



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Diplomsko delo

OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE IN VALIDACIJA ANALIZNE METODE AESCINA IZ EKSTRAKTA DIVJEGA KOSTANJA

avgust, 2020

Mojca Hraš



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Mojca Hraš

Optimizacija ekstrakcije in validacija analizne metode aescina iz ekstrakta divjega kostanja

Diplomsko delo

Maribor, 2020



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Optimizacija ekstrakcije in validacija analizne metode aescina iz ekstrakta divjega kostanja

Diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. Stopnje

| | |
|------------------------------|---|
| Študentka: | Mojca Hraš |
| Študijski program: | univerzitetni študijski program I. stopnje Kemijska tehnologija |
| Predvideni strokovni naslov: | diplomirana inženirka kemijske tehnologije (UN) |
| Mentor: | red. prof. dr. Mojca Škerget, univ. dipl. inž. kem. teh. |
| Zunanji delovni somentor: | dr. Majda Hadolin Kolar, univ. dipl. inž. kem. teh. |

Maribor, 2020



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Datum: 01.04.2020

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

SKLEP O ZAKLJUČNEM DELU

Mojca Hraš, študent-u/-ki univerzitetnega študijskega programa 1. stopnje KEMIJSKA TEHNOLOGIJA, se dovoljuje izdelati zaključno delo.

Mentor/-ica: red. prof. dr. MOJCA ŠKERGET, univ. dipl. inž. kem. tehnol.

Somentor/-ica: dr. MAJDA HADOLIN KOLAR, univ. dipl. inž. kem. tehnol.

Naslov zaključnega dela:

OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE IN VALIDACIJA ANALIZNE METODE AESCINA IZ EKSTRAKTA DIVJEGA KOSTANJA

Naslov zaključnega dela v angleškem jeziku:

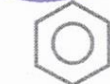
OPTIMIZATION OF EXTRACTION AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD OF AESCIN IN HORSE-CHESTNUT EXTRACT

Rok za izdelavo in oddajo zaključnega dela je 30.09.2020. 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



FAKULTETA ZA KEMIJO IN
KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

DEKAN

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

Kazalo

| | |
|--|------|
| Kazalo..... | 4 |
| Izjava..... | III |
| Zahvala | IV |
| Povzetek..... | V |
| Abstract..... | VI |
| Seznam tabel..... | VII |
| Seznam slik..... | VIII |
| Uporabljeni simboli in kratice | IX |
| 1 Uvod in opredelitev problema..... | 1 |
| 2 Teoretske osnove..... | 3 |
| 2.1 Navadni divji kostanj | 3 |
| 2.2 Uporaba navadnega divjega kostanja v medicini..... | 4 |
| 2.3 Aescin | 5 |
| 3 Metode dela | 7 |
| 3.1 Laboratorijske metode | 7 |
| 3.1.1 Ekstrakcija | 7 |
| 3.1.2 Filtriranje | 9 |
| 3.1.3 Vakuumsko uparjanje | 10 |
| 3.1.4 Vakuumsko sušenje | 10 |
| 3.1.5 Spektrofotometrija | 11 |
| 3.2 Validacija | 12 |
| 3.2.1 Natančnost | 13 |
| 3.2.2 Linearnost | 14 |
| 3.2.3 Selektivnost..... | 15 |
| 3.3 Farmakopeja..... | 15 |
| 4 Eksperimentalni del..... | 16 |
| 4.1 Ekstrakcija..... | 16 |
| 4.1.1 Material in kemikalije..... | 16 |
| 4.1.2 Laboratorijska oprema in inventar..... | 16 |
| 4.1.3 Izvedba ekstrakcij | 17 |
| 4.2 Določevanje vsebnosti aescina v ekstraktih..... | 21 |
| 4.2.1 Material in kemikalije..... | 21 |
| 4.2.2 Laboratorijska oprema in inventar..... | 22 |
| 4.2.3 Določevanje vsebnosti aescina v ekstraktih | 22 |
| 4.3 Validacija metode določanja vsebnosti aescina v ekstraktih | 29 |
| 4.3.1 Natančnost | 29 |
| 4.3.2 Linearnost | 30 |
| 4.3.3 Selektivnost..... | 31 |
| 5 Rezultati in diskusija | 33 |
| 5.1 Ekstrakcija..... | 33 |
| 5.2 Določevanje vsebnosti aescina v ekstraktih..... | 34 |
| 5.3 Validacija | 38 |
| 5.3.1 Natančnost | 39 |
| 5.3.2 Linearnost | 41 |
| 5.3.3 Selektivnost..... | 44 |
| 6 Zaključek..... | 46 |
| 7 Literatura | 47 |

| | | |
|-----|--|----|
| 8 | Priloge..... | 49 |
| 8.1 | Ekstrakcije | 49 |
| 8.2 | Izračuni vsebnosti in količin aescina..... | 51 |
| 8.3 | Odvisnost vsebnosti aescina od spreminjanja parametrov | 53 |
| 8.4 | Odvisnost količine aescina od spreminjanja parametrov | 54 |
| 8.5 | Ponovljivost metode | 56 |
| 8.6 | Vmesna natančnost in obnovljivost..... | 57 |
| 8.7 | Linearnost..... | 58 |
| 9 | Življenjepis | 59 |

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal/a sam/a, prispevki drugih so posebej označeni. Pregledal/a sem literaturo s področja diplomskega dela po naslednjih geslih:

Vir: Science Direct (<https://www.sciencedirect.com/>)

| Gesla: | Število referenc |
|---------------------------------|-------------------------|
| Aescin | 438 |
| Horse chestnut | 3.435 |
| Validation of analytical method | 479.676 |
| Spectrophotometry | 131.215 |
| Extraction solid-liquid | 295.016 |
| Vacuum drying | 680.503 |
| Extraction liquid-liquid | 583.091 |
| Vacuum evaporation | 398.173 |

Vir: DKUM (<https://dk.um.si/info/index.php/slo/>)

| Gesla: | Število referenc |
|---------------|-------------------------|
| ekstrakcija | 147 |
| validacija | 188 |

Vir: COBBIS+

| Gesla: | Število referenc |
|----------------|-------------------------|
| Divji kostanj | 116 |
| Validacija | 1.865 |
| Horse chestnut | 47 |

Skupno število pregledanih člankov: 42

Skupno število pregledanih knjig: 15

Maribor, avgust 2020

Mojca Hraš

Zahvala

Najprej se zahvaljujem svoji mentorici red. prof. dr. Mojci Škerget za nasvete in strokovno pomoč pri izbiri teme in pri pisanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi moji zunanji mentorici dr. Majdi Hadolin Kolar, da je sprejela mentorstvo in mi bila vedno pripravljena svetovati.

Hvala tudi vsem analitičarkam iz analiznega laboratorija v podjetju Vitiva d.d.: Urški Jurič, Romani Žvegla, Vanji Mlinarič, Andreji Heric, Nini Jančič in Alenki Golub, ki so mi omogočile, da sem lahko svoj eksperimentalni del izvajala v njihovem laboratoriju in so mi kljub obilici dela, bile pripravljene vedno pomagati.

Zahvala gre seveda tudi podjetju Vitiva d.d., ki mi je omogočilo izvajanje diplomskega dela v njihovih prostorih.

Predvsem pa bi se rada zahvalila svojim staršem in prijateljem, ki so me vedno spodbujali pri vseh podvigih, mi stali ob stani in verjeli vame.

Hvala!

Optimizacija ekstrakcije in validacija analizne metode aescina iz ekstrakta divjega kostanja

Povzetek

Okoli 19. stoletja je navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum L.*) postal cenjena zdravilna rastlina. Gre za drevo, ki ga zaradi njegovega uspešnega prilagajanja na različne tipe podnebij, najdemo skoraj povsod po svetu. Skozi leta so spoznavali njegove zdravilne učinke in ugotovili, da ima glavne farmakološke lastnosti aescin, mešanica triterpenskih saponinov, ki je prisoten v semenih navadnega divjega kostanja.

Naš namen je bil preučiti pogoje pri katerih izoliramo največ aescina iz semen. Izolacijo smo izvedli z ekstrakcijo oz. natančneje maceracijo. Kot topilo smo uporabili 50 in 60 vol% etanol. Ekstrakcijo smo izvedli pri 40 in 60 °C, čas ekstrakcije pa je bil 2 ali 4 h. Ugotovili smo, da pri višji temperaturi in večjem deležu etanola v topilu, dobimo višjo vsebnost aescina v ekstraktu. Delež aescina v ekstraktu pa se je zmanjševal s časom ekstrakcije.

Vsebnost učinkovine, aescina, v izoliranih ekstraktih smo analizirali z metodo iz francoske farmakopeje, ki temelji na spektrofotometriji. Metode v podjetju Vitiva d.d., kjer smo izvajali eksperimentalni del diplomske naloge, do sedaj še niso validirali. Zato smo izvedli tudi validacijo, kjer smo dokazovali selektivnost, linearnost in ponovljivost, kamor uvrščamo še ponovljivost metode, ponovljivost sistema ter vmesno natančnost in obnovljivost. Metodo smo v sklopu diplomske naloge uspešno validirali.

Ključne besede: divji kostanj, aescin, ekstrakcija, spektrofotometrija, validacija

UDK: 66.061.34(043.2)

Optimization of extraction and validation of analytical method of aescin in horse chestnut extract

Abstract

Around the 19th century, the common horse chestnut (*Aesculus hippocastanum L.*) became a valued medicinal plant. It is a tree that is found almost everywhere in the world due to its successful adaptation to different types of climates. Over the years its healing effects were discovered and found that the main pharmacological effects are generated by aescin, a mixture of triterpene saponins hidden in the seeds of the common horse chestnut.

The aim of this work was to study conditions by which the most aescin is isolated from seeds. Isolation was performed with extraction or more precisely maceration. As a solvent 50 and 60 vol% ethanol was used. Extraction was performed at 40 and 60 ° C while the extraction time was 2 or 4 h. It was found that the higher the temperature and the higher the ethanol content in the solvent is, the higher is the aescin content in the extract. The proportion of aescin in the extract, however, decreased with the extraction time.

The content of the active substance-aescin in the isolated extracts was analyzed by a method from the French Pharmacopoeia that is based on spectrophotometry. The analytical method in the company Vitiva d.d., where we performed the experimental part of the diploma thesis, have not yet been validated. Therefore, we also performed validation, where we proved: selectivity, linearity and repeatability, which also includes repeatability of the method, repeatability of the system and intermediate accuracy and reproducibility. The method was successfully validated in the frame of the diploma thesis.

Key words: horse chestnut, aescin, extraction, spectrophotometry, validation

UDK: 66.061.34(043.2)

Seznam tabel

| | |
|--|----|
| Tabela 4-1. Načrt ekstrakcij..... | 17 |
| Tabela 5-1. Količine dobljenih produktov in izkoristki ekstrakcij za posamezno ekstrakcijo | 34 |
| Tabela 5-2. Vsebnosti aescina in količine dobljenega aescina za posamezne vzorce | 35 |
| Tabela 5-3. Kriteriji za posamezne parametre pri validaciji..... | 38 |
| Tabela 5-4. Meritve in rezultati za ponovljivost sistema..... | 39 |
| Tabela 5-5. Meritve in rezultati za ponovljivost metode..... | 40 |
| Tabela 5-6. Meritve in rezultati za vmesno natančnost in obnovljivost..... | 41 |
| Tabela 5-7. Meritve za linearnost za referenčno raztopino | 42 |
| Tabela 5-8. Meritve za linearnost za vzorec..... | 43 |
| Tabela 8-1. Zatehte kostanjev, mase bučk pred uporabo in po sušenju | 49 |
| Tabela 8-2. Razlike med vsebnostmi aescina v ekstraktih glede na čas ekstrakcije | 53 |
| Tabela 8-3. Razlike med vsebnostmi aescina zaradi volumskega odstotka etanola..... | 53 |
| Tabela 8-4. Razlike med vsebnostmi aescina zaradi temperature | 53 |
| Tabela 8-5. Razlike med količinami dobljenega aescina zaradi časa ekstrakcije..... | 54 |
| Tabela 8-6. Razlike med količinami dobljenega aescina zaradi koncentracije etanola..... | 54 |
| Tabela 8-7. Razlike med količinami dobljenega aescina zaradi temperature..... | 55 |
| Tabela 8-8. Vsebnosti aescina za vmesno natančnost in obnovljivost | 57 |

Seznam slik

| | |
|--|----|
| Slika 2-1. Navadni divji kostanj [5] | 3 |
| Slika 2-2. Plodovi in semena divjega kostanja [7] | 4 |
| Slika 2-3. Molekula β -aescina [11] | 5 |
| Slika 3-1. Vakuumski sušilnik | 11 |
| Slika 3-2. Spektrofotometer PerkinElmer Lambda 25 | 12 |
| Slika 4-1. Mleta semena navadnega divjega kostanja | 18 |
| Slika 4-2. Ekstrakcija iz semen divjega kostanja | 19 |
| Slika 4-3. Vakuumsko uparjanje dobljenega ekstrakta | 20 |
| Slika 4-4. Produkti ekstrakcije po vakuumskem uparjanju in pred vakuumskim sušenjem ... | 20 |
| Slika 4-5. Končni produkti ekstrakcije | 21 |
| Slika 4-6. Priprava vzorcev za določanje vsebnosti aescina : ekstrakcija tekoče-tekoče s pomočjo lij ločnika | 23 |
| Slika 4-7. Priprava vzorcev za določanje vsebnosti aescina : vakuumsko uparjanje v sklopu določevanja vsebnosti aescina v ekstraktih | 24 |
| Slika 4-8. Priprