) (2003) 416-423.;

Juillièrè Y., Selton-Suty C., Digoxin therapy: A persisting interest despite contrary winds, Arch. Cardiovasc. Dis. 103 (2010) 281—284.

Karr, A., KARR@ reciprocating plate extraction column, Bulletin KC-3, Chem - Pro Corporation (1997).

Kišgeci J., Adamović D., Kota E., Proizvodnja lekovitog bilja, Nolit, Beograd (1987).

Kišgeci J., Jelačić S., Beatović D., Lekovito, aromatično i začinsko bilje, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet , Beograd (2009).

Koch modular process systems, LLC, Extraction technology group, AIChE National Meeting, Nashville, TN, (2009), [www.liquid-extraction.com](http://www.liquid-extraction.com).

Liu H.Z., Eugene H., A hearty solution for acute myeloid, leukemia, Acta Pharmacol. Sin. 33(1) (2012) 1-2.

List L., Hörnhammer P.H., Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, vollständige (vierte) Neuausgabe, Band IV, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg - New York (1973).

Lo T.C., Baird M.H.I., Rao N.V.R., The reciprocating plate column – development and applications, Chem. Engin. Comm. 116 (1992) 67-88.

Müller E., Berger R., Blass E., Sluyts D., Pfennig A., Ullman's encyclopedia of industrial chemistry, Wiley-VCH, Weinheim (2008).

Mijatovic T., Van Quaquebeke E., Delest B., Debeir O., Darro F., Kiss R., Cardiotoxic steroids on the road to anti-cancer therapy, Biochim. Biophys. Acta 1776 (2007) 32–57.

Nadav S., Cardiac glycoside analogs such as digoxin in combination with emodin for cancer therapy, U.S. Pat. 2012/0122807 A1, Appl. Publ., (2012).

Newman R.A., Yang P., Pawlus A.D., Block K.I., Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents, Molecul. Intervent. 8(1) (2008) 36-49.

Nie Q.H, Cheng Y. Q, Xie Y. M, Zhou Y.X, Cao Y. Z., Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. World J. Gastroenterol. 7(3) (2001) 363-369.

Nie Q, Wang J., Qiuxiang Y., Separation and purification of two isomeric steroids by a novel extractive drowning out crystallization, Sep. Purif. Techn. 50 (2006) 342–346.

Nyaradi-Szabady, Variability of some yield components in *Digitalis lanata* Ehrh., Herba Hung. 2(3) (1982) 39-47.

Othmer D.F., Baird M.H.I., Rao N.V., The reciprocating plate column - development and applications, Chem. Eng. Comm. 116 (1992) 67-88.

Patel M.P., Yannis P.M., Gobin Y., Pierre G., Daballah .Y, Hakim D., Brian M., Ira J., Brodie D., Scott B., Christophe A., Folberg, R. Abramson D. H., Intra-arterial and oral digoxin therapy for retinoblastoma, Ophthalm. Gen. 32(3) (2011) 147-150.

Pekić B.S., Određivanje, preparativno dobijanje i hemijske transformacije lanatozida iz lišća *Digitalis lanata* Ehrh, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad (1972).

Pekić B.S., Stanković M.Z., Dobijanje sekundarnih glikozida iz lišća digitalisa, Hem. Ind. 12 (1973) 551-553.

Pekić B.S., Tolić A., Razvoj postupka za kontinualno izdvajanje lanatozida C iz kompleksa lanatozida A, B i C, Arh. farm. 31(3) (1980) 95-99.

Ph. Eur. 7th Edition (2012), online (7.3-7.5)., <http://online.edqm.eu>

Picazo, J.C., Tapia S, Eleazar E., Petriciolet, A.B., Isolation of capsaicinoids from *Capsicum* fruit, Afinidad 65(536) (2008) 307-313.

Pitra J., Herak P., Cardiac glycosides. XII. Digoxin, the fermented drug of undulating foxglove (*Digitalis lanata* Ehrh.), Česl. Farmac. 4 (1972) 142-144.

Ponomarev, V.D., Ekstragirovanie lekarstvennogo syrja, Medicina, Moskva (1976).

