



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Magistrsko delo

**UPORABA GLOBOKO EVTEKTIČNIH TOPIL KOT ZELENE
ALTERNATIVE ZA EKSTRAKCIJO AKTIVNIH UČINKOVIN
IZ PEGASTEGA BADLJA (*SILYBUM MARIANUM*)**

september, 2020

Manca Merslavič



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Manca Merslavič

**Uporaba globoko evtektičnih topil kot zelene
alternative za ekstrakcijo aktivnih učinkovin iz
pegastega badlja (*silybum marianum*)**

Magistrsko delo

Maribor, 2020



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Uporaba globoko evtektičnih topil kot zelene alternative za ekstrakcijo aktivnih učinkovin iz pegastega badlja (*silybum marianum*)

Magistrsko delo študijskega programa II. stopnje

Študent: Manca Merslavič
Študijski program: magistrski študijski program II. stopnje Kemija
Predvideni strokovni naslov: magister/magistrica kemije
Mentor: doc. dr. Maša Islamčević Razboršek

Maribor, 2020



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Datum: 25. 5. 2020

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Statut UM–UPB 12, Uradni list RS, št. 29/2017) izdajam:

SKLEP O ZAKLJUČNEM DELU

Manca Merslavič, študent-u/-ki študijskega programa 2. stopnje KEMIJA, se dovoljuje izdelati zaključno delo.

Tema zaključnega dela je pretežno s področja katedre za kemijo.

Mentor-ica: doc. dr. MAŠA ISLAMČEVIĆ RAZBORŠEK, prof. biol. in kem.

Naslov zaključnega dela:

UPORABA GLOBOKO EVTEKTIČNIH TOPIL KOT ZELENE ALTERNATIVE ZA EKSTRAKCIJO AKTIVNIH UČINKOVIN IZ PEGASTEGA BADLJA (SILYBUM MARIANUM)

Naslov zaključnega dela v angleškem jeziku:

APPLICATION OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS AS A GREEN ALTERNATIVE FOR EXTRACTION OF ACTIVE SUBSTANCES FROM MILK THISTLE (SILYBUM MARIANUM)

Rok za izdelavo in oddajo zaključnega dela je 25.05.2021. Zaključno delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za izdelavo zaključnega dela« in ga v treh izvodih oddati v pristojnem referatu članice. Hkrati se odda tudi izjava mentor-ja/-ice in morebitne/-ga somentor-ja/-ice o ustreznosti zaključnega dela.

Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na Senat članice v roku 10 delovnih dni od dneva prejema sklepa.

Obvestiti:

- kandidat-a/-ko,
- mentor-ja/-ico,
- somentor-ja/-ico,
- odložiti v arhiv



DEKAN

red. prof. dr. ZDRAVKO KRAVANJA, univ. dipl. inž.
kem. tehnol.



FAKULTETA ZA KEMIJO IN
KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Kazalo

Kazalo.....	I
Izjava.....	III
Zahvala	IV
Povzetek.....	V
Abstract.....	VI
Seznam tabel.....	VII
Seznam slik.....	VIII
Uporabljeni simboli in kratice	IX
1 Uvod.....	1
2 Teoretični del.....	3
2.1 O pegastem badlju.....	3
2.2 Globoko eutektična topila (DES, angl. <i>Deep Eutectic Solvents</i>)	6
2.2.1 Priprava globoko eutektičnih topil	8
2.2.2 Primerjava priprave eutektičnih topil po klasični metodi s pristopom, v katerem se sočasno uporablja mikrovalovno sevanje in ultrazvok	9
2.2.3 Uporaba DES v biodizlu.....	10
2.2.4 Uporaba DES v aromatskih ogljikovodikih.....	11
2.2.5 Uporaba DES v plinih.....	11
2.2.6 Uporaba DES v bioaktivnih spojinah	12
2.3 Teoretične osnove analiznih metod	13
2.3.1 Ultrazvočna ekstrakcija	13
2.3.2 Centrifugiranje.....	15
2.3.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC, angl. <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>).....	16
3 Eksperimentalni del.....	18
3.1 Kemikalije in materiali	18
3.2 Potek dela.....	19
3.2.1 Priprava DES	21
3.2.2 Priprava umeritvene krivulje	23
3.2.3 Optimizacija kromatografske ločbe silimarinov	23
3.2.4 HPLC analiza.....	24
4 Rezultati in diskusija	25
4.1 Delna validacija spektrofotometrične metode.....	25
4.2 Optimizacije kromatografske ločbe silimarinov	26
4.3 Kvantifikacija skupnih silimarinov	31
5 Zaključek	34
6 Literatura	35
7 Priloge	39
7.1 Kromatogram 1. paralelke 80 % EtOH.....	39
7.2 Kromatogram 2. paralelke 80 % EtOH.....	40
7.3 Kromatogram 1. paralelke DES1 (holin klorid : mlečna kislina)	41
7.4 Kromatogram 2. paralelke DES1 (holin klorid : mlečna kislina)	42
7.5 Kromatogram 1. paralelke DES2 (mentol : 1,4-butandiol).....	43
7.6 Kromatogram 2. paralelke DES2 (mentol : 1,4-butandiol).....	44
7.7 Kromatogram 1. paralelke DES3 (holin klorid : 1,4-butandiol).....	45
7.8 Kromatogram 2. paralelke DES3 (holin klorid : 1,4-butandiol).....	46

7.9	Kromatogram 1. paralelke DES4 (holin klorid : urea).....	47
7.10	Kromatogram 2. paralelke DES4 (holin klorid : urea).....	48
7.11	Kromatogram 1. paralelke DES5 (holin klorid : 1,2-propandiol).....	49
7.12	Kromatogram 2. paralelke DES5 (holin klorid : 1,2-propandiol).....	50

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala sama, prispevki drugih so posebej označeni. Pregledala sem literaturo s področja diplomskega dela po naslednjih geslih:

Vir: ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com/>)

Gesla:	Število referenc
silybum marianum and deep eutectic solvents	7
milk thistle and deep eutectic solvents	14
milk thistle and green alternative	929

Vir: COBISS+ (<https://plus.si.cobiss.net/opac7/bib/search/advanced?db=cobib>)

Gesla:	Število referenc
globoko euteklična topila in pegasti badelj	0
globoko euteklična topila in ekstrakcija	3
silimarin	6

Skupno število pregledanih člankov: 55

Skupno število pregledanih knjig: 1

Maribor, september 2020

Manca Merslavič

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici, doc. dr. Maši Islamčević Razboršek, za vse nasvete, strokovno pomoč in srčnost pri sodelovanju ter izvedbi magistrskega dela.

Pravtako bi se rada zahvalila dr. Mileni Ivanović, ki mi je pomagala in me usmerjala pri delu v laboratoriju.

Posebna zahvala pa gre vsem mojim najdražjim.

Uporaba globoko evtektičnih topil kot zelene alternative za ekstrakcijo aktivnih učinkovin iz pegastega badlja (*silybum marianum*)

Povzetek

Magistrsko delo prikazuje študijo priprave globoko evtektičnih topil kot nadomestnega medija škodljivim organskim topilom za ekstrakcijo aktivnih učinkovin iz pegastega badlja. V okviru magistrske naloge smo pripravili pet globoko evtektičnih topil različne sestave ter dodatno 80 % etanol kot konvencionalno organsko topilo in preverjali, katero od njih je najbolj ugodno za ekstrakcijo silimarinov iz pegastega badlja. Za sintezo globoko evtektičnih topil smo uporabili naslednje spojine: holin klorid, mentol, 1,4-butandiol, 1,2-propandiol, mlečno kislino in sečnino. Po HPLC analizi smo iz kromatogramov in enačbe umeritvene premice izračunali, kolikšna je bila koncentracija skupnih silimarinov, ki smo jih ekstrahirali iz posameznega vzorca. Vsa DES topila, razen DES2 (mentol : 1,4-butandiol v razmerju 1 : 2), so bila redčena z vodo, in sicer v razmerju 75 % DES-25 % H₂O.

Ugotovili smo, da se je največ silimarinov sprostilo v 80 % etanolu, ki je polarno protično topilo. Sledili sta globoko evtektični topili iz holin klorida in 1,2-propandiola ter holin klorida in 1,4-butandiola. Njima sta sledili globoko evtektični topili iz holin klorida in mlečne kisline ter holin klorida in uree (sečnine), najmanj silimarinov pa se je sprostilo v globoko evtektično topilo iz mentola in 1,4-butandiola, ki je bilo tudi edino topilo, ki ni vsebovalo vode, torej hidrofobno. Iz rezultatov je razvidno, da je prisotnost vode v topilu pozitivno vplivala na izkoristek ekstrakcije silimarinov iz pegastega badlja, vendar so bile koncentracije skupnih silimarinov, ekstrahiranih iz pegastega badlja, kljub temu izredno nizke, zaradi česar bo v prihodnje potrebnih še veliko raziskav, da bi to lahko izboljšali.

Ključne besede: globoko evtektična topila, pegasti badelj, silimarin, zelena kemija, *silybum marianum*

UDK: 66.061.18:544.015.33(043.2)

Application of deep eutectic solvents as a green alternative for extraction of active substances from milk thistle (*silybum marianum*)

Abstract

This masters thesis presents a study of the preparation of deep eutectic solvents as a substitute medium for harmful organic solvents during the extraction of active substances from milk thistle. As part of this thesis, we prepared five deep eutectic solvents and an additional solvent of 80 % ethanol and studied which is more suitable for the extraction of silymarins from milk thistle. The following compounds were used for synthesis of the deep eutectic solvents: choline chloride, menthol, 1.4-butanediol, 1.2-propanediol, lactic acid and urea. After HPLC analysis, the concentration of total silymarins extracted from each sample was calculated using the chromatograms and the calibration line equation. All deep eutectic solvents except DES2 (menthol : 1.4-butanediol in a ratio of 1 : 2) were diluted with water in a ratio of 75 % DES to 25 % H₂O.

We determined that the 80 % ethanol, which is a polar protic solvent, released the most silymarins. This was followed by deep eutectic solvents made of choline chloride with 1.2-propanediol and then choline chloride with 1.4-butanediol. Those were followed by deep eutectic solvents combining choline chloride with lactic acid and choline chloride with urea. The fewest silymarins were released into the deep eutectic solvent made of menthol and 1.4-butanediol, which was also the only used hydrophobic solvent. The results show that the presence of water in the solvent had a positive effect on the efficiency of silymarin extraction from milk thistle. However, concentrations of total silymarins extracted from the milk thistle using all solvents remained extremely low. Further research will be required to improve upon these results.

Key words: deep eutectic solvents, milk thistle, silymarin, green chemistry, *silybum marianum*

UDK: 66.061.18:544.015.33(043.2)

Seznam tabel

Tabela 1 Imena in sestave vseh pripravljenih DES topil	22
Tabela 2 Potek gradientne elucije pri HPLC analizi	24
Tabela 3 Identificirane komponente in njihovi retencijski časi	30
Tabela 4 Koncentracije skupnih silimarinov v posameznih globoko eutektičnih topilih in v 80 % etanolu	32

Seznam slik

Slika 2-1 Cvet pegastega badlja [27]	4
Slika 2-2 Sedem glavnih aktivnih komponent silimarina	5
Slika 2-3 Holin klorid - najpogosteje uporabljan pri sintezi DES	7
Slika 2-4 Eppendorf centrifuga 5804 R	15
Slika 3-1 Ekstrakcija aktivnih komponent iz pegastega badlja s pripravljenimi DES topili v ultrazvočni kopeli.....	19
Slika 3-2 Produkta ekstrakcije v ultrazvočni kopeli po končanem centrifugiranju	20
Slika 3-3 Vzorci v vialah, prefiltrirani skozi PTFE filtre, pripravljeni za HPLC analizo	20
Slika 3-4 Postopek sinteze globoko evtektičnega topila.....	21
Slika 3-5 DES3 iz holin klorida in 1,4-butandiola s 25 % H ₂ O.....	22
Slika 4-1 Umeritvena premica s 5-odstotnim intervalom zaupanja.....	25
Slika 4-2 HPLC-UV kromatogram standarda flavonolignanov na C18-RP koloni z velikostjo delcev 1,8 µm.....	26
Slika 4-3 HPLC-UV kromatogram standarda flavonolignanov na C18-RP koloni z velikostjo delcev 5 µm.....	27
Slika 4-4 HPLC-UV kromatogram standarda flavonolignanov na C18-RP koloni (velikost delcev 5 µm) ob uporabi acetonitrila kot organske faze v gradientnem programu (pretok 1 mL/min, valovna dolžina 288 nm).....	28
Slika 4-5 HPLC-UV kromatogram standarda flavonolignanov na C18-RP koloni (velikost delcev 5 µm) ob uporabi metanola kot organske faze v gradientnem programu (pretok 1 mL/min, valovna dolžina 288 nm).....	29
Slika 4-6 Tipičen HPLC-UV kromatogram standarda flavonolignanov, analiziranega po optimirani gradientni metodi: mobilna faza A: 100 % metanol in mobilna faza B: 1 % očetna kislina v ultra čisti vodi, čas analize 30 min, valovna dolžina 288 nm.....	30
Slika 4-7 Kromatogram standardne raztopine silimarinov z vsemi karakterističnimi vrhovi	31

Uporabljeni simboli in kratice

Simboli

A	absorbanca (/)
M	molska masa (g mol^{-1})
n	množina (mol)
t_R	retencijski čas (min)
T_T	temperatura tališča ($^{\circ}\text{C}$)
W	masni delež (%)

Grški simboli

γ	masna koncentracija (mg/L)
λ	valovna dolžina (nm)
ν	frekvenca (Hz)

Kratice

DES	globoko eutektična topila (angl. <i>deep eutectic solvents</i>)
ESI-MS	elektrosprej ionizacija z masno spektrometrijo (angl. <i>electrospray ionization-mass spectrometry</i>)
HBD	donor vodikove vezi (angl. <i>hydrogen bond donor</i>)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. <i>high pressure liquid chromatography</i>)
HPLC-MS	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z masno spektrometrijo (angl. <i>high pressure liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
LOQ	meja določljivosti (angl. <i>limit of quantification</i>)
NADES	naravna globoko eutektična topila (angl. <i>natural deep eutectic solvents</i>)
PTFE	politetrafluoroetilen
RPM	obrati na minuto (angl. <i>revolutions per minute</i>)
RSM	metodologija odziva površine (angl. <i>response surface methodology</i>)
r^2	kvadrat korelacijskega koeficienta (angl. <i>the coefficient of determination</i>)
UAE	ultrazvočna ekstrakcija (angl. <i>ultrasound assisted extraction</i>)
UHPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (angl. <i>ultra high pressure liquid chromatography</i>)
QC	koeficient kvalitete (angl. <i>quality coefficient</i>)

1 Uvod

Razvoj industrijske proizvodnje prinaša gospodarski razvoj, ki se odraža v znatnem povečanju življenjskega standarda, hkrati pa povzroča onesnaževanje narave in rušenje ekološkega ravnovesja. Znotraj veje kemije, imenovane zelena kemija, se intenzivno raziskujejo novi, varnejši in energetsko učinkovitejši procesi proizvodnje in uporabe kemikalij, ki temeljijo na kompromisu med gospodarskimi, socialnimi in okoljskimi zahtevami. Eno ključnih vprašanj so okolju prijazna zelena topila, ki bi nadomestila nevarna organska topila, ki so v industriji vseprisotna. Po smernicah zelene kemije mora biti idealno topilo enostavno za uporabo, kemijsko in fizikalno stabilno, nizke hlapnosti in enostavno za reciklažo z možnostjo ponovne uporabe. Do zdaj je bilo število razpoložljivih zelenih topil precej omejeno, vendar so v zadnjih dveh desetletjih ionske tekočine, tj. organske soli s tališčem pod 100 °C, pridobile ogromno pozornosti. V četrto generacijo ionskih tekočin spadajo tudi globoko evtektična topila (DES, angl. *deep eutectic solvents*), ki zaradi svojih ugodnih fizikalno-kemijskih in bioloških lastnosti ter preproste in varčne priprave (nižja cena izhodnih snovi) predstavljajo novo generacijo zelenih topil. Čeprav je priprava evtektičnih topil relativno enostavna, je lahko v nekaterih primerih dolgotrajna ali povzroči karamelizacijo produkta zaradi slabe kontrole temperature med pripravo [1], [2].

Okolju prijazna globoko evtektična topila se v zadnjem času intenzivno uporabljajo na številnih področjih kemije, vključno s pripravo anorganskih materialov, organsko sintezo, biokemijo in analizo kemijo [3]. DES so skupina topil z odličnimi lastnostmi, kot so zanemarljiva hlapnost pri sobni temperaturi, mešajo se z vodo, so negorljiva in zelo viskozna. Lahko delujejo kot učinkovita topila za popolno raztapljanje in ekstrakcijo širokega spektra nepolarnih in polarnih spojin in so predlagana kot alternativa mnogim konvencionalnim in pogosto toksičnim organskim topilom. DES so sestavljena iz mešanice akceptorja vodikove vezi (najpogosteje holin klorid) in donorja vodikove vezi (običajno aminokislina, karboksilne kisline, sladkorji itd.) v trdnem stanju, ki se združijo zaradi nastanka vodikove vezi. Nastala mešanica je evtektična, kar pomeni, da ima nižje tališče kot vsaka komponenta posebej in je tekoča tudi pri zelo nizkih temperaturah. Interakcije vodikovih vezi med posameznimi molekulami DES komponent so odgovorne za visoko ekstraktabilnost in nizka tališča [4], [5].

Določena kombinacija naravnih produktov v trdnem stanju postane tekoča, tako imenovana naravna globoko evtektična topila (NADES, angl. *natural deep eutectic solvents*) so prisotna v naravi in imajo vlogo pri vseh vrstah celičnih procesov v živih organizmih [6]. Prednosti DES so njihova enostavna in cenovno ugodna priprava, biološka razgradljivost ter obnovljivost in netoksičnost uporabljenih reagentov.

Različni DES so bili uporabljeni za raztapljanje zdravil [7], za stabilizacijo naravnih pigmentov [8] ter čiščenje surove nafte [9] in biodizla [10]. Vse več je študij povezanih z uporabo DES kot ekstrakcijskih in separacijskih medijev za bioaktivne rastlinske spojine, vključno s flavonoidi [11], katehini [12], fenolnimi kislinami [13], terpenoidi [14] in saponini [15]. V zadnjih nekaj letih je vedno več raziskav posvečenih kemijski karakterizaciji spojin iz pegastega badlja. Li in sodelavci so razvili 40-minutno HPLC-MS (angl. *high pressure liquid chromatography-mass spectrometry*) metodo za analizo ene od glavnih aktivnih komponent pegastega badlja, tj. silibinina, v plazmi [16]. Hadad in sodelavci so razvili 8-minutno HPLC (angl. *high pressure liquid chromatography*) metodo na monolitnih kolonah za analizo sedmih spojin iz silimarina. Spojine so zaznali glede na njihovo absorbanco pri valovni dolžini 288 nm [17]. Wang in sodelavci so uporabili UHPLC (angl. *ultra high pressure liquid chromatography*) skupaj z elektrosprej ionizacijsko masno spektrometrijo (ESI-MS, angl. *electrospray ionization-mass spectrometry*) za identifikacijo sedmih spojin iz silimarina [18]. Kljub mnogim raziskavam pa do sedaj aktivne učinkovine pegastega badlja še niso bile ekstrahirane z uporabo globoko evtektičnih topil, zato je bil ravno to tudi cilj naše naloge. V sklopu nje smo z zastavljenim obsegom raziskav želeli razviti in vpeljati nove, enostavne, hitre, bolj učinkovite in cenovno ugodne ekstrakcijske metode ob uporabi globoko evtektičnih topil za pripravo kvalitetnih rastlinskih ekstraktov z visoko vsebnostjo aktivnih učinkovin iz pegastega badlja (*silybum marianum*).