Prieve D.C., Unit operation of chemical engineering, Department of Chemical Engineering, Carnegie Mellon University, Spring (2000).

Stanković M., Ispitivanje nadzemnog dela i klica krompira (*Solanum tuberosum* L.) kao izvora steroidnih jedinjenja, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd (1984).

Stanković M.Z., Ispitivanje mogućnosti dobijanja primarnih i sekundarnih glikozida iz lišća *Digitalis lanata* Erh., Magistarski rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd (1979).

Stanković M.Z., Cakić M.D., Cvetković D.M., Veljković V.B., Kinetics of extraction of resinoids from overground parts of sweet clover (*Melilotu officinalis* L.), J. Serb. Chem. Soc. 59(10) (1994) 735-741.

Stankovic M., Đorđević S., Stankovic, S., Stojanovic O., Study of the effect of drying on the Digitalis glycoside content in the leaves of *Digitalis lanata*, Hem. Ind. 37(9) (1983) 209-18.

Stanković M., Stamenković D., Banković V., Ekstrakcija sekundarnih glikozida iz fermentisanog lišća vunastog digitalisa razblaženim alkoholom i vodom, Hem. Ind. 35(5) (1981) 128-131.

Stanković M., Đorđević S., Stanković S., Stojanović O., Enzimske transformacije primarnih glikozida vunastog digitalisa, Hem. Ind. 37(10) (1983) 241-247.

Stanković M., Đorđević S., Selective enzymatic transformation of lanatozide A, Acta Pharm. (Weinheim) 320 (1987) 767-768.

Stoll A., Hofmann A., Kreis W., Cardiac glucosides. XII. Glucoside-splitting enzymes of digitalis leaves, Z. Physiol. Chem. 235 (1935) 249-264.

Stoll A., Kreis W., Acetyldigitoxin, Acetylgitoxin und Acetyldigoxin (5. Mitteilung über Herzglucoside), Helv. Chim. Acta 17(1) (1934) 592-613.

Stoll A., Renz J., Brack A., Spaltung von Herzglykosiden durch Pilzenzyme. 24. Mitteilung über Herzglykoside, Helv. Chim. Acta 34 (1951) 397-401

Stoll A., Renz J., Herzwirksame Glykoside in *Digitalis*-Arten, Verh. Naturforsch. Gesellsch. Basel 67 (1956) 392-446.

Shen S., Chang Z., Liu J., Sun X., Hu X., Liu H., Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* fisch extract by three-liquid-phase extraction systems, Sep. Purif. Technol. 53 (2007) 216–223

Tang D.-S., Zhang L.; Chen H.-L, Liang Y.-R., Liang Y.-R., Lu J.-R., Lu J.-L., Liang H.L., Zheng X.-Q., Extraction and purification of solanesol from tobacco (I). Extraction and silica gel column chromatography separation of solanesol, Sep. Purif. Techn. 56 (2007) 291–295.

Treybal R.E., Mass transfer operation, 3th ed., McGraw-Hill, Singapore (1985).

Tolić A.Š, Operacije ekstrakcije tečno-tečno, Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu, Novi Sad (1983).

USP-NF-30, Online Subscription (2012), <http://www.uspnf.com/uspnf/login>

Veljković V., Milenović D., Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hypericum perforatum* L.) II. Poređenje modela kinetike ekstrakcije, Hem. Ind. 56(2) (2002) 60-67.

Veljković V.B., Stamenković O.S, Tasić M.B., Milojević S.Ž, Milosavljević M M., Toplotne i difuzione operacije, Teorija prenosa mase, Tehnološki fakultet, Leskovac, (2012).

Žurkowska J., Adamiec A., Isolation, purification and properties of digilanidase from barley malt, Herba Polon. 21(3) (1975) 270-276.

Weiss R.F., Lehrbuch der Phytoterapie, Hippokrates Verlag, Stuttgart (1985).

Hu X., Wang X, Yang H., Caffein extraction with a Karr reciprocating plate column, Eng. Life Sci. 3(10) (2003) 416-223.

Xu W.L., Huang Y.B., Qian J.H., Sha O., Wang Y.Q., Separation and purification of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from phytosterol mixtures by solvent crystallization method, Sep. Pur. Technol. 41 (2005) 173–178.

Wichtl M., Digitalis vom foxglove zum  $\beta$ -methyldigoxin, Pharmaz. unserer Zeit 7(2) (2006) 33-45.

Zhou S., Heras H., Ackman R.G., Preparation and characterization of a water-soluble fraction of crude oil by a Karr reciprocating-plate countercurrent extraction column, Arch. Environment. Cont..Tox. 26(4) (1994) 527-33.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Vesna Novković rođena je 31. marta 1969. godine u Leskovcu, Srbija. Osnovnu i srednju hemijsku školu u Leskovcu završila je sa odličnim uspehom. Studije na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, Univerzitet u Nišu, smer hemijsko i biohemijsko inženjerstvo upisala je 1987/88 i diplomirala 1994. godine. Zaposlila se 1995 godine u Fabrici farmaceutskih i hemijskih proizvoda »Zdravlje« u Leskovcu, gde i sada radi. Poslediplomske studije na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu na smeru Organska hemijska tehnologija i polimerno inženjerstvo - oblast: Prirodni organski proizvodi, završila je sa prosečnom ocenom 10 (deset). Magistarsku tezu pod nazivom : »Kinetika ekstrakcije i karakterizacija bioaktivnih ekstrakata cveta nevena (*Calendula officinalis* L.) odbranila je 2008. Godine

Ima 5 radova u vodećim časopisima nacionalnog značaja, dva rada saopštena na skupu međunarodnog značaja štampana u izvodu, 3 rada saopštena na nacionalnim naučnim skupovima štampana u celini i 11 radova štampana u izvodu. Bila je saradnik u realizaciji dva projekta Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije. Autor je 7 tehnološka i 19 laboratorijska postupka za proizvodnju fitoekstrakata za izradu fitofarmaceutskih preparata, 28 interna propisa u okviru kojih su razvijene nove metode analize biljnih sirovina, fitoekstrakata i masnih ulja biljnog porekla. Svi postupci i metode su bili ili su u primeni u Fabrici farmaceutskih i hemijskih proizvoda »Zdravlje« AD, Leskovac.

Iz dela rezultata doktorske disertacije objavljen je jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu i jedan rad u međunarodnom časopisu:

- 1) Vesna M. Novković, Ljiljana P. Stanojević, Milorad D. Cakić, Radosav M. Palić, Vlada B. Veljković, Mihajlo Z. Stanković, Extraction of digoxin from fermented woolly foxglove foliage by percolation, Sep. Sci. Technol. (2013), doi/10.1080/01496395.2013.864679.
- 2) Novković Vesna M., Stanojević Ljiljana P., Cakić Milorad D., Veljković Vlada B., Stanković Mihajlo Z., Separation of digoxin by liquid-liquid extraction from extracts of foxglove secondary glycosides, Hem. Ind. (2013), doi/10.2298/HEMIND130422040N.

# IZJAVE AUTORA



Прилог 1.

## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Добијање дигоксина из смеше секундарних гликозида *Digitalis lanata* Ehrh.  
различитим техникама екстракције течност-течност

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 04. 02. 2014. год.

Аутор дисертације: Весна М. Новковић

Потпис докторанда:

Весна Новковић





Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Весна М. Новковић

Студијски програм: \_\_\_\_\_

Добијање дигоксина из смеше секундарних гликозида *Digitalis lanata* Ehrh.

Наслов рада: различитим техникама екстракције течност-течност

Ментор: Проф. др Влада Вељковић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 04. 02. 2014. год.

Аутор дисертације: Весна М. Новковић

Потпис докторанда:

Весна Новковић



---

Прилог 3.

**ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Добијање дигоксина из смеше секундарних гликозида *Digitalis lanata* Ehrh. различитим техникама екстракције течност-течност

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
- ③. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 04. 02. 2014. год.

Аутор дисертације: Весна М. Новковић

Потпис докторанда:

Весна Новковић

## ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ

1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци (CC BY 3.0).

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-NC 3.0).

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела (CC BY-NC-ND 3.0).

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прераде (CC BY-NC-SA 3.0).

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-ND 3.0).

6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода (CC BY-SA 3.0).