2 Teoretični del

V zadnjih desetletjih je okrepitev farmacevtske industrije privedla k hitrejšemu izboljšanju različnih metod za ekstrakcije in separacije bioaktivnih komponent. Pričakuje se, da bodo bioaktivne komponente iz naravnih virov imele ključno vlogo kot esencialni vir v promociji prehranskih dopolnil in novih zdravil, prav tako pa hitro pritegnejo pozornost med raziskovalci [19]. Širok razpon v polarnosti in fizikalnih lastnostih naravnih komponent predstavlja ekstrakcijo metabolitov skoraj nepredstavljivo. Vedno več je raziskav posvečenih ekstrakcijam in separacijam bioaktivnih komponent iz rastlin, kot so flavonoidi, katehini, fenolne kisline, terpenoidi in saponini [20], [21], [22]. Nedvomno je voda najboljša "zeleno" topilo za zmanjšanje atmosferskih vplivov in varnostnih težav, ki nastopijo kot posledica uporabe strupenih in hlapnih organskih topil v določenem kemijskem procesu [23], [24]. Slaba stran bioaktivnih komponent je veliko različnih lastnosti, ki vodijo do omejene topnosti v vodi in močno ovirajo razvoj ekološko prijaznih separacijskih metod v vodnem mediju. Zato je razvoj novih "zelenih" topil ena izmed ključnih tem, s katerimi bi kemijski procesi postali okolju prijaznejši [25], [26].

2.1 O pegastem badlju

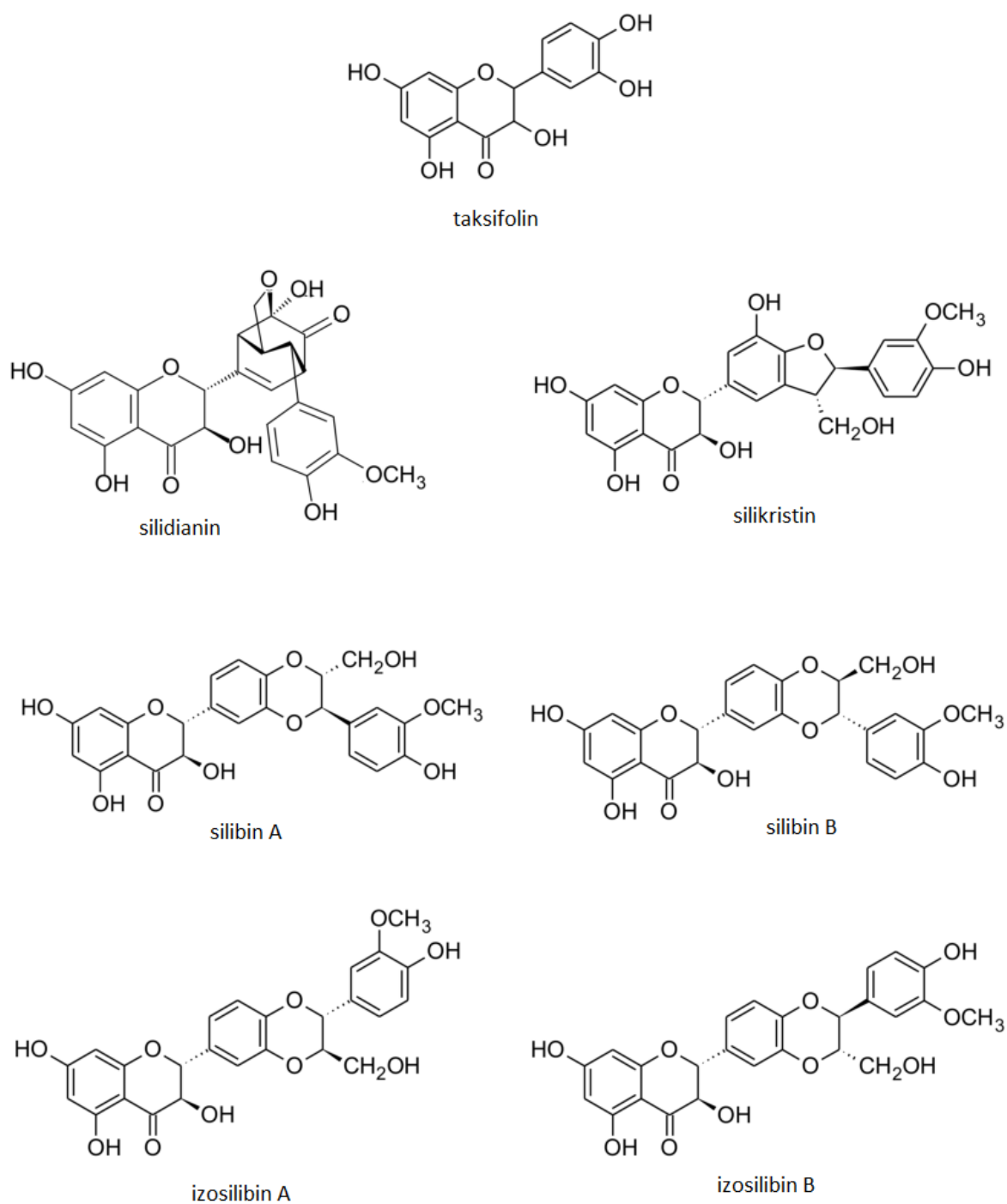
Silybum marianum L. Gaertner, prikazan na sliki 2-1, je bodičasta enoletnica ali dvoletnica, ki izvira iz Sredozemlja, vendar raste po vsej Evropi. Tradicionalno se rastlinski ekstrakt uporablja za številne akutne in kronične jetrne bolezni. Surovi hidroalkoholni izvleček zdrobljenih semen, ki ga dobimo iz vijoličnih cvetov rastline, vsebuje od 65 % do 80 % silimarina, preostalih 35 % do 20 % pa predstavljajo nekarakterizirani polifenoli in maščobne kisline, vključno z linolno, oleinsko in palmitinsko kislino. Splošno velja, da je silimarin glavna aktivna frakcija v tinkturah pegastega badlja [27].



Slika 2-1 Cvet pegastega badlja [27]

Zadnja leta so bili antioksidanti podvrženi številnim epidemiološkim raziskavam, ki so njihovo uživanje povezale z zmanjšanjem pojavnosti srčno-žilnih bolezni in rakavih obolenj. Med znanimi antioksidanti (karotenoidi, tokoferoli, vitamina C in E itd.) je obsežna skupina raznovrstnih komponent, splošno znanih kot polifenolne spojine. Silimarin je antihepatotoksična polifenolna snov, izolirana iz rastline pegasti badelj oziroma *Silybum marianum* [28].

Derivati pegastega badlja se že skoraj 200 let uporabljajo kot zeliščna zdravila. Na trgu so se začeli pojavljati predvsem zaradi dobrega učinka na zdravljenje jetrnih bolezni. Njihova uporaba je bila razširjena po vsej Evropi, odkar so leta 1969 uradno postali na voljo pripravki za klinično uporabo. Silimarin je najprej veljal za čisto spojino s formulo 7-kromanol-3-metil-taksifolin, vendar je bilo po uvedbi natančnejših analiznih metod in ločevanja dokazano, da silimarin sestavlja veliko število flavonolignanov, vključno s silibinom (silibin A, silibin B), izosilibinom (izosilibin A, izosilibin B), silidianinom in silikristinom, ter flavonoid taksifolin. Strukture sedmih aktivnih komponent silimarina so prikazane na sliki 2-2.



Slika 2-2 Sedem glavnih aktivnih komponent silimarina

V semenih je bilo najdenih tudi več drugih flavonolignanov, vključno z dehidrosilibinom, deoksizilikristinom, deoksizilidianinom, silandinom, silikobinomom, siliherminom in neosiliherminom. Te spojine najverjetneje ščitijo različne organe in celice prav zaradi svojih antioksidativnih in membransko stabilizacijskih lastnosti [28].

Trenutno najpomembnejša medicinska uporaba pegastega badlja je kot hepatoprotektant in kot podporno zdravilo pri kroničnih vnetjih jeter oz. jetrnih obolenjih, npr. ciroza, hepatitis, maščobna infiltracija zaradi alkohola in toksičnih kemikalij. Uporabljajo ga tudi pri zdravljenju poškodb jeter s strupenimi gobami. Večina jetrnih toksinov svoje škodljive učinke povzročajo zaradi prostih radikalov. Silimarin ščiti membrane rdečih krvnih celic pred peroksidacijo lipidov in hemolizo (razpad rdečih krvnih celic), ki jo povzročajo nekateri toksini rdečih krvnih celic. Izvlečki pegastega badlja so na voljo v obliki kapsul, tablet, napitkov, praškov in krem [28].

Doslej so bile glavne učinkovine silimarina ločene in analizirane s pomočjo HPLC z UV, elektrokemično ali z MS detekcijo in s kapilarno elektroforezo [29], [30], [31]. Predlagane so bile številne metode za določanje antioksidativne moči, vključno z metodo DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), test absorbanca kisikovega radikala, test skupnega statusa antioksidantov po Randox-u in elektrokemični test antioksidantov [32], [33], [34].

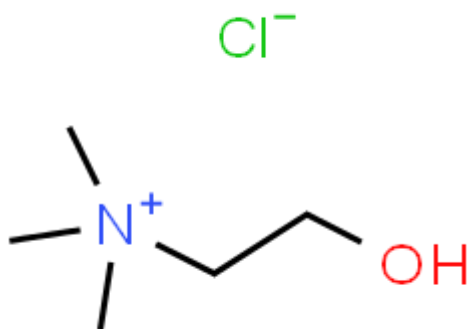
2.2 Globoko evtektična topila (DES, angl. *Deep Eutectic Solvents*)

Abbott in sodelavci so prvič omenili globoko evtektična topila (DES, angl. *Deep Eutectic Solvents*) leta 2001, leta 2003 pa so izpostavili številne prednosti priprave evtektičnih raztopin sečnine in različnih kvarternih amonijevih soli, kot so stabilnost raztopine, biološka razgradljivost in sposobnost prilagajanja topil različnim uporabam [35]. Od takrat so začeli DES topila obravnavati kot alternativo ionskim tekočinam, število študij, povezanih z njihovo fizikalno-kemijsko karakterizacijo, se je eksponentno povečalo, možnost njihove uporabe pa se je razširila [36].

Evtectična topila so definirana kot zmes dveh ali večih komponent v trdnem ali tekočem stanju, ki imajo v določenem razmerju nižje tališče kot posamezne komponente v zmesi. Kadar so komponente evtektičnega topila primarni metaboliti, se ta topila imenujejo naravna globoko evtektična topila (NADES, angl. *Natural Deep Eutectic Solvents*). Pripravljena topila so pogosto biorazgradljiva, stabilnejša, nehlapna, manj strupena za okolje in ljudi, zato je njihova neposredna uporaba v proizvodnji mogoča brez dodatnega čiščenja. Poleg tega je cena teh topil primerljiva z organskimi topili, zaradi česar so zanimiva tudi z ekonomskega vidika [36]. Zaradi obstoja širokega spektra spojin, ki lahko tvorijo naravna evtektična topila, obstaja tudi možnost dizajniranja njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti za različne prihodnje aplikacije,

kot npr. topilo ali nadomestni medij na področju sinteze, ekstrakcije, biokemije, elektrokemije, kemijske ali encimske katalize, proizvodnje biodizla itd [36].

Holin klorid (ChCl), organska sol, prikazan na sliki 2-3, ki vstopa v interakcijo s poceni in lahko dostopnimi donorji vodikove vezi (sečnina-urea, glicerol, polioli iz ogljikovih hidratov ali karboksilne kisline, pridobljene iz različnih virov), se najpogosteje uporablja pri pripravi evtektičnih topil [37]. Holin klorid izpolnjuje karakteristike ekonomičnosti, biorazgradljivosti in netoksičnosti in je kvarтерна amonijeva sol, ki jo je mogoče ekstrahirati iz biomase ali sintetizirati iz fosilnih goriv. Je tudi zelo dostopna surovina, ki se proizvaja v velikih količinah, celo 10⁹ kg na leto [38]. Čeprav je holin klorid zaradi nizke cene in biorazgradljivosti najpogostejša amonijeva sol, ki se uporablja pri sintezi evtektičnih topil, so za pripravo le-teh primerni tudi številni drugi halidi.



Slika 2-3 Holin klorid - najpogosteje uporabljan pri sintezi DES

Glede na osnovno formulo $[R_1R_2R_3R_4N^+] X^- [R_1R_2R_3R_4N^+] X^-$ in spreminjanje alkilnih skupin in/ali aniona, lahko dobimo veliko število različnih kvarternih amonijevih soli, tj. potencialnih komponent za sintezo DES topil. Čeprav so te spojine ionske narave, evtektičnih topil ni mogoče v celoti obravnavati kot ionske spojine, saj jih je mogoče pripraviti tudi iz neionskih spojin. Novo nastale vodikove vezi v teh topilih povzročajo občasno delokalizacijo naboja, kar se odraža v znižanju tališča zmesi glede na tališče posameznih vhodnih komponent [39].

Na primer, kombinacija dveh čistih trdnih snovi, kot sta sečnina ($T_T = 133\text{ }^\circ\text{C}$) in holin klorid ($T_T = 302\text{ }^\circ\text{C}$) v molskem razmerju 2 : 1, rezultira v evtektičnem topilu s $T_T = 15\text{ }^\circ\text{C}$, kar je bistveno nižje od temperature tališča čistih komponent. V primeru holin klorida je izbira

donorja vodikove vezi in njuno molsko razmerje kritična točka za nastanek evtektičnega topila z nižjim tališčem. Znižanje tališča je odvisno od simetrije prisotnega kationa in od kemijske narave funkcionalne stranske verige. Tudi anion, ki je prisoten v derivatu holinskih soli, lahko vpliva na temperaturo tališča, zato v kombinaciji s sečnino temperatura tališča topila pada v naslednjem vrstnem redu $F^- > NO_3^- > Cl^- > BF_4^-$ [40].

Kemijska struktura donorjev in akceptorjev vodikove vezi pomembno vpliva na tvorbo in stabilnost evtektičnega topila. Pod pojmom stabilnost se smatra, da pripravljena topila ostanejo v tekočem stanju dlje časa, tj. da ne pride do nastanka kristalne oborine. V primeru organskih kislin, za razliko od jabolčne in citronske kisline, jantarna kislina ne tvori tekočin s holinijevimi solmi. Prisotnost dodatnih hidroksilnih in karboksilnih skupin v jabolčni in citrinski kislini omogoča nastanek večjih vodikovih vezi s holin kloridom in tako omogoča nastanek stabilnega topila. Poleg kemijske strukture na stabilnost vodikovih vezi močno vpliva tudi prostorska razporeditev skupin znotraj molekule [41]. Popescu in Constantin sta pokazala, da citronska in malonska kislina tvorita DES topilo s holin kloridom v molskem razmerju 1 : 2, vendar zaradi različne prostorske razporeditve reaktivnih skupin, evtektično topilo s citrinsko kislino, ki je donator treh protonov, izgubi stabilnost in sčasoma postane gost gel, medtem ko evtektično topilo z malonsko kislino, ki je donator dveh protonov, dlje časa ohrani svoje lastnosti. Prav tako lahko na stabilnost evtektičnega topila vplivajo različna razmerja komponent. Na primer, pripravljeno evtektično topilo glukoze in holin klorida bo stabilno, če ju zmešamo v molskem razmerju 2 : 5, toda v molskih razmerjih 2 : 1, 1 : 1 ali 1 : 4 se v nastali bistri tekočini sčasoma pojavi kristalna oborina [42].

2.2.1 Priprava globoko evtektičnih topil

Za razliko od drugih generacij ionskih tekočin je priprava DES topil enostavnejša in bolj ekonomična in jih lahko pripravimo na več načinov: iz koncentrirane vodne raztopine, ki vsebuje vsako od komponent, iz raztopine ene komponente, v kateri je druga disociirana, ali iz trdne mešanice dveh komponent, ki se segrevata do vnaprej določene temperature. Pri pripravi teh topil ne pride do kemijske reakcije, temveč se posamezne komponente povežejo z vodikovimi vezmi in tako nastane evtektično topilo. Z vidika "zelene" kemije je potrebno omeniti, da je priprava globoko evtektičnih topil trajnostni postopek, ki ga dosežemo s 100 % atomsko učinkovitostjo (vsi atomi substratov so prisotni v produktu), ne da bi pri tem nastali odpadki [43].

Globoko evtektična topila se najpogosteje pripravijo s postopkom blagega segrevanja, pri katerem se zatehta točno določena masa komponent, nato se z ali brez dodatka vode ob mešanju segreva 30 do 240 minut pri temperaturi do 100 °C, dokler ne nastane bistra tekočina. Molsko razmerje komponent in temperatura tališča sta odvisni od kemijske narave komponent evtektičnega topila. Čas, potreben za nastanek tekočega topila iz trdnih in tekočih komponent, prav tako variira in se razlikuje glede na vrsto komponent in delež vode v topilu. Za pripravo topila, ki vsebuje tekoči glicerol, je potrebno od 30 do 45 minut, odvisno od vsebnosti vode. V primeru drugih topil, ki vsebujejo trdne komponente, je za pripravo evtektičnih topil, ki vsebujejo 50 % vode, potrebno manj časa (v povprečju 1 do 1,5 h) v primerjavi s tistimi, ki vsebujejo 10 % vode (povprečno 2 do 3 ure).

Topila enakega kemijskega profila lahko dobimo z vakuumsko kontrolo, kjer komponente najprej raztopimo v vodi, nato pa vodo odstranimo z izparevanjem pri 50 °C z uporabo rotacijskega vakuumskega uparjalnika, da dosežemo konstantno maso. Gutierrez in sodelavci so opisali postopek priprave DES topil z liofilizacijo. Natančneje, vodne raztopine posameznih komponent v določenem razmerju so zmešali in zamrznili in s postopkom sušenja (sublimacije) dobili tekoče topilo. Zaradi svoje enostavnosti se je izkazalo, da je metoda primerna za vgradnjo različnih celičnih struktur (veziklov, liposomov) v evtektično topilo. Eden najnovejših načinov priprave pa vključuje uporabo ultrazvoka ali mikrovalovnega sevanja in tudi njuno hkratno uporabo [43].

2.2.2 Primerjava priprave evtektičnih topil po klasični metodi s pristopom, v katerem se sočasno uporablja mikrovalovno sevanje in ultrazvok

Uporaba alternativnih virov segrevanja reakcijske mešanice z ultrazvokom je že dolgo v središču znanstvenih raziskav. Čeprav se v teh procesih uporabljajo različni mehanizmi za prenos energije, ti procesi omogočajo krajši čas priprave, hkrati pa zmanjšujejo stroške energije. Ultrazvočni valovi v reakcijski mešanici generirajo specifične aktivacije, ki temeljijo na fizikalnem fenomenu kavitacije, kateri je povezan s tvorbo, rastjo in implozijo mehurčkov v tekočini. Implozija mehurčkov povzroči lokalno pregrevanje elastične tekočine, ki segreva reakcijsko zmes. Ultrazvočno valovanje omogoča pospešitev postopka v primeru predhodno obdelanih trdnih vzorcev, ekstrakcije organskih in anorganskih komponent, homogenizacije

in mnogih drugih, na način, da zagotavlja boljše pogoje (boljši prenos topila v celico, uspešnejši prenos mase itd.) in s tem zadosti zahtevam "zelene" kemije [44].

Oscilirajoča energija ultrazvoka deluje neposredno na vzorec, pri čemer porabi malo energije, energetska učinkovitost pa je blizu 100 %. Uporaba mikrovalovnega sevanja pa temelji na sposobnosti polarnih molekul ali snovi, da absorbirajo in oddajajo mikrovalovno sevanje, pri čemer se zaradi dipolarne polarizacije in ionske prevodnosti vzorec, tretiran z mikrovalovi, neposredno segreva. Natančneje, energija mikrovalov povzroči gibanje molekul z migracijo ionov in rotacijo dipola, rotacija dipola pa kaže na poravnavo zaradi električnega polja molekul v topilu in vzorcih, ki imajo dipolne momente. Poravnava molekul in njihovo vračanje v moten položaj/motnjo potekata z veliko hitrostjo, kar ima za posledico tudi hitro segrevanje [45]. Danes se vedno bolj raziskuje sočasna uporaba ultrazvočnega valovanja in mikrovalov, ki ima velik potencial, saj zagotavlja boljše pogoje za prenos mase in toplote ter zmanjšuje porabo energije, izboljšuje kakovost produkta in omogoča avtomatizacijo procesov.

2.2.3 Uporaba DES v biodizlu

Biodizel kot alternativno gorivo je v zadnjih nekaj letih pritegnil veliko pozornosti. Kljub temu so ena pomembna pomanjkljivost zapletene komponente biodizla in težavnost pri čiščenju biodizelskih produktov. Glicerol je ena najpomembnejših komponent, ki vpliva na kakovost biodizla, zato je skupina Mjalli iz biodizla na osnovi palmovega olja ekstrahirala glicerol z uporabo ChCl /glicerol DES-a. Skupina je preučila učinke razmerja DES/biodizel in sestave DES na učinkovitost ekstrakcijskega postopka. Raziskava je pokazala možnost izvedbe separacijske tehnike z optimalnim molskim razmerjem DES/biodizel 1 : 1 in molskim razmerjem DES-a 1 : 1 (ChCl /glicerol). Po čiščenju je biodizel izpolnjeval standardne specifikacije za biodizelsko gorivo glede vsebnosti glicerola. Ista skupina je uporabila tudi dva DES-a (ChCl /etilen glikol in ChCl /2,2,2-trifluoroacetamid) za ekstrakcijo glicerola in oba DES-a sta bila uspešna pri odstranjevanju vsega prostega glicerola iz biodizla na osnovi palmovega olja. Ista skupina je pozneje pripravila tri DES-e iz metiltrifenilfosfonijevega bromida kot soli in treh različnih HBD (angl. *hydrogen bond donor*), tj. glicerol, etilen glikol in trietilen glikol in uporabila te DES-e za odstranjevanje glicerola iz biodizla na osnovi palmovega olja. Poleg tega so bili proučeni učinki DES-ov na odstranitev prostega glicerola, vezanega glicerola in skupnega glicerola, pri čemer je bilo ugotovljeno, da sta DES-a iz etilen glikola in trietilen glikola boljši topila za odstranjevanje prostega glicerola iz biodizla [46].

Običajno je za pripravo biodizla s transesterifikacijo potreben katalizator, preostanek katalizatorja pa je treba za namene čiščenja biodizla po koncu transesterifikacije odstraniti. Leta 2011 so Shahbaz in sodelavci uporabili 9 DES-ov na osnovi ChCl in 9 DES-ov na osnovi metiltrifenilfosfonijevega bromida za odstranjevanje preostanka katalizatorja KOH iz surovega biodizla. V njihovi študiji lahko povečanje molskega razmerja DES/biodizel in molskega deleža (n) HBD v DES, z izjemo DES-a na osnovi 2,2,2-trifluoroacetamida, poveča učinkovitost odstranjevanja KOH iz biodizla. Povprečna učinkovitost odstranjevanja KOH s ChCl in metiltrifenilfosfonijevim bromidom je bila 98,59 % oziroma 97,57 % [46].

2.2.4 Uporaba DES v aromatskih ogljikovodikih

Aromatski ogljikovodiki so osnovni materiali v kemijski industriji in se široko uporabljajo pri proizvodnji vlaken, plastike, pesticidov, zdravil, konzervansov, eksplozivov itd. Po drugi strani je večina aromatskih ogljikovodikov škodljiva za zdravje ljudi. Z vidika zdravja ljudi je koristno odstraniti vse aromatske ogljikovodike iz kemijskih produktov ali zmanjšati količino le-teh. Pang in sodelavci so uporabili amonijeve soli za ločevanje fenolov iz olj s sintezo DES in ugotovili, da je ChCl še posebej primeren za tvorbo DES za ločevanje fenolov (fenola in krezolov) iz olj (heksan, toluen in p-ksilen). Poleg tega je ChCl pokazal kratek ravnotežni čas in stabilnost pri temperaturi raziskave in ga je bilo po ločevanju mogoče obnoviti z dietil etrom. Nova metoda se je izognila bazam, kislinam in odpadnim vodam v primerjavi s tradicionalnimi metodami ločevanja fenolnih spojin iz olj. Ista skupina je uporabila tudi različne kvarterne amonijeve soli, kot so tetrametilamonijev klorid, tetrametilamonijev bromid, tetraetilamonijev klorid, metiltrietilamonijev klorid, tetraetilamonijev bromid, tetrapropilamonijev klorid, tetrabutilamonijev klorid, amonijev klorid, holin klorid in holin bromid za ločevanje fenolov iz vzorčnih olj [46].

2.2.5 Uporaba DES v plinih

CO_2 in CH_4 sta glavna toplogredna plina, ki se dandanes izpuščata v ozračje in se proizvajata v številnih industrijskih postopkih. Zato je ločevanje oziroma shranjevanje CO_2 in CH_4 nujno za razvoj učinkovitih strategij z minimalnim okoljskim vplivom in cenovno dostopnimi materiali. Monte in sodelavci so uporabili DES, narejene iz resorcinola, 4-heksilresorcinola in tetraetilamonijevega bromida, za sintezo ogljikovih monolitov z omejeno mikroporoznostjo,

narejeno po meri. Ti ogljiki, osnovani na DES, so pokazali dobre zmogljivosti za adsorpcijo CO₂ (do 3 mmol/g) in selektivnost CO₂ in CH₄, zlasti pri nizkih tlakih. Kasneje so Han in sodelavci preučili absorpcijo SO₂ z uporabo ChCl/glicerol DES-a v različnih ambientalnih pogojih in ugotovili, da se je topnost SO₂ v DES-u povečala s povišanjem koncentracije holin klorida [46].

V zadnjem času se je povečalo povpraševanje po primernih materialih za skladiščenje CO₂ in ločevanje plinov za reševanje problemov povezanih z globalnim segrevanjem. Za potrebe povpraševanja so bili ogljikovi monoliti, ki temeljijo na DES topilih in imajo bikontinuirno porozno strukturo, sestavljeno iz neprekinjenih makroporoznih kanalov in neprekinjene mikroporozne ogljikove mreže, dober kandidat. Zato so Lopez-Salas in sodelavci pripravili dva hierarhična ogljikova monolita, ki temeljita na globoko evtektičnih topilih, in ugotovili, da so DES topila bila ključnega pomena pri sintezi hierarhičnih ogljikovih monolitov s spodbujanjem spinodalnega razkroja, ki vodi do nastanka bikontinuirne porozne strukture in zagotavlja prekursorje, ki so potrebni za prilagajanje sestave in strukture molekularnega sita dobljenih ogljikov. Raziskovali so učinkovitost teh dveh ogljikovih atomov na osnovi DES za adsorpcijo CO₂, N₂ in CH₄ v monolitni in praškasti obliki ter selektivno adsorpcijo CO₂ napram CH₄ pod različnimi pogoji. Njihova študija je pokazala, da sta oba materiala združevala visoko sorpcijsko zmogljivost CO₂ z odlično selektivnostjo CO₂/N₂ in CO₂/CH₄, ta zmogljivost pa se je ohranila ob predelavi v monolitno in praškasto obliko [46].

2.2.6 Uporaba DES v bioaktivnih spojinah

Bioaktivne spojine so spojine, ki vplivajo na žive organizme, tkiva ali celice in so zaradi svoje bioaktivnosti pritegnile veliko raziskovalnega zanimanja. Glede na posebne učinke bioaktivnih spojin smo nova ekološka topila (DES) razširili tako, da lahko iz zapletenih vzorcev ekstrahiramo in ločimo bioaktivne komponente. V naslednji študiji so ovrednotili DES-e na osnovi alkohola pri ekstrakciji in določanju flavonoidov kot bioaktivnih komponent z antioksidativnim delovanjem. V njej so uporabili sedem različnih DES topil na osnovi holin klorida in alkoholov za ekstrakcijo flavonoidov, tj. miricetina in amentoflavona, iz *Chamaecyparis obtusa* z uporabo večih ekstrakcijskih metod. DES iz holin klorida in 1,4-butandiola v molskem razmerju 1 : 5 se je izkazal kot najboljši za ekstrakcijo dveh bioaktivnih komponent s segrevanjem. Poleg tega so bili nekateri ekstrakcijski faktorji, kot so koncentracija vode v mešanici DES/voda, temperatura, čas in razmerje trdno/tekoče,

izboljšani z metodologijo odziva površine (RSM, angl. *response surface methodology*). V tej študiji je uporaba DES topil povečala topnost flavonoidov, kar nakazuje, da lahko globoko evtektična topila zvišajo učinkovitost ekstraktov bioaktivnih spojin iz vzorcev [46].

Herba Artemisiae Scopariae je dobro znano tradicionalno zdravilo, ki spada v družino *Asteraceae* (Nebinovke). Klorogenska kislina in kavna kislina sta dve izmed glavnih učinkovin *Herba Artemisiae Scopariae* in se klinično uporabljata kot terapevtsko zdravilo. V tej študiji so za ekstrakcijo obeh kislin iz *Herba Artemisiae Scopariae* uporabili DES iz tetrametilamonijevega klorida/sečnine v molskem razmerju 1 : 4 pod optimalnimi pogoji in uspelo jim je ekstrahirati 9,35 mg/g klorogenske kisline in 0,31 mg/g kavne kisline [46].

2.3 Teoretične osnove analiznih metod

Za potrebe laboratorijskih analiz smo uporabili naslednje metode:

- ultrazvočna ekstrakcija,
- centrifugiranje,
- tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).

2.3.1 Ultrazvočna ekstrakcija

Ultrazvočna ekstrakcija je napredna tehnika ekstrakcije z velikim potencialom za pridobivanje fenolnih spojin iz hrane zaradi preprostih instrumentalnih zahtev in enostavne uporabe. Ta tehnika temelji na uporabi visokofrekvenčnih valov in omejene količine topila, da dobimo učinkovito ekstrakcijo spojin, ki jih vsebuje trdna matrica. Uporabo ultrazvoka v prehrabeni industriji lahko razdelimo na dve ločeni kategoriji: nizkointenzivni visokofrekvenčni ($\nu > 100$ kHz) in visokointenzivni nizkofrekvenčni ($20 \text{ kHz} \leq \nu \leq 100 \text{ kHz}$) ultrazvok. Ultrazvok z nizko intenzivnostjo ne spremeni fizikalnih ali kemičnih lastnosti materiala, skozi katere se širi ultrazvočni val. Nasprotno pa visokointenzivni udarni valovi ustvarjajo močan pritisk in temperaturni gradient, ki ga povzroča kavitacija mehurčkov, kar se odraža kot prekinitveni efekt znotraj matrice. Na ta način se hitrost prenosa mase in topnost analitov izboljšata ne le z naraščajočo temperaturo, ki jo je treba nadzorovati, temveč tudi z naraščajočim stikom med prvotno matrico in topilom. Pravzaprav je dokazano, da UAE (angl. *ultrasound assisted extraction*) znatno skrajša čas ekstrakcije in poveča njen izkoristek v mnogih vzorcih. Najpomembnejši parametri, ki sodelujejo pri ekstrakciji fenolnih spojin iz hrane, so čas ekstrakcije, temperatura ekstrakcije, moč, sestava topila in količina vzorca [47].

Vplivi temperature in časa ekstrakcije so bili obsežno raziskovani. Pri nadzorovani temperaturi se ekstrakcija fenolnih komponent poveča s povečevanjem ekstrakcijskega časa vse do popolne ekstrakcije ali nasičenja s topilom. Po drugi strani lahko za določen čas ekstrakcije povečanje temperature ekstrakcije povzroči tudi višji izkoristek fenolnih spojin. Kljub temu bo to povečanje omejeno z možno razgradnjo teh komponent pri relativno visokih temperaturah. Da bi bili varni in se popolnoma izognili termorazgradnji fenolov, naj temperature pri ultrazvočni ekstrakciji ne bi smele presegati 40 °C. Sicer se lahko uporabljajo nekoliko višje temperature, odvisno od točno določene uporabe, pod pogojem, da se oceni potencialna razgradnja spojin. Pomemben parameter je tudi moč uporabljene energije in njena frekvenca. Ta vrednost se lahko zelo razlikuje in bo odvisna od uporabljenega instrumenta. Za ekstrakcijo fenolov so poročali o moči od 25 do 200 W. Na primer, vrednosti moči in frekvence 250 W ter 40 kHz sta bili uporabljeni pri ultrazvočni ekstrakciji antocianinov iz grozdnih semen, medtem ko so za pridobivanje flavonskih glikozidov iz pomarančne lupine uporabili 150 W in 25 kHz, a za ekstrakcijo različnih fenolnih spojin iz soje pa sta zadostovali vrednosti moči in frekvence 40 W ter 20 kHz [47].

Pomembna spremenljivka je tudi količina vzorca in njegovo fizično stanje. Količina vzorca bo določila količino spojin, ki jih je mogoče sprostiti v topilo. V primeru ekstrahiranja prevelike količine vzorca se topilo zlahka zasiti, s čimer ne moremo doseči popolne ekstrakcije fenolov. Poleg tega je pomembna tudi velikost delcev vzorca. Manjši delci omogočajo bolj drastične učinke ultrazvoka na njihovo strukturo, kar je posledica boljšega prodiranja topila. Kritičnega pomena pa je tudi stopnja vlažnosti vzorca. Dokazano je, da suhi vzorci dajejo višje izkoristke ekstrakcije kot vzorci z visoko stopnjo vlažnosti. Domneva se, da je ta pojav posledica boljše poroznosti suhega materiala, kar pomeni višjo difuzijsko hitrost topila [47].

Za uspešno optimizacijo vseh teh parametrov je zelo priporočljiva uporaba kemometričnih orodij. Ti statistični pristopi omogočajo istočasno optimizacijo večih parametrov kot odziv na različne spremenljivke, ki nas zanimajo. Faktorialne zasnove, oblikovanja osrednjih kompozitov in metodologija odziva površine so nekatera kemometrična orodja, ki se uporabljajo za optimizacijo ekstrakcijskih pogojev različnih fenolnih spojin iz citrusov, grozdja in kokosa. S pomočjo teh orodij je mogoče optimizirati celo mešanice topil, ki jih bomo uporabili. Izbor topila za ultrazvočno ekstrakcijo je mogoče obravnavati na enak način kot že prej omenjene klasične tehnike; glede na kemijsko sestavo vzorca, ki ga bomo ekstrahirali, in naravo fenolnih spojin lahko uporabimo bolj ali manj polarno topilo ali mešanico topil [47].

2.3.2 Centrifugiranje

Centrifugiranje je tehnika ločevanja delcev iz raztopine glede na njihovo velikost, obliko, gostoto, viskoznost medija in hitrost rotorja. Delce suspendiramo v tekočem mediju in raztopino prenesemo v centrifugirno tubo. Tuba oz. epruveta se nato postavi v rotor, pokrov zapremo in nastavimo določeno hitrost vrtenja. Z vrtenjem rotorja okoli centralne osi nastane centrifugalna sila na delce suspenzije.

Dejavniki, ki vplivajo na centrifugiranje:

- gostota vzorcev in raztopine,
- temperatura in viskoznost,
- razdalja premika delcev,
- hitrost vrtenja.

V biologiji so delci običajno celice, podcelične organele ali večje molekule.

Obstajata dve vrsti centrifugirnih postopkov; eden je pripravljalni, katerega namen je izoliranje specifičnih delcev, drugi pa analitičen, ki vključuje merjenje fizikalnih lastnosti delcev v usedlini. Ko se rotor v centrifugi vrti, na vsak delček v vzorcu deluje centrifugalna sila; delček se bo usedal s hitrostjo, ki je sorazmerna centrifugalni sili, ki nanj deluje. Viskoznost raztopine vzorca in fizikalne lastnosti delcev prav tako vplivajo na hitrost usedanja vsakega delca. Pri fiksni centrifugalni sili in tekoči viskoznosti je hitrost usedanja delca sorazmerna z njegovo velikostjo, tj. molekulsko maso, in z razliko med gostoto delca ter gostoto raztopine [48]. Centrifuga, ki smo jo uporabljali v našem eksperimentalnem delu, je prikazana na sliki 2-4.



Slika 2-4 Eppendorf centrifuga 5804 R

2.3.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC, angl. *High Pressure Liquid Chromatography*)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC, angl. *high pressure liquid chromatography*) je kromatografska metoda, ki se uporablja za ločevanje mešanic spojin v analizni kemiji in biokemiji, da bi določili, kvantificirali ali očistili posamezne komponente mešanic. Reverzno-fazna HPLC ali tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (UHPLC, angl. *ultra high pressure liquid chromatography*) je pogosto uporabljen način ločevanja. Zagotavlja dinamično zadrževanje spojin, ki imajo hidrofobno in organsko funkcionalnost. Kombinacija hidrofobnih in van der Waalsovih interakcij med vsemi ciljnim spojinami ter stacionarno in mobilno fazo omogoča interakcije teh spojin z reverzno fazo.

Vzorec, ki ga ločujemo in analiziramo, v zelo majhnih količinah pošljemo v tok mobilne faze, ki se pretaka skozi kolono. Na voljo so različne vrste kolon s sorbenti različnih velikosti delcev in površin. Mešanica se giblje skozi kolono z različnimi hitrostmi in interagira s stacionarno fazo. Hitrost vsake komponente v mešanici je odvisna od njene kemijske narave, narave kolone in sestave mobilne faze. Čas, ko določen analit izstopi iz kolone, imenujemo retencijski čas ali čas zadrževanja. Retencijski čas se meri pod specifičnimi pogoji in velja za identifikacijsko karakteristiko določenega analita. Delci sorbenta so lahko po naravi hidrofobni ali polarni. Pogosto uporabljene mobilne faze vključujejo katero koli mešljivo kombinacijo vode in organskih topil, kot sta acetonitril in metanol. Lahko pa se uporabljajo tudi brezvodne mobilne faze. Vodna komponenta mobilne faze lahko vsebuje kisline, kot so mravljična kislina, fosforjeva ali trifluoroocetna kislina ali soli, ki omogočajo ločitev komponent vzorca. Sestava mobilne faze je med kromatografsko analizo bodisi konstantna (izokraska) bodisi spremenljiva (gradientna). Konstantni pristop je učinkovit za ločevanje komponent vzorca, ki se po svoji afiniteti do stacionarne faze ne preveč razlikujejo. V spremenljivem pristopu pa se sestava mobilne faze spreminja od nizke do visoke elucijske moči. Elucijska moč mobilne faze se odraža z retencijskimi časi analita, kjer visoka elucijska moč povzroči hitro elucijo. Sestava mobilne faze je izbrana na podlagi intenzivnosti interakcij med večimi komponentami vzorca in stacionarno fazo [49].

Ključne prednosti HPLC sistemov so naslednje:

- kontrolirani in avtomatizirani kromatografski instrumenti,
- omogočajo upravljanje podatkov, varnostne funkcije in validacijo instrumentov,
- zmogljivi in prilagodljivi,
- povečajo produktivnost z upravljanjem vseh področij analize – od vzorca do instrumenta in od separacije do poročanja rezultatov,
- cenovno dostopni [49].

Glavni namen HPLC tehnike je prepoznati, kvantificirati in očistiti določen analit ali spojino. Opraviti je mogoče tako kvantitativno kot kvalitativno analizo. HPLC se lahko uporablja v naslednjih aplikacijah:

- čiščenje vode,
- zaznavanje nečistoč v farmacevtski industriji,
- predkoncentracija komponent v sledovih,
- ligand-izmenjevalna kromatografija,
- ionsko-izmenjevalna kromatografija beljakovin,
- anionska izmenjevalna kromatografija visokih pH ogljikovih hidratov in oligosaharidov [49].

3 Eksperimentalni del

3.1 Kemikalije in materiali

Pri izvedbi eksperimentalnega dela smo se posluževali naslednjih kemikalij in materialov:

- absolutni etanol (C_2H_6O , $M = 46,07$ g/mol, $W \geq 99,8$ % (GC), CAS: 64-17-5, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA),
- 1,4-butandiol ($C_4H_{10}O_2$, $M = 90,12$ g/mol, $W \geq 99,0$ % (GC), CAS: 8.01532.1000, Merck KGaA, Nemčija),
- holin klorid ($C_5H_{14}ClNO$, $M = 139,62$ g/mol, $W = 99$ %, CAS: 67-48-1, Acros Organics, Belgija),
- mentol ($C_{10}H_{20}O$, $M = 156,27$ g/mol, $W = 99$ %, CAS: 89-78-1, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA),
- metanol (CH_3OH , $M = 32$ g/mol, $W \geq 99,9$ % (GLC), CAS: 67-56-1, Carlo Erba Reagents, Milano, Italija),
- metanol (gradient grade for liquid chromatography, CH_3OH , $M = 32,04$ g/mol, $W \geq 99,9$ % (GC), CAS: 1.06007.2500, Merck KGaA, Nemčija),
- mlečna kislina ($CH_3CHOHCOOH$, $M = 90,08$ g/mol, $W = 88,0 \div 92,0$ % (acidimetric), CAS: 79-33-4, Carlo Erba Reagents, Milano, Italija),
- očetna kislina (CH_3COOH , $M = 60,05$ g/mol, $W > 99,8$ %, CAS: 64-19-7, LabExpert, ZK),
- pegasti badelj (*Silybi marianum fructus*, vzorec št. : 5060 / 18.06.2019, NATUR COMMERCE d.o.o. PORTOROŽ, Slovenija),
- 1,2-propandiol ($C_3H_8O_2$, $M = 76,09$ g/mol, $W = 99$ %, CAS: 57-55-6, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA),
- silymarin flavonolignans (standard, LOT: BCCB8680, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA),
- ultra čista voda – Milli-Q®; Milipore Corporation, Massachusetts, ZDA (prevodnost 18,2 M Ω cm pri 25 °C),
- urea (CH_4N_2O , $M = 60,06$ g/mol, $W = 99-101$ % (calc. on dry substance), CAS: 57-13-6, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA).

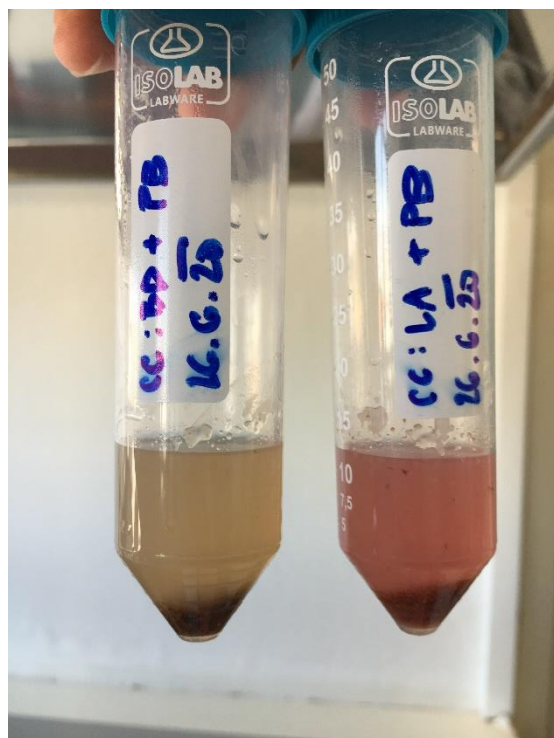
3.2 Potek dela

Za namene magistrske naloge smo v erlenmajericah pripravili različna globoko evtektična topila v točno določenih molskih razmerjih. Vzorcju pegastega badlja, ki smo ga zatehtali v centrifugirno tubo (vsaka zatehta je znašala 500 mg pegastega badlja), smo dodali 10 mL topila, hidrofilnim topilom smo dodali še določen delež vode (tabela 1) in sledila je ekstrakcija v ultrazvočni kopeli pri 50 °C. Ultrazvočna ekstrakcija je potekala v dveh ciklih, in sicer po prvem ciklu, ki je trajal 30 minut, smo vzorce centrifugirali 10 minut pri 10 000 RPM (RPM, angl. *revolutions per minute*), nato smo supernatante s Pasteurjevo pipeto prenesli v predhodno označene 25 mL steklene merilne bučke. Preostankom v centrifugirnih tubah smo ponovno dodali 10 mL pripravljenih topil in nadaljevali z drugim ciklom ultrazvočne ekstrakcije, ki je prav tako potekal 30 minut pri 50 °C.

Po končanem drugem ciklu ekstrakcije smo supernatante s Pasteurjevo pipeto ponovno prenesli v 25 mL bučke, z ustreznimi topili dopolnili do oznake in premešali z »vortex« mešalcem. Vsak vzorec za posamezno topilo smo ekstrahirali v dveh paralelkah. Na spodnjih dveh slikah sta prikazana proces ekstrakcije v ultrazvočni kopeli in centrifugirni tubi po končanem centrifugiranju.



Slika 3-1 Ekstrakcija aktivnih komponent iz pegastega badlja s pripravljenimi DES topili v ultrazvočni kopeli



Slika 3-2 Produkta ekstrakcije v ultrazvočni kopeli po končanem centrifugiranju

Sledila je priprava vzorcev za HPLC analizo. Najprej smo raztopine supernatantov v 25 mL bučkah redčili, in sicer v razmerju ekstrakt : topilo = 1 : 5, pri čemer smo za topilo uporabljali 80 % metanol, redčitve pa smo opravili v 10 mL bučkah, kar je pomenilo, da smo z avtomatsko pipeto odpipetirali 2 mL vzorca in dodali 8 mL topila. Pred HPLC analizo smo vzorce prefiltrirali. Uporabili smo 10 mL brizge in PTFE filtre z velikostjo por 0,45 μm , prefiltrirane vzorce pa smo shranili v vialah za HPLC analize. Na sliki 3-3 so prikazani prefiltrirani vzorci, shranjeni v vialah, pripravljene za HPLC analizo.



Slika 3-3 Vzorci v vialah, prefiltrirani skozi PTFE filtre, pripravljene za HPLC analizo

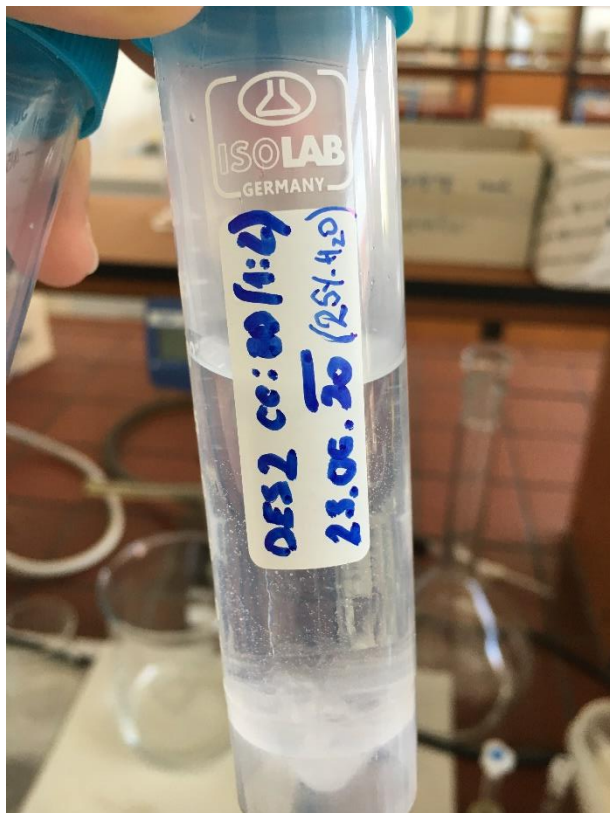
3.2.1 Priprava DES

Za namene ekstrakcije pegastega badlja z uporabo globoko evtektičnih (DES) topil smo pripravili 5 DES topil in dodatno topilo 80 % etanol. Z vsakim od šestih topil smo izvedli po dve ekstrakciji, od katerih je posamična ekstrakcija potekala v dveh ciklih, kot je opisano v poglavju 3.2. Vsa DES topila smo pripravili v molskem razmerju 1 : 2, pri čemer se je 1 mol vedno nanašal na delež holin klorida oziroma mentola v določenem DES topilu, 2 mola pa sta se nanašala na drugo uporabljeno komponento. Pred začetkom priprave DES topil smo na dve decimalki natančno preračunali mase vseh komponent, tako da je skupna masa obeh komponent v topilu znašala med 30 g in 40 g, nato smo v erlenmajerice zatehtali posamične sestavine, dodali magnetno mešalo, erlenmajerice zaprli, da ni prišlo do izhlapevanja, in jih ob mešanju 30 minut segrevali na 80 °C. Postopek sinteze globoko evtektičnih topil je prikazan na sliki 3-4.



Slika 3-4 Postopek sinteze globoko evtektičnega topila

Nastala raztopina je bila bistra, viskozna in brezbarvna, ki smo jo iz erlenmajeric prelili v epruvete. Hidrofilnim topilom smo dodali še delež vode v razmerju 75 mL DES in 25 mL H₂O. Za takšen delež vode smo se odločili na podlagi člankov, ki opisujejo, da je ekstrakcija polifenolov najučinkovitejša s prav 25 % deležem vode [50]. Količino dodane vode smo za vsako topilo posebej preračunali. Končni produkt (nastalo DES topilo z dodatkom vode) je prikazan na sliki 3-5.



Slika 3-5 DES3 iz holin klorida in 1,4-butandiola s 25 % H₂O

Na ta način smo pripravili vseh 5 DES topil, katerih imena in sestava so razvidna iz tabele 1.

Tabela 1 Imena in sestave vseh pripravljenih DES topil

Oznaka topila	Sestava topila (1 mol : 2 mol)	Delež vode
DES1	holin klorid : mlečna kislina	75 % DES : 25 % H ₂ O (V : V)
DES2	mentol : 1,4-butandiol	/ (hidrofobno topilo)
DES3	holin klorid : 1,4-butandiol	75 % DES : 25 % H ₂ O (V : V)
DES4	holin klorid : urea	75 % DES : 25 % H ₂ O (V : V)
DES5	holin klorid : 1,2-propandiol	75 % DES : 25 % H ₂ O (V : V)

3.2.2 Priprava umeritvene krivulje

Za namene kvantifikacije silimarinov in validacije analiznega postopka smo pripravili umeritveno krivuljo. Pripravili smo standardno raztopino 25 mg/25 mL, kar je ekvivalentno 1 mg/mL, pri čemer je bil topilo čisti metanol, standard pa silymarin flavonolignans, LOT: BCCB8680, proizvajalca Sigma-Aldrich. Raztopine, ki smo jih pripravili za umeritveno krivuljo, so bile naslednjih koncentracij: 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L, 250 mg/L in 500 mg/L. Vse te raztopine smo pripravili tako, da smo predhodno izračunane volumne s hamiltonsko iglo odpipetirali iz standardne raztopine 25 mg/25 mL, prenesli v 10 mL bučke, jih do oznake napolnili z metanolom, ustrezno označili in premešali z »vortex« mešalcem. Na koncu smo vsako pripravljeno raztopino iz 10 mL bučke prelili v svojo vialo in jih shranili v hladilnik.

3.2.3 Optimizacija kromatografske ločbe silimarinov

Eden glavnih ciljev tega dela je bila optimizacija RP-HPLC kromatografske ločbe zmesi različnih fenolnih komponent, ekstrahiranih iz pegastega badlja (*silybum marianum*), ki ga sestavljajo pretežno flavonolignani silibin (silibin A, silibin B), izosilibin (izosilibin A, izosilibin B), silidianin, silikristin ter flavonoid taksifolin. Metodo smo optimirali na komercialno dosegljivem standardu silimarin flavonolignanov, v katerem so prisotne vse zgoraj naštet preiskovane spojine. Elucija in ločba spojin sta bili preizkušeni na dveh nepolarnih C18-RP kolonah, različnih velikosti delcev (1,8 μm in 5 μm). Preizkušene so bile različne mobilne faze iz različnih kombinacij nakisanih raztopin metanola in vode ali acetonitrila in vode. Izvajali smo izokratsko in gradientno elucijo z različnimi sestavami mobilne faze ter z različnimi pretoki od 0,6 mL do 1,0 mL min^{-1} . Za zaznavo preiskovanih spojin pa je bil uporabljen UV-VIS detektor z merjenjem absorbanc pri valovnih dolžinah 280 nm in 288 nm [51], [52], [53].

3.2.4 HPLC analiza

HPLC instrument, s pomočjo katerega smo analizirali vzorce in standardne raztopine, je bil sestavljen iz črpalke Varian ProStar 210 in detektorja Varian ProStar 310. Spojine smo zaznali pri valovni dolžini $\lambda = 288$ nm, čas analize je bil 30 minut, pretok mobilne faze skozi sistem pa 1 mL/min. Mobilna faza je bila sestavljena iz topila A in topila B. Topilo A je bil čisti metanol, topilo B pa 1 % očetna kislina, pripravljena kot 10 mL očetne kisline/1000 mL ultra čiste vode. Obe topili smo pred analizo razplinili v ultrazvočni kopeli. HPLC analiza vzorcev je potekala z gradientno elucijo, katere potek je predstavljen v tabeli 2. Kolona, uporabljena pri HPLC analizi, pa je bila Agilent Eclipse XDB-C18, 5 μ m, 4,6 \times 150 mm.

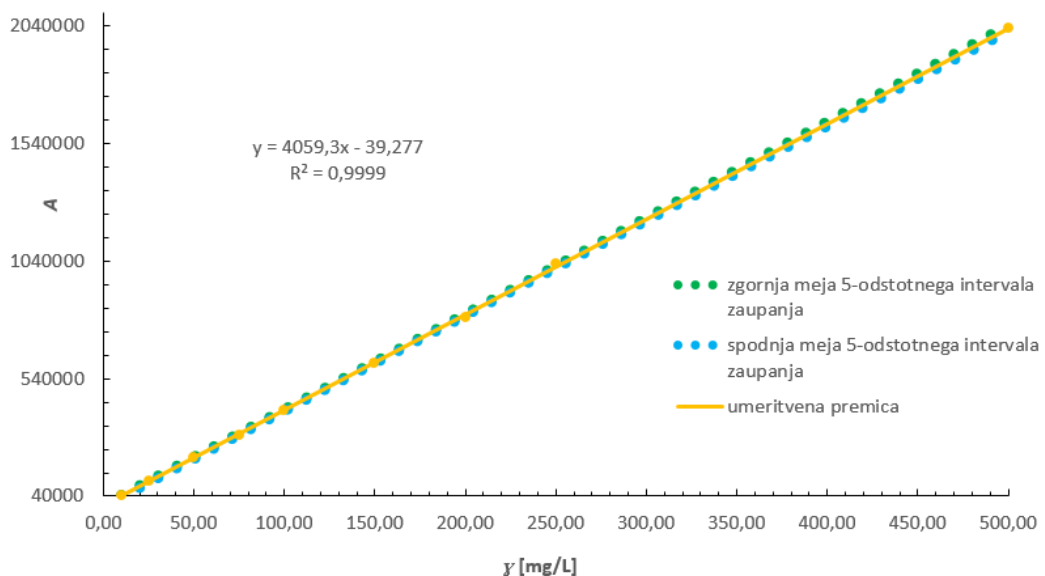
Tabela 2 Potek gradientne elucije pri HPLC analizi

Čas (min:sek)	% A	% B
0:00	30	70
1:00	30	70
5:00	40	60
23:00	60	40
23:01	30	70
30:00	30	70

4 Rezultati in diskusija

4.1 Delna validacija spektrofotometrične metode

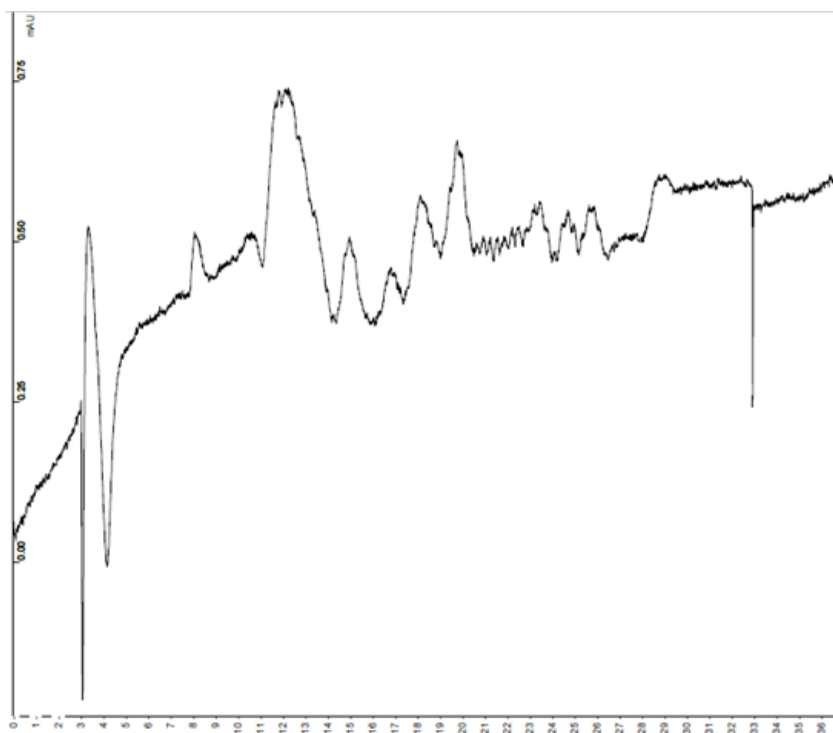
Validacija analizne metode je postopek, s katerim ovrednotimo značilnosti analizne metode in skladno z zahtevami potrdimo, ali je metoda primerna za določeno analizo uporabo ali ne. Linearnost metode smo določali v koncentracijskem območju med 10,00 mg/L in 500,00 mg/L z meritvami standardnih raztopin skupnih silimarinov pri devetih različnih koncentracijah v treh paralelkah. Za vsako umeritveno točko smo v treh paralelkah izmerili absorbance, izračunali povprečne vrednosti absorbanc in določili enačbo umeritvene premice, ki je prikazana na sliki 4-1. Preden smo izračunali povprečne vrednosti absorbanc, smo z Dixonovim in Grubbsovim testom potrdili, da pri meritvah ni bilo prisotnih ubežnikov. Mejo določljivosti (LOQ, angl. *limit of quantification*) metode smo določili na podlagi standardnega odmika odseka in naklona umeritvene premice, ta je znašala 7,87 mg/L. Zahteva, ki smo jo upoštevali pri preverjanju linearnosti metode, je bila, da mora kvadrat korelacijskega koeficienta (r^2) znašati vsaj 0,999 in koeficient kvalitete (QC , angl. *quality coefficient*) mora biti manjši od 5,0 %. Linearnost metode smo tako potrdili v koncentracijskem območju od 10,00 mg/L do 500,00 mg/L, saj smo določili $r^2 = 0,9999$ in $QC = 1,6$ %. Določili smo tudi zgornjo in spodnjo mejo 5-odstotnega intervala zaupanja okrog umeritvene premice, ki ju prikazujeta zelena in modra črta na spodnji sliki. Nazadnje smo preverili, ali lahko potrdimo homogenost varianc meritev na posameznih umeritvenih točkah, vendar jih z uporabo Barlettovega in Cochranovega testa nismo mogli potrditi.



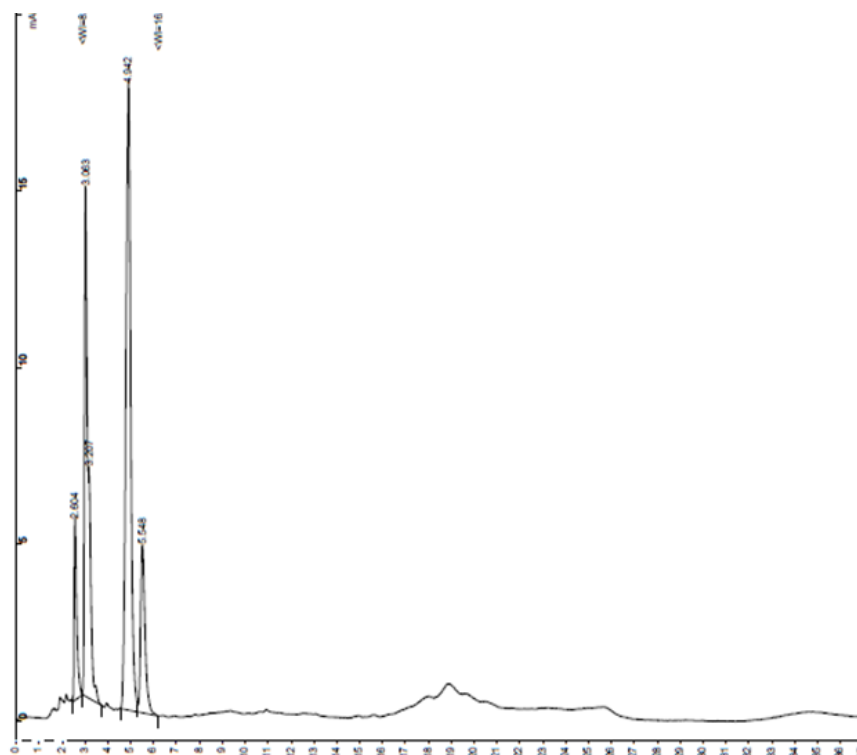
Slika 4-1 Umeritvena premica s 5-odstotnim intervalom zaupanja

4.2 Optimizacije kromatografske ločbe silimarinov

Silimarine lahko kvantitativno določimo z uporabo C-18 RP-HPLC kolone [52]. Na razpolago smo imeli standardni izvleček silimarinov, ki je vseboval naslednje spojine: taksifolin, silikristin, silidianin, silibin A, silibin B ter izosilibin A in izosilibin B. Separacijo vseh spojin smo optimirali na tem standardu s spreminjanjem pogojev, opisanih v poglavju 3.2.3. V prvi fazi smo testirali dve različni RP-HPLC koloni, in sicer: Zorbax Eclipse (150 × 4,6 mm, velikost delcev 5 μm) in Zorbax Eclipse (150 × 4,6 mm, velikost delcev 1,8 μm). Preostali pogoji separacije, kot so sestava mobilne faze (mobilna faza A: acetonitril in mobilna faza B: 1 % očetna kislina v ultra čisti vodi), valovna dolžina ($\lambda = 288 \text{ nm}$), gradientni program in sobna temperatura so bili konstantni. Pri uporabi gradientne metode na C18-RP koloni z velikostjo delcev 1,8 μm nismo dobili ustrezne ločbe komponent oziroma komponent sploh nismo zaznali na kromatogramih (slika 4-2). Značajno boljša separacija je bila dosežena na C18-RP koloni z velikostjo delcev 5 μm, kar lahko vidimo na sliki 4-3.

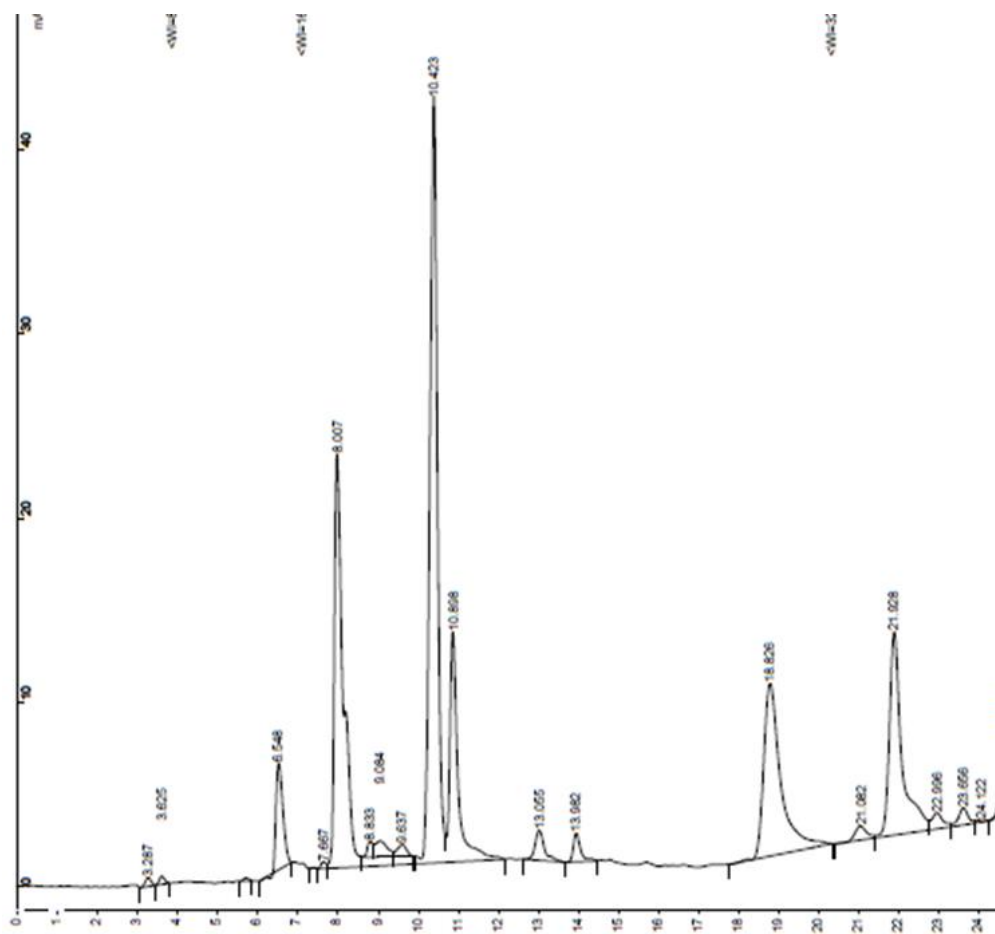


Slika 4-2 HPLC-UV kromatogram standarda flavonolignanov na C18-RP koloni z velikostjo delcev 1,8 μm

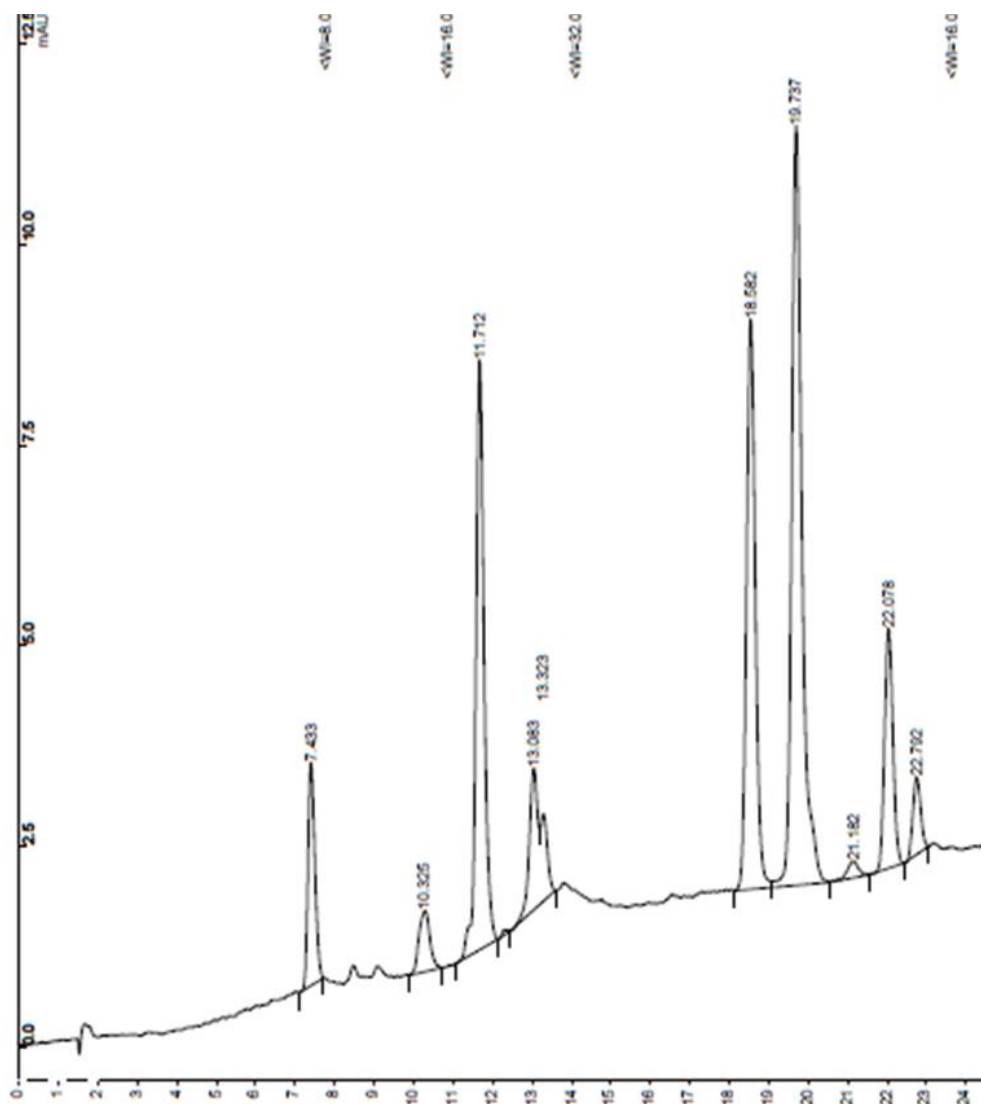


Slika 4-3 HPLC-UV kromatogram standarda flavonolignanov na C18-RP koloni z velikostjo delcev 5 μm

Po izboru ustrezne kolone je bilo potrebno dodatno optimirati sestavo mobilne faze in gradientni program ter izbrati najustreznejšo valovno dolžino za detekcijo preiskovanih komponent. Pri izbiri organskega topila (mobilna faza A) smo se odločali med metanolom in acetonitrilom. Kot je razvidno iz slik 4-4 in 4-5 so testi pokazali, da smo ob uporabi metanola dosegli boljšo separacijo komponent, nekaterih celo do bazne linije (slika 4-5). Medtem ko je pri uporabi acetonitrila (slika 4-4) prišlo do ko-elucije in prekrivanja vrhov za spojini silibin A in silibin B, kot tudi do ko-elucije izomerov izosilibina A in izosilibina B. Pri valovni dolžini 288 nm smo dosegli boljšo zaznavo komponent kot pri 280 nm. Naši rezultati so primerljivi z rezultati objavljenimi v znanstveni literaturi, kjer se ukvarjajo s kvantitativnim določanjem flavonolignanov v ekstraktih pegastega badlja [52], [53].



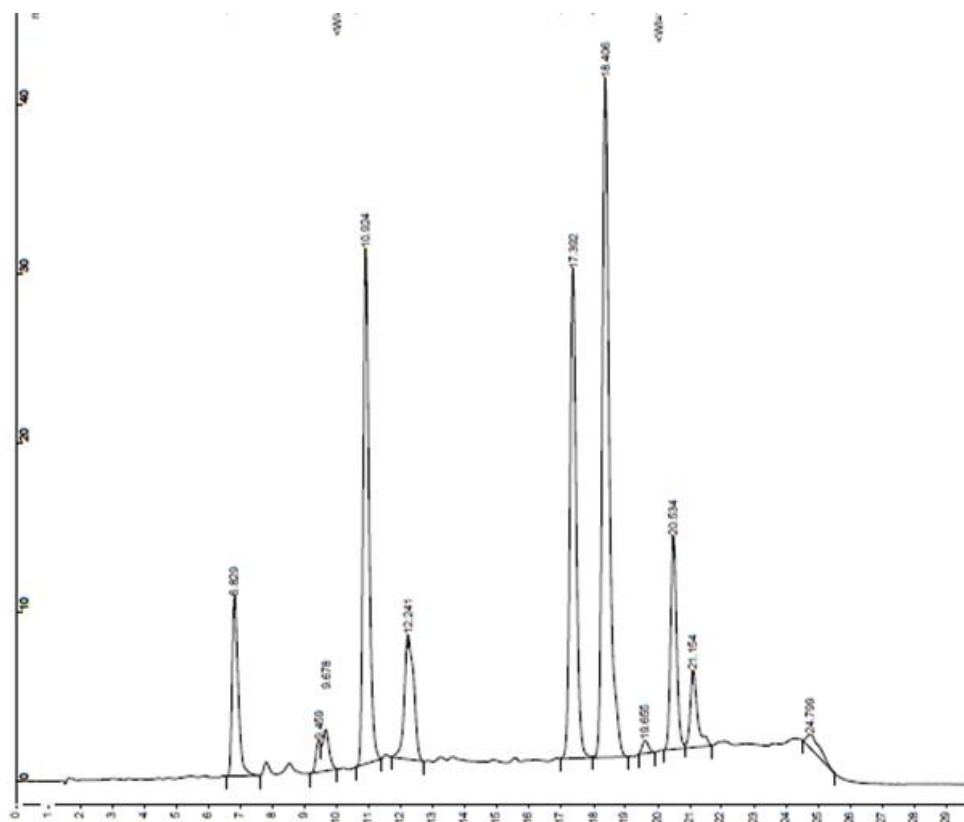
Slika 4-4 HPLC-UV kromatogram standarda flavonolignanov na C18-RP koloni (velikost delcev 5 μm) ob uporabi acetonitrila kot organske faze v gradientnem programu (pretok 1 mL/min, valvna dolžina 288 nm)



Slika 4-5 HPLC-UV kromatogram standarda flavonolignanov na C18-RP koloni (velikost delcev 5 μm) ob uporabi metanola kot organske faze v gradientnem programu (pretok 1 mL/min, valovna dolžina 288 nm)

Nadalje smo optimirali še gradientno elucijo spojin. Cilj te optimizacije je bil doseči čimboljšo ločbo spojin v čimkrajšem času.

Testiranih je bilo več različnih metod in končno smo najboljšo ločitev (slika 4-6) dosegli pod naslednjimi pogoji: mobilna faza je bila sestavljena iz topila A (100 % metanol) in topila B (1 % vodna raztopina očetne kisline); uporabljena je bila gradientna elucija pri sobni temperaturi, pretok 1 mL min⁻¹. Detekcija je potekala pri valovni dolžini 288 nm, skupni čas analize je bil 30 minut. Tako optimirano metodo smo uporabili v nadaljnjem delu na raztopinah standardov pri meritvah za umeritveno krivuljo ter na realnih vzorcih.



Slika 4-6 Tipičen HPLC-UV kromatogram standarda flavonolignanov, analiziranega po optimirani gradientni metodi: mobilna faza A: 100 % metanol in mobilna faza B: 1 % očetna kislina v ultra čisti vodi, čas analize 30 min, valovna dolžina 288 nm

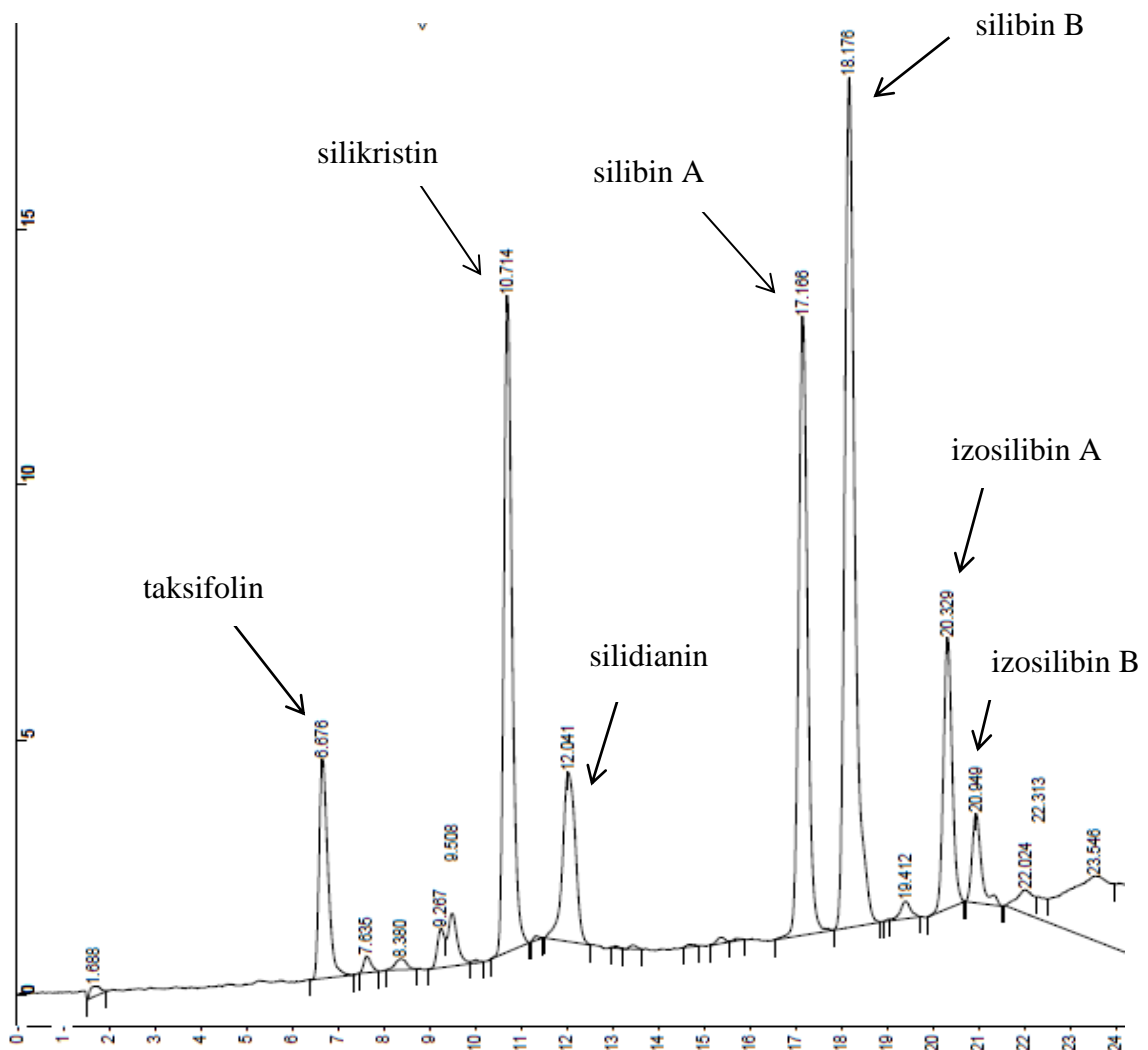
Identifikacija posameznih komponent je podana v tabeli 3:

Tabela 3 Identificirane komponente in njihovi retencijski časi

t_R (min)	Komponenta
6,8	Taksifolin (taxifolin)
10,9	Silikristin (silychristin)
12,2	Silidianin (silydianin)
17,3	Silibin A (silybin A)
18,4	Silibin B (silybin B)
20,5	Izosilibin A (isosilybin A)
21,1	Izosilibin B (isosilybin B)

4.3 Kvantifikacija skupnih silimarinov

Vsak vzorec za posamezno DES topilo in 80 % EtOH je bil ločeno pripravljen dva krat in vsakič analiziran v dveh paralelkah pri valovni dolžini 288 nm. Umeritvene premice smo pripravljali tako, da smo na y-os nanašali seštevke vseh ploščin karakterističnih vrhov silimarinov (slika 4-1) pri določeni koncentraciji, na x-os pa koncentracije. Koncentracije skupnih silimarinov v vzorcih smo izračunali s pomočjo enačbe umeritvene premice. Z upoštevanjem faktorja redčenja smo preračunali, kolikšna je bila začetna koncentracija skupnih silimarinov v posameznem vzorcu. Rezultate smo podali kot povprečne vrednosti prve in druge paralelke za posamezno topilo in njun standardni odklon. Na sliki 4-7 je prikazan kromatogram standardne raztopine silimarinov pri koncentraciji 100 mg/L, na katerem so označeni in poimenovani vsi karakteristični vrhovi.



Slika 4-7 Kromatogram standardne raztopine silimarinov z vsemi karakterističnimi vrhovi

Rezultati so podani v tabeli 4, kjer je za vsak posamezen DES in 80 % EtOH podana povprečna vrednost koncentracije skupnih silimarinov 1. in 2. paralelke, pri čemer je bila vsaka paralelka analizirana dva krat, in njen standardni odklon.

Tabela 4 Koncentracije skupnih silimarinov v posameznih globoko evtektičnih topilih in v 80 % etanolu

Oznaka topila	Sestava topila	Skupni silimarini [mg/L]
DES1	holin klorid : mlečna kislina	162,97 ± 97,25
DES2	mentol : 1,4-butandiol	32,73 ± 33,08
DES3	holin klorid : 1,4-butandiol	221,74 ± 15,57
DES4	holin klorid : urea	107,20 ± 1,70
DES5	holin klorid : 1,2-propandiol	250,18 ± 43,91
Etanol	80 % EtOH	887,70 ± 26,29

Iz tabele 4 lahko razberemo, da se je najmanj silimarinov sprostilo v vzorcu s topilom DES2, ki je vseboval mentol in 1,4-butandiol in je bil edino topilo, kateremu nismo dodali določenega deleža vode, torej hidrofobno. Tako malo koncentracijo skupnih silimarinov, ki se je izločila v DES2, lahko pripišemo tudi temu, da na obeh kromatogramih 2. paralelke ni bilo zaznanih vseh sedmih aktivnih komponent silimarinov, temveč samo štiri (priloga 7.6). Očitno je, da delež vode v topilu poveča izkoristek ekstrakcije silimarinov. Najverjetneje lahko povečan izkoristek ekstrakcije silimarinov po dodatku vode v topilo povežemo z zmanjšanjem viskoznosti topila, kar pripomore k pospešenemu in boljšemu sproščanju flavonolignanov in flavonoida taksifolina v topilo. Kot lahko vidimo iz tabele je koncentracija skupnih silimarinov, ki so se sprostiti v DES3 in DES5, dokaj primerljiva. Za 28,44 mg/L več silimarinov se je sprostilo v DES5, ki vsebuje holin klorid in 1,2-propandiol, slednji pa je bolj polaren kot 1,4-butandiol v DES3. Daleč največ silimarinov, tj. 887,70 ± 26,29 mg/L, pa se je sprostilo v 80 % EtOH, ki je prav tako polarno (protično) topilo. Koncentraciji skupnih silimarinov, ki so se sprostiti v DES1 in DES4, sta prav tako zelo nizki, in sicer 162,97 ± 97,25 mg/L ter 107,20 ± 1,70 mg/L, pri čemer vidimo, da je pri DES4 najmanjši standardni odklon v koncentraciji sproščenih silimarinov, tj. 1,70 mg/L, ravno nasprotno pa je pri DES1, kjer je prišlo do največjega standardnega odklona, tj. 97,25 mg/L. Na tem mestu bi v prihodnje lahko naredili več paralelek DES1 (holin klorid : mlečna kislina) in jih analizirali,

da bi videli, ali pogosto prihaja do velikih standardnih odklonov v koncentraciji sproščenih silimarinov.

Izkoristek ekstrakcije silimarinov z uporabo globoko evtektičnih topil bi lahko izboljšali tako, da bi topilom dodali večji delež vode, namreč vsebnost le-te zviša koncentracijo sproščenih silimarinov, saj zmanjša viskoznost globoko evtektičnih topil, ki pa so v našem primeru bila zelo viskozna. Zato bi lahko dodatek vode iz zdajšnjih 25 % zvišali na 35 % ali 40 % in spremljali, za koliko bi se koncentracija sproščenih silimarinov povišala. Viskoznosti in gostote DES/NADES topil lahko znatno zmanjšamo z dodajanjem vode, vendar je treba dodajanje vode v DES topila opraviti previdno, saj lahko velik presežek vode pretrga vodikove vezi med sestavnimi komponentami in tako proizvedeno topilo izgubi evtektične lastnosti [54]. Različne študije so pokazale, da je najbolj optimalna vsebnost vode v DES topilih med 20 % in 40 % [55], [56]. Prav tako bi lahko optimizirali pogoje ultrazvočne ekstrakcije, in sicer lahko bi podaljšali čas ekstrakcije iz 30 minut na 60 minut ali 90 minut, povišali temperaturo ekstrakcije in čas centrifugiranja. Vse to bi naredili v večih paralelkah, da bi lažje spremljali ponovljivost in z večjo zagotovostjo trdili, kako optimirani parametri vplivajo na izkoristek ekstrakcije silimarinov iz pegastega badlja z uporabo globoko evtektičnih topil.

Povzamemo lahko, da so silimarini torej bolj topni v polarnih topilih, a vendar bo potrebno še veliko raziskav na področju globoko evtektičnih topil v povezavi s silimarini v pegastem badlju, da bi lahko njihov učinek na ekstrakcijo silimarinov iz pegastega badlja zaključili v dodelano celoto.

5 Zaključek

Težnja po zamenjavi toksičnih organskih topil z okolju prijaznimi, neškodljivimi topili je vedno večja. Iz tega razloga globoko evtektična topila pridobivajo na pozornosti in na številu raziskav, saj so enostavna za pripravo, okolju neškodljiva, cenovno ugodna in biorazgradljiva. V magistrskem delu je bila predstavljena njihova uporaba kot alternativa organskim topilom pri ekstrakciji aktivnih učinkovin iz pegastega badlja, ki ima izreden pomen pri zdravljenju jetrnih bolezni. Za namene ekstrakcije aktivnih učinkovin iz pegastega badlja smo sintetizirali pet različnih globoko evtektičnih topil in kot šesto – primerjalno konvencionalno topilo pripravili 80 % etanol. Glavna aktivna komponenta pegastega badlja je silimarin, ki velja za polarno spojino in je najbolje topna v polarnih aprotičnih topilih, malo slabše topna v polarnih protičnih topilih in netopna v nepolarnih topilih. Rezultati so pokazali, da se je največ silimarinov sprostito v 80 % etanolu, ki je polarno protično topilo. Sledili sta globoko evtektični topili iz holin klorida in 1,2-propandiola ter holin klorida in 1,4-butandiola. Njima sta sledili globoko evtektični topili iz holin klorida in mlečne kisline ter holin klorida in sečnine, najmanj silimarinov pa se je sprostito v globoko evtektično topilo iz mentola in 1,4-butandiola, ki je bilo tudi edino topilo brez vsebnosti vode, tj. hidrofobno. Potrdimo lahko, da je vsebnost vode v topilih prispevala k boljši ekstrakciji silimarinov iz pegastega badlja, a raziskave na področju globoko evtektičnih topil za namene ekstrakcij silimarinov iz pegastega badlja kljub temu niso pokazale zadovoljivih rezultatov in bo v prihodnosti potrebno narediti še mnogo teh, da bi povečali izkoristek ekstrahiranih silimarinov iz pegastega badlja.

6 Literatura

- [1] Huddleston J. G., Willauer H. D., Swatloski R. P., Visser A. E., Rogers R. D. Room temperature ionic liquids as novel media for 'clean' liquid-liquid extraction. *Chemical Communications*. (16), 1765-1766, 1998.
- [2] Paiva P., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R. L., Duarte A. R. C. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2 (5), 1063-1071, 2014.
- [3] Oliveira F. S., Pereiro A. B., Luís P. N. R. Deep eutectic solvents as extraction media for azeotropic mixtures. *Green Chemistry*. 15 (5), 1326-1330, 2013.
- [4] Zhang Q., De Oliveira-Vigier K., Royer S., Jérôme F. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*. 41 (21), 7108-7146, 2012.
- [5] Dai Y., van Spronsen J., Withamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y. H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*. 766, 61-68, 2013.
- [6] Choi Y. H., van Spronsen J., Dai Y., Verbenne M., Hollmann F., Arends I. W. C. E., Verpoorte R. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology*. 156 (4), 1701-1705, 2011.
- [7] Morrison H. G., Sun C. C., Neervannan S. Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *International Journal of Pharmaceutics*. 378 (1-2), 136-139, 2009.
- [8] Dai Y., Verpoorte R., Choi Y. H. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chemistry*. 159, 116-121, 2014.
- [9] Gu T., Zhang M., Tan T., Chen J., Li Z., Zhang Q., Qiu H. Deep eutectic solvents as novel extraction media for phenolic compounds from model oil. *Chemical Communications*. 50 (79), 11749-11752, 2014.
- [10] Abbott A. P., Cullis P. M., Gibson M. J., Harris R. C., Raven E. Extraction of glycerol from biodiesel into a eutectic based ionic liquid. *Green Chemistry*. 9 (8), 868-872, 2007.
- [11] Nam M. W., Zhao J., Lee M. S., Jeong J. H., Lee J. Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*. *Green Chemistry*. 17 (3), 1718-1727, 2015.
- [12] Zhang H., Tang B., Row K. Extraction of catechin compounds from green tea with a new green solvent. *Chemical Research in Chinese Universities*. 30 (1), 37-41, 2014.
- [13] Park H. E., Tang B., Row K. H. Application of Deep Eutectic Solvents as Additives in Ultrasonic Extraction of Two Phenolic Acids from *Herba Artemisiae Scopariae*. *Analytical Letters*. 47 (9), 1476-1484, 2014.
- [14] Tang B., Bi W., Zhang H., Row K. H. Deep Eutectic Solvent-Based HS-SME Coupled with GC for the Analysis of Bioactive Terpenoids in *Chamaecyparis obtusa* Leaves. *Chromatographia*. 77 (3-4), 373-377, 2013.
- [15] Ribeiro B. D., Coelho M. A. Z., Marrucho I. M. Extraction of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*) with cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents. *European Food Research and Technology*. 237 (6), 965-975, 2013.

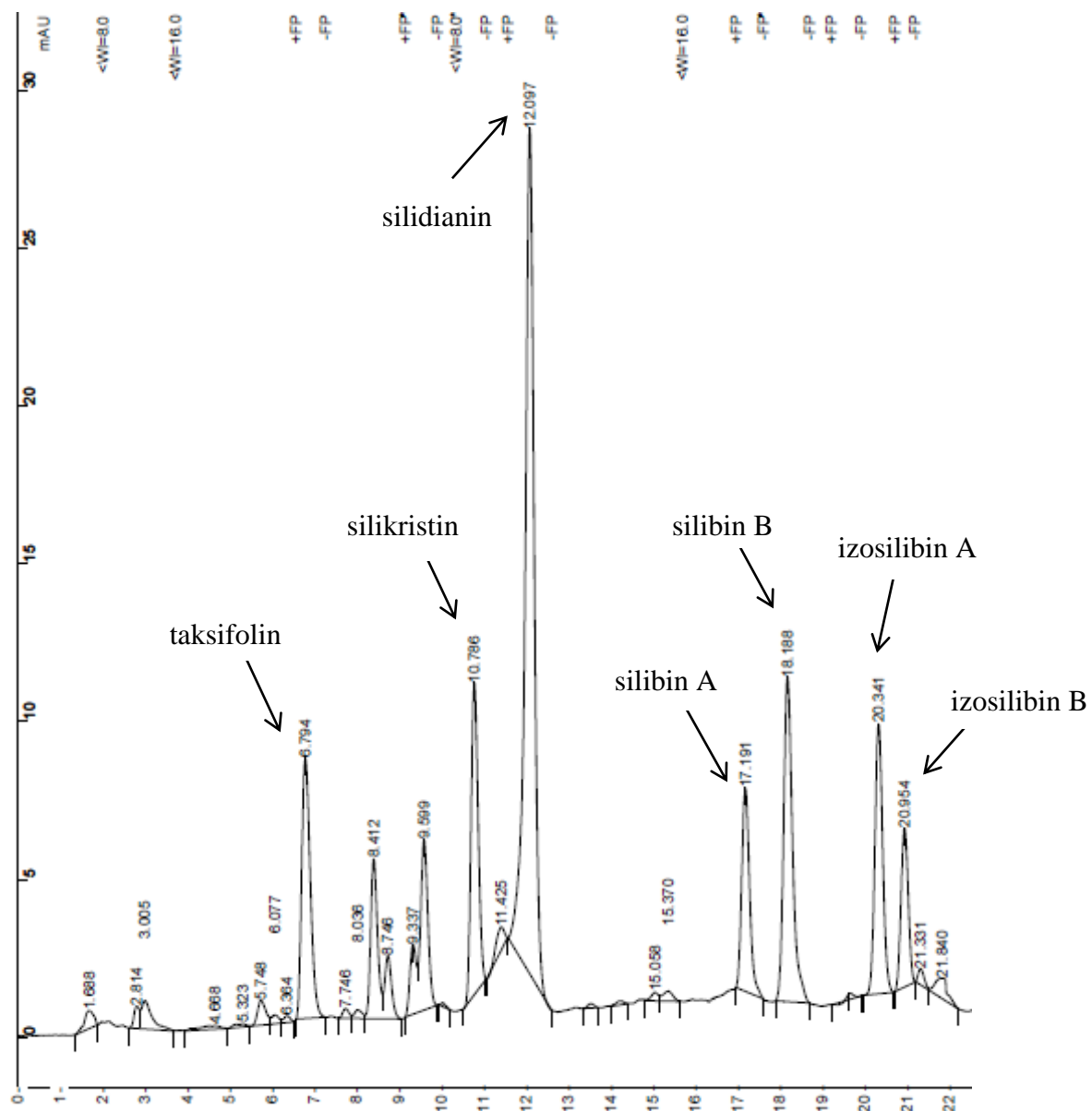
- [16] Li W., Han J., Li Z., Li X., Zhou S., Liu C. Preparative chromatographic purification of diastereomers of silybin and their quantification in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 862 (1-2), 51-57, 2008.
- [17] Hadad G. M., Emara S., Abdel-Salam R. A. Validated Optimized Method for Simultaneous Analysis of Active Silymarin Components and Dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene Dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate in a Pharmaceutical Preparation by Use of a Monolithic Silica C18 Column. *Chromatographia*. 70 (1-2), 217-221, 2009.
- [18] Wang K., Zhang H., Shen L., Du Q., Li J. Rapid separation and characterization of active flavonolignans of *Silybum marianum* by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 53 (4), 1053-1057, 2010.
- [19] Jeon H., Lim C., Lee J. M., Kim S. Chemical assay-guided natural product isolation via solid-supported chemodosimetric fluorescent probe. *Chemical Science*. 6 (5), 2806-2811, 2015.
- [20] Li J. W.-H., Vederas J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*. 325 (5937), 161-165, 2009.
- [21] Sticher O. Natural product isolation. *Natural Product Reports*. 25 (3), 517-554, 2008.
- [22] Qian J. The efficiency of flavonoids in polar extracts of *Lycium Chinese* Mill fruits as free radical scavenger. *Food Chemistry*. 87 (2), 283-288, 2004.
- [23] Lin J.-Y., Tang C.-Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*. 101 (1), 140-147, 2007.
- [24] Teo C. C., Tan S. N., Yong J. W. H., Hew C. S., Ong E. S. Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*. 1217 (16), 2484-2494, 2010.
- [25] Mokgadi J., Turner C., Torto N. Pressurized hot water extraction of alkaloids in goldenseal. *American Journal of Analytical Chemistry*. 4, 398-403, 2013.
- [26] Clardy J., Walsh C. Lessons from natural molecules. *Nature*. 432 (7019), 829-837, 2004.
- [27] <https://www.zdravje.si/pegasti-badelj> (dostop 11.08.2020).
- [28] Flora K., Hahn M., Rosen H., Benner K. Milk Thistle (*Silybum marianum*) for the Therapy of Liver Disease. *The American Journal of Gastroenterology*. 93 (2), 139-143, 1998.
- [29] Rickling B., Hans B., Kramarczyk R., Krumbiegel G., Weyhenmeyer R. Two high-performance liquid chromatographic assays for the determination of free and total silibinin diastereomers in plasma using column switching with electrochemical detection and reversed-phase chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 670 (2), 267-277, 1995.
- [30] Quaglia M., Bossú E., Donati E., Mazzanti G., Brandt A. Determination of silymarin in the extract from the dried *silybum marianum* fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 19 (3-4), 435-442, 1999.
- [31] Kvasnička F., Bíba B., Ševčík R., Voldřich M., Krátká J. Analysis of the active components of silymarin. *Journal of Chromatography A*. 990 (1-2), 239-245, 2003.

- [32] Larrauri J. A., Sánchez-Moreno C., Rupérez P., Saura-Calixto F. Free Radical Scavenging Capacity in the Aging of Selected Red Spanish Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (4), 1603-1606, 1999.
- [33] Miller N. J., Rice-Evans C. A. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*. 2 (3), 161-171, 1996.
- [34] Alonso Á. M., Domínguez C., Guillén D. A., Barroso C. G. Determination of Antioxidant Power of Red and White Wines by a New Electrochemical Method and Its Correlation with Polyphenolic Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (11), 3112-3115, 2002.
- [35] Abbott A. P., Capper G., Davies D. L., Rasheed R. K., Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*. (1), 70-71, 2003.
- [36] Cvjetko Bubalo M., Panić M., Radošević K., Radojčić Redovniković I. Metode priprave eutektičkih otapala. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 11 (3-4), 164-168, 2016.
- [37] Zhao H., Zhang C., Crittle T. D. Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 85-86, 243-247, 2013.
- [38] Hayyan A., Mjalli F. S., AlNashef I. M., Al-Wahaibi T., Al-Wahaibi Y. M., Hashim M. A. Fruit-sugar based deep eutectic solvents and their physical properties. *Thermochimica Acta*. 541, 70-75, 2012.
- [39] Maugeri Z., Domínguez de María P. Whole-Cell Biocatalysis in Deep-Eutectic-Solvents/Aqueous Mixtures. *ChemCatChem*. 6 (6), 1535-1537, 2014.
- [40] Abbott A. P., Boothby D., Capper G., Davies D. L., Rasheed R. K. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of American Chemical Society*. 126 (29), 9142-9147, 2004.
- [41] Dai Y., Spronsen J., Witkamp G. J., Verpoorte R., Choi Y. H. Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents. *Journal of Natural Products*. 76 (11), 2162-2173, 2013.
- [42] Popescu A. M., Constantin V. Synthesis, Characterization and Thermophysical Properties of Three Neoteric Solvents-Ionic Liquids Based on Choline Chloride. *Chemical Research in Chinese Universities*. 30 (1), 119-124, 2014.
- [43] Gutiérrez M. C., Ferrer M. L., Mateo C. R., del Monte F. Freeze-Drying of Aqueous Solutions of Deep Eutectic Solvents: A Suitable Approach to Deep Eutectic Suspensions of Self-Assembled Structures. *Langmuir*. 25 (10), 5509-5515, 2009.
- [44] Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. Phenolic-compound-extraction systems from fruit and vegetable samples. *Molecules*. 15 (12), 8813-8826, 2010.
- [45] Deetlefs M., Seddon K. R. (2010) The green synthesis of ionic liquids. U: Wasserscheid P., Stark A. (ed): *Handbook of Green Chemistry – Volume 6*, p. 1-38. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany.
- [46] Tang B., Zhang H., Row K. H. Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. *Journal of Separation Science*. 38 (6), 1053-1064, 2015.

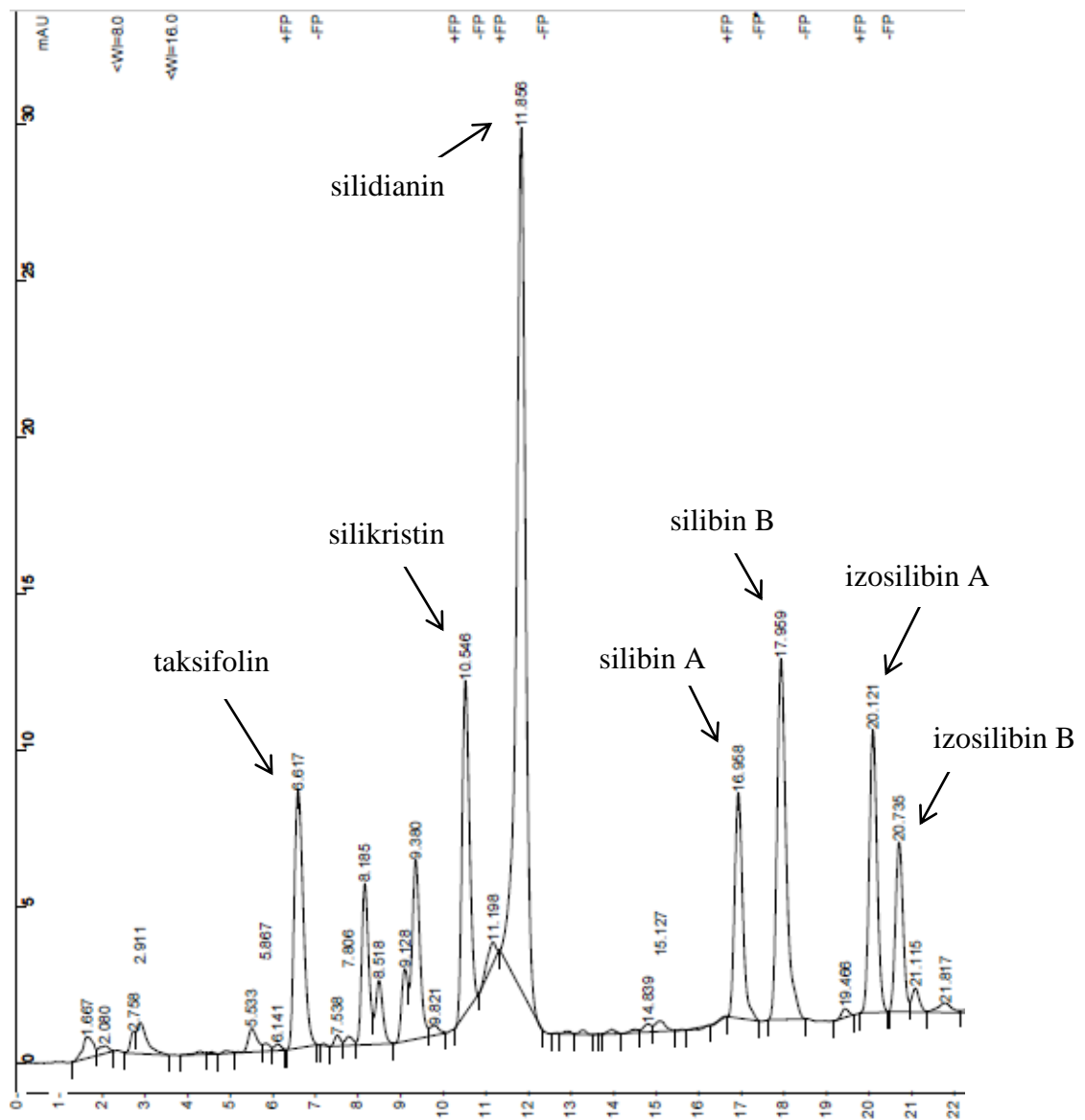
- [47] Herrero M., Plaza M., Cifuentes A., Ibáñez E. Extraction Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Food. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. 4, 159-180, 2012.
- [48] <https://www.fishersci.se/se/en/scientific-products/centrifuge-guide/centrifugation-theory.html#:~:text=Centrifugation%20is%20a%20technique%20used,spun%20at%20a%20define%20speed.> (dostop 31.07.2020).
- [49] <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=8468#:~:text=High%2Dperformance%20liquid%20chromatography%20or,individual%20components%20of%20the%20mixture.> (dostop 31.07.2020).
- [50] Saha S. K., Dey S., Chakraborty R. Effect of choline chloride-oxalic acid based deep eutectic solvent on the ultrasonic assisted extraction of polyphenols from *Aegle marmelos*. *Journal of Molecular Liquids*. 287, 110956-110966, 2019.
- [51] Anthony K., Subramanya G., Uprichard S., Hammouda F., Saleh M. Antioxidant and Anti-Hepatitis C Viral Activities of Commercial Milk Thistle Food Supplements. *Antioxidants*. 2, 23-36, 2013.
- [52] Fibigr J., Šatínský D., Solich P. A new approach to the rapid separation of isomeric compounds in a *Silybum marianum* extract using UHPLC core-shell column with F5 stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 134, 203-213, 2017.
- [53] Pendry B. A., Kemp V., Hughes M. J., Freeman J., Nuhu H. K., Sanchez-Medina A., Galante E. Silymarin content in *Silybum marianum* extracts as a biomarker for the quality of commercial tinctures. *Journal of Herbal Medicine*. 10, 31-36, 2017.
- [54] Vilková M., Płotka-Wasyłka J., Andruch V. The role of water in deep eutectic solvent-base extraction. *Journal of Molecular Liquids*. 304, 112747, 2020.
- [55] Hammond S. O., Bowron T. D., Edler J. K. The Effect of Water upon Deep Eutectic Solvent Nanostructure: An Unusual Transition from Ionic Mixture to Aqueous Solution. *Angewandte Chemie*. 129, 9914-9917, 2017.
- [56] Liu Y., Friesen J. B., McAlpine J. B., Lankin D. C., Chen S., Pauli G. F. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *Journal of Natural Products*. 81, 679-690, 2018.

7 Priloge

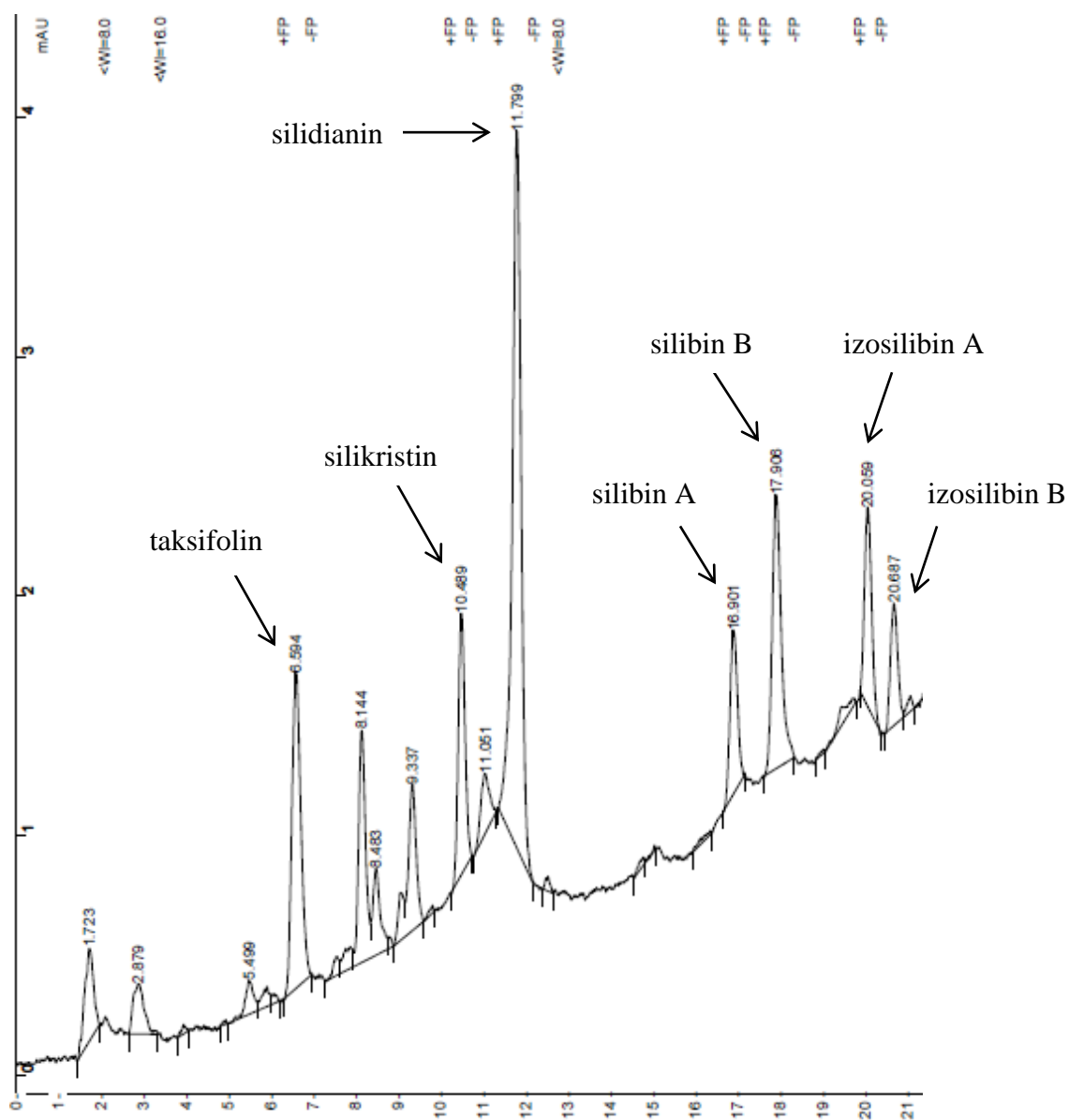
7.1 Kromatogram 1. paralelke 80 % EtOH



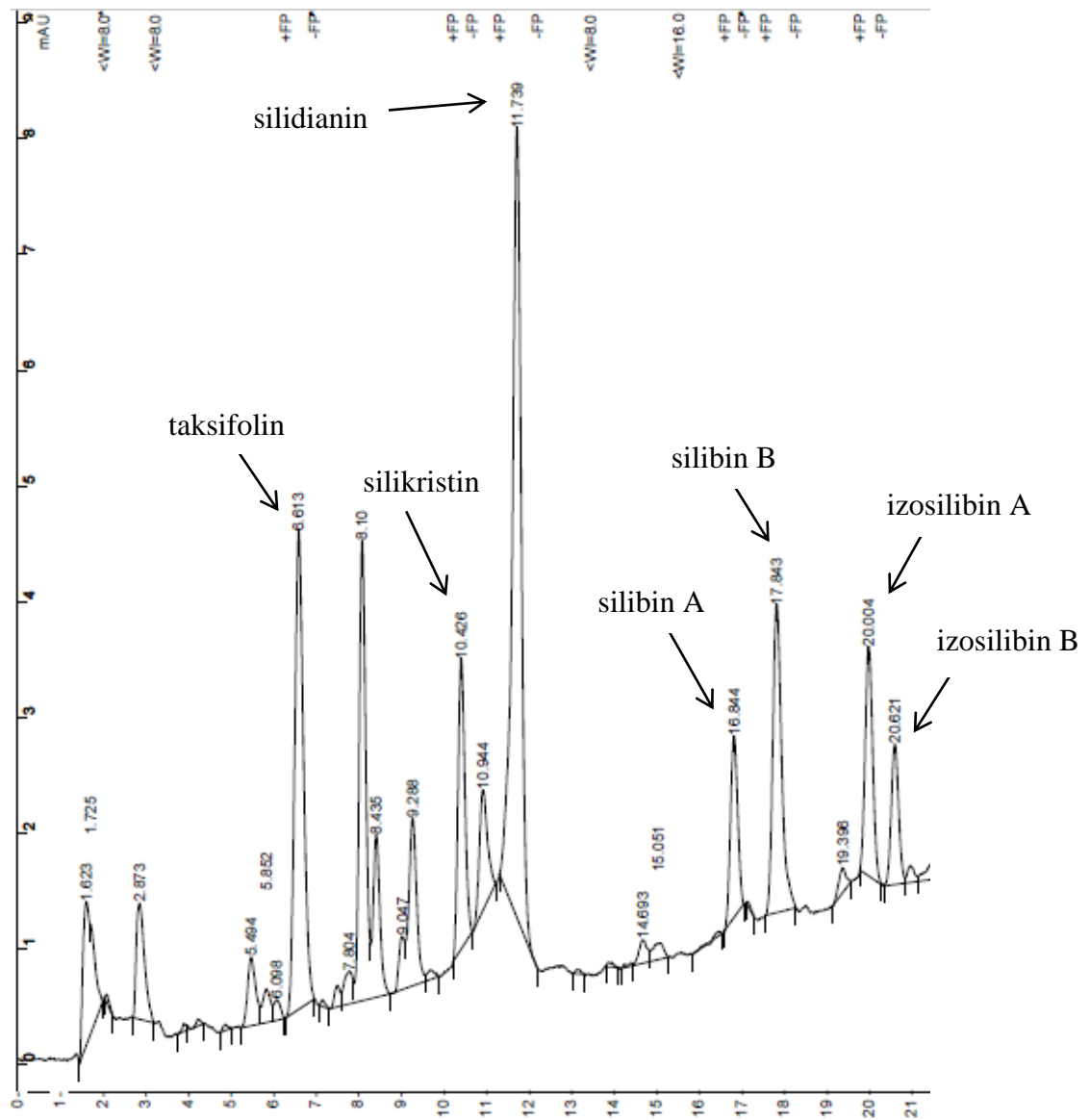
7.2 Kromatogram 2. paralelke 80 % EtOH



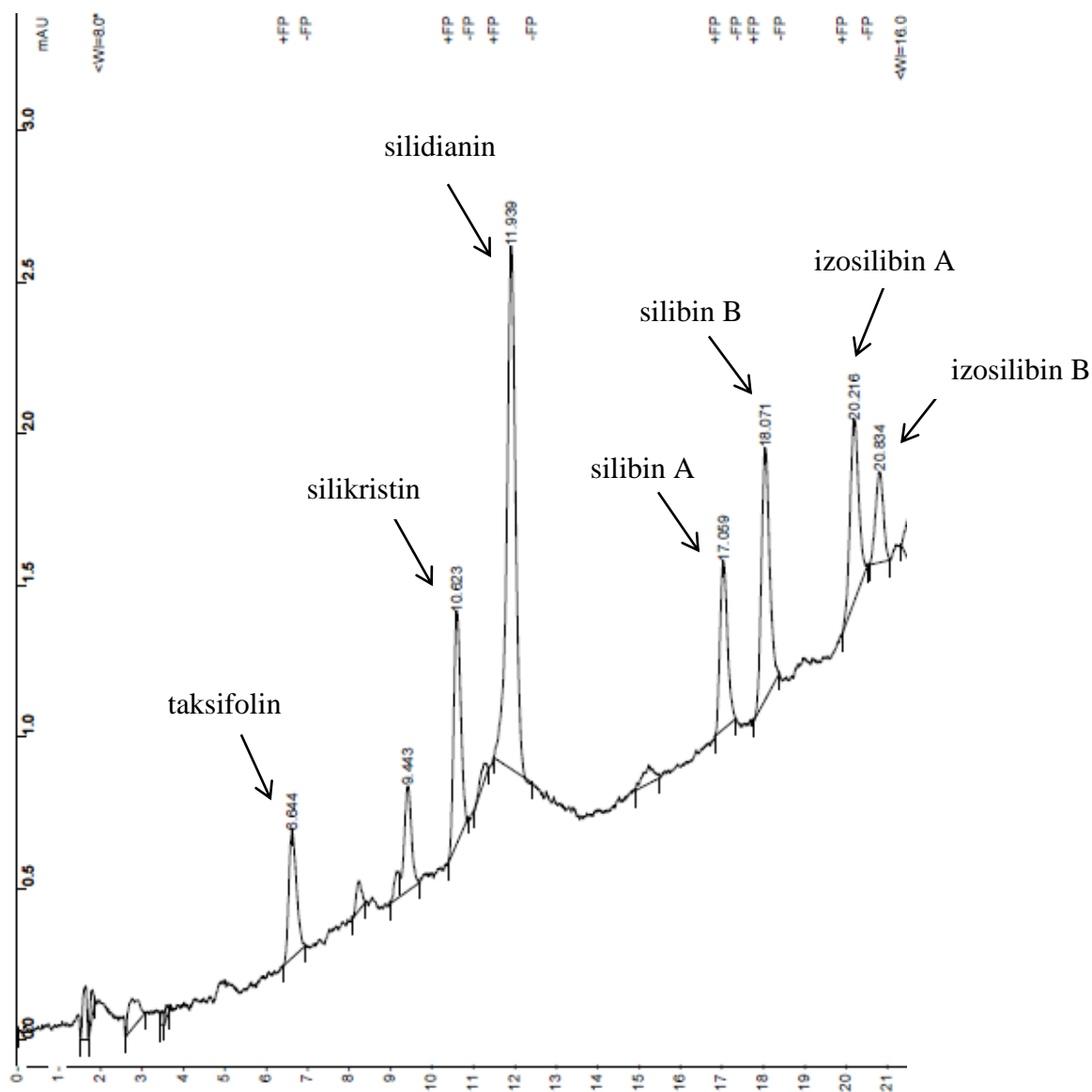
7.3 Kromatogram 1. paralelke DES1 (holin klorid : mlečna kislina)



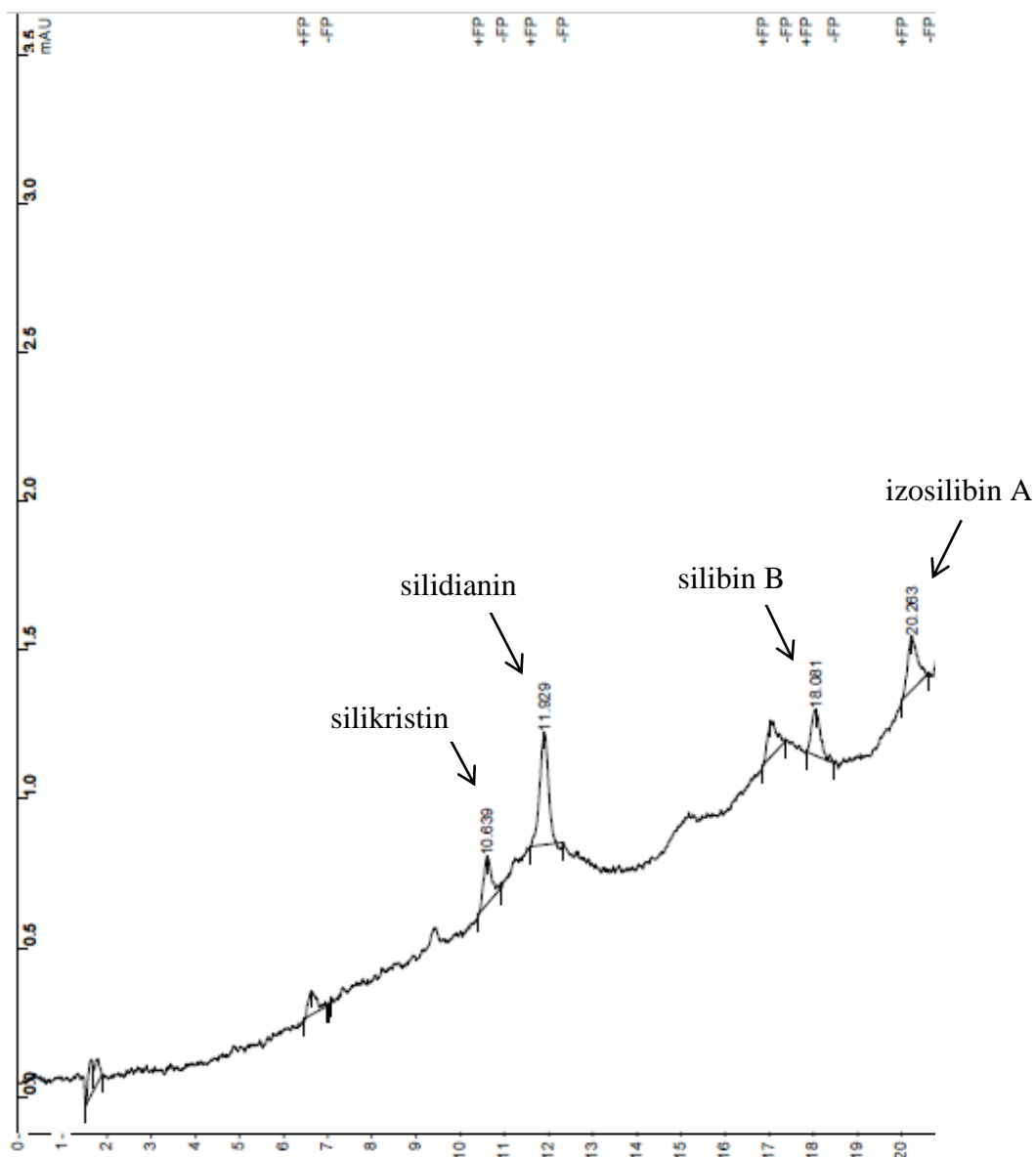
7.4 Kromatogram 2. paralelke DES1 (holin klorid : mlečna kislina)



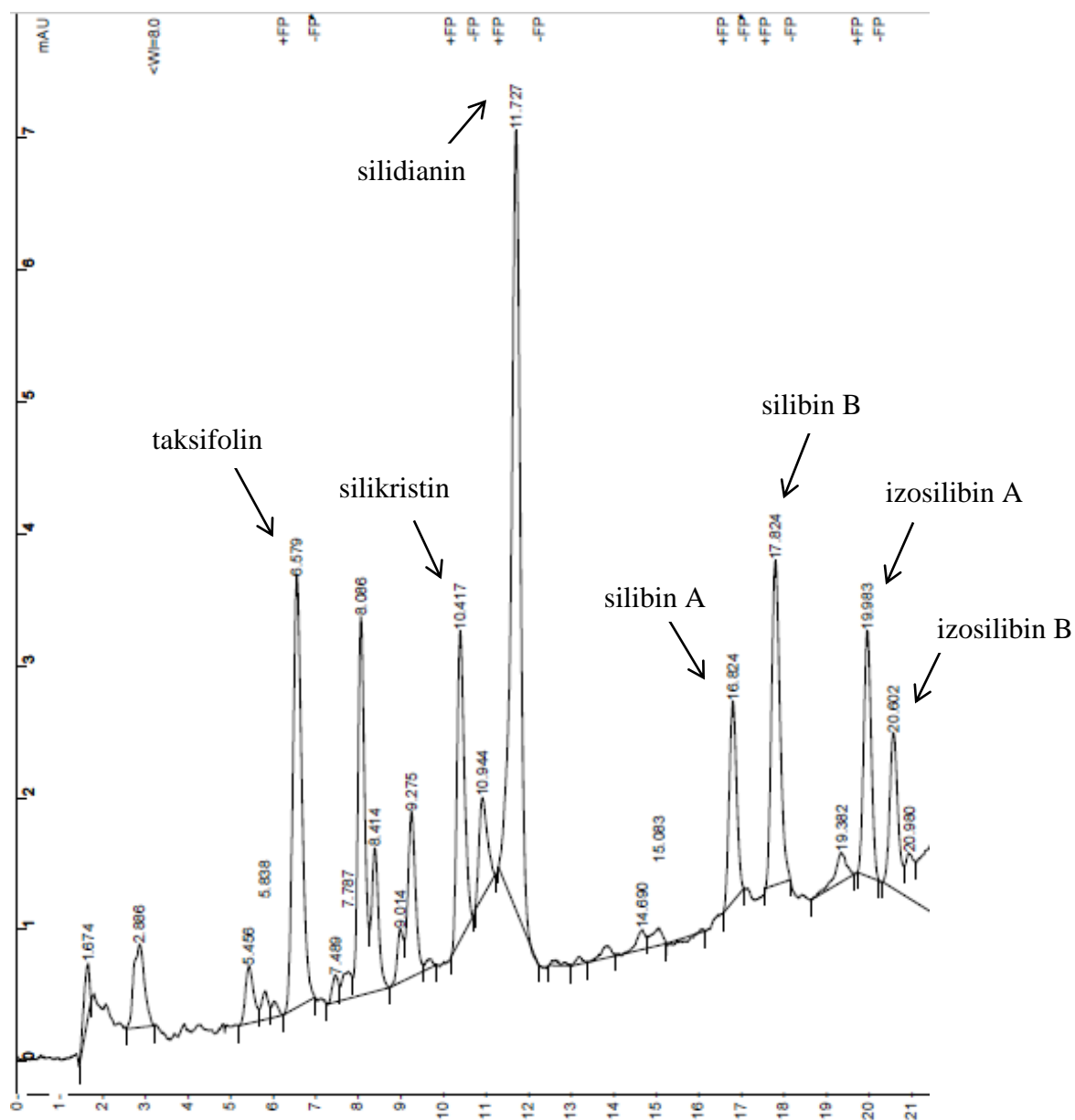
7.5 Kromatogram 1. paralelke DES2 (mentol : 1,4-butandiol)



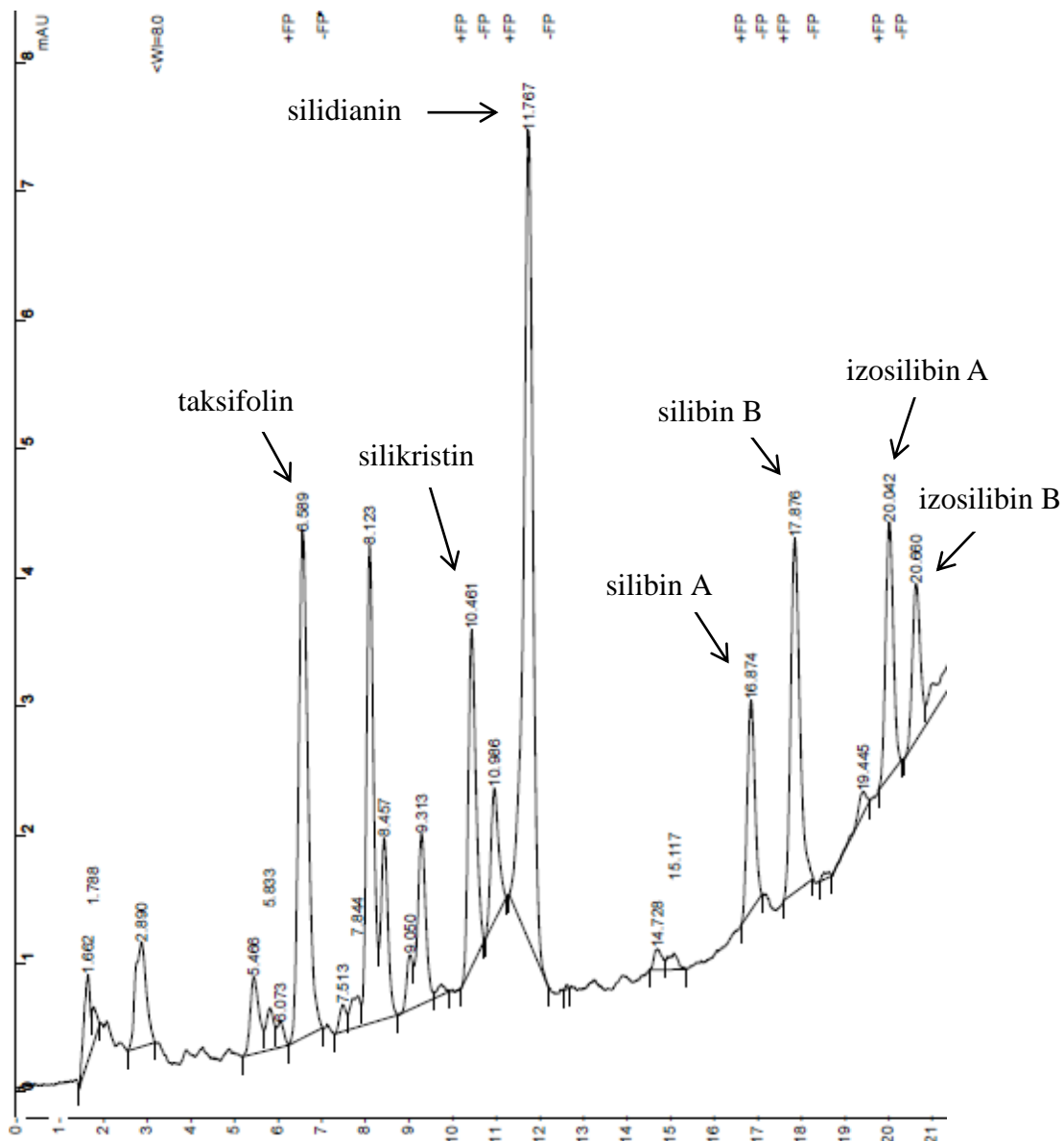
7.6 Kromatogram 2. paralelke DES2 (mentol : 1,4-butandiol)



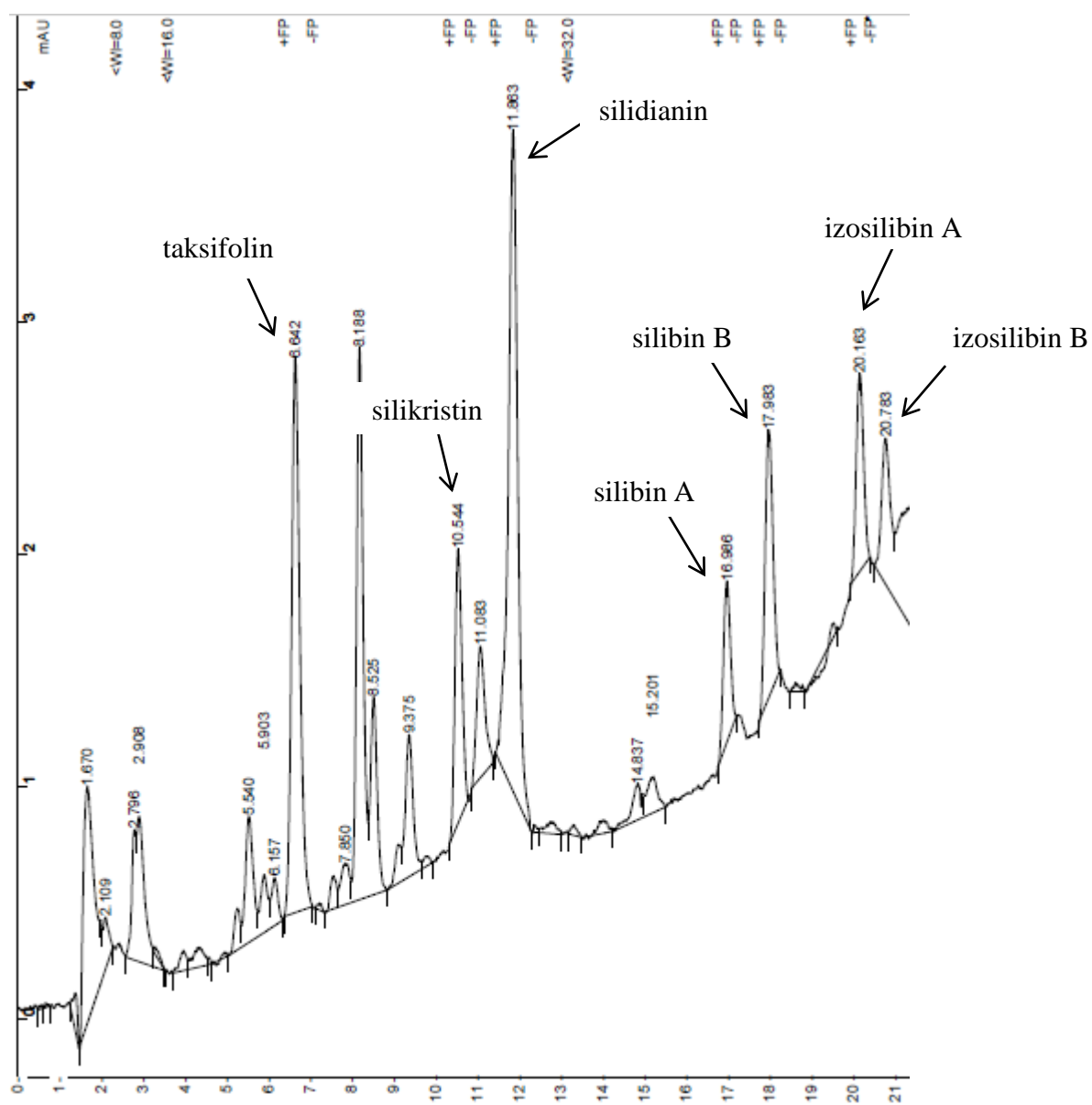
7.7 Kromatogram 1. paralelke DES3 (holin klorid : 1,4-butandiol)



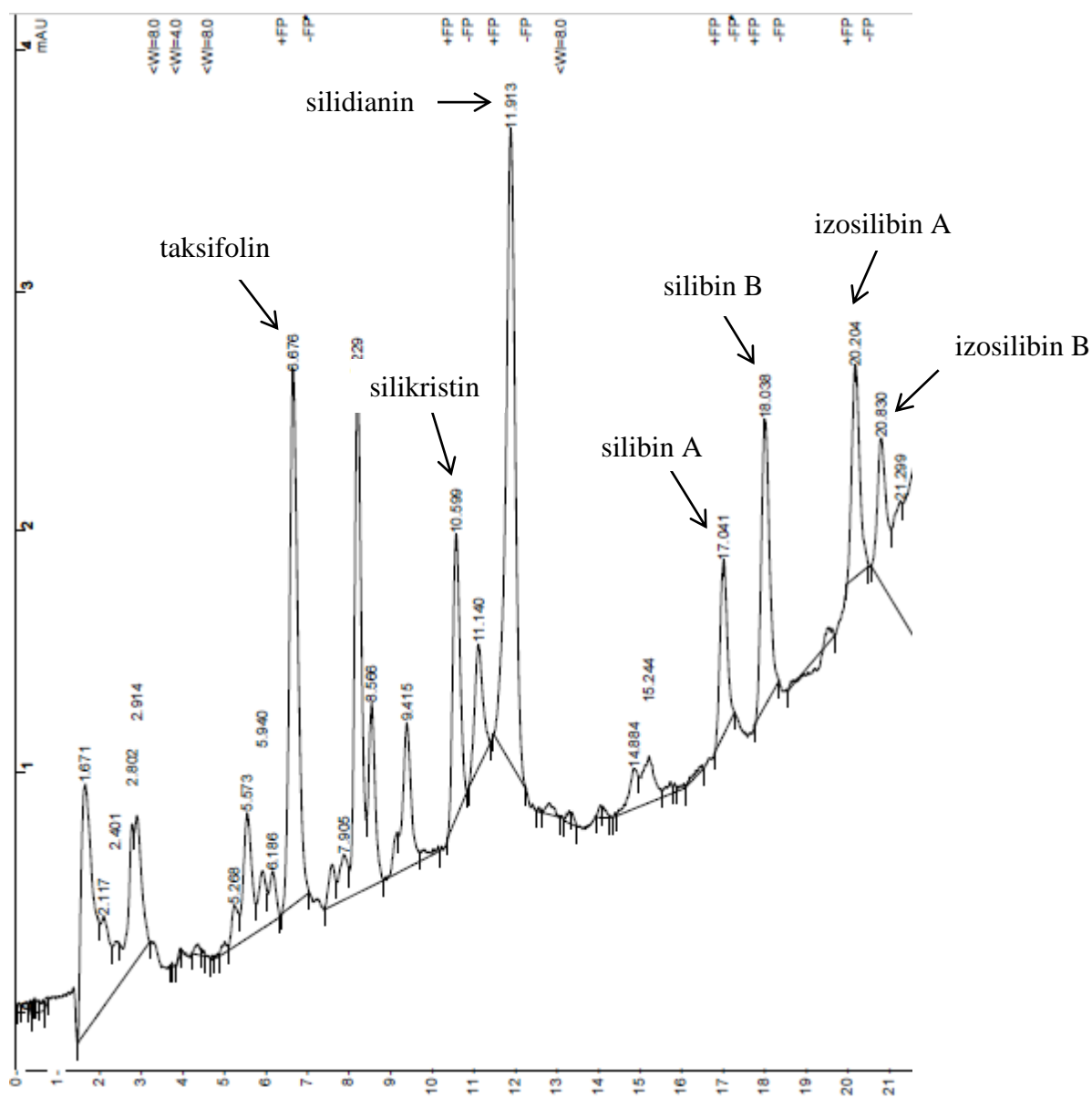
7.8 Kromatogram 2. paralelke DES3 (holin klorid : 1,4-butandiol)



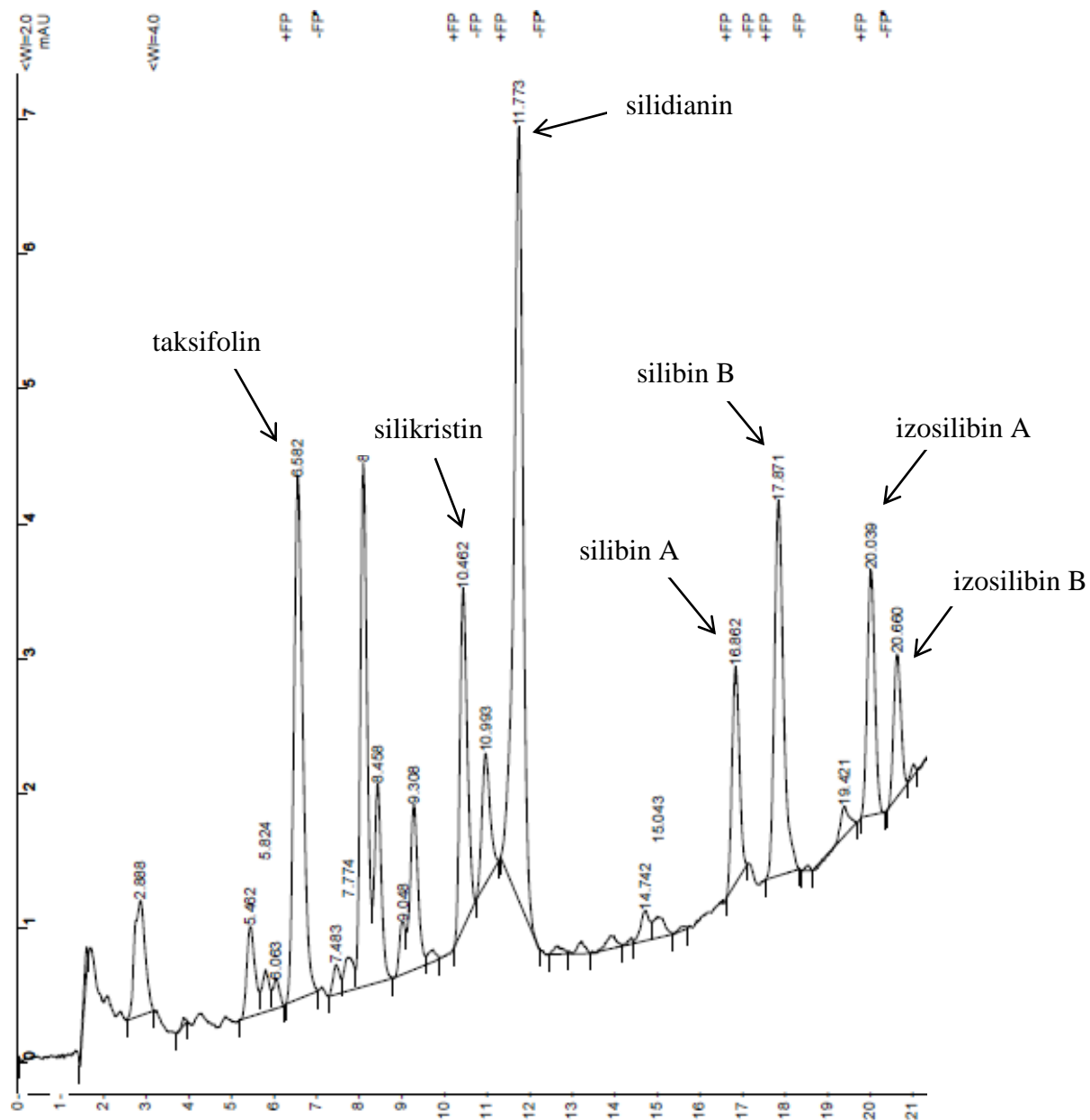
7.9 Kromatogram 1. paralelke DES4 (holin klorid : urea)



7.10 Kromatogram 2. paralelke DES4 (holin klorid : urea)



7.11 Kromatogram 1. paralelke DES5 (holin klorid : 1,2-propandiol)



7.12 Kromatogram 2. paralelke DES5 (holin klorid : 1,2-propandiol)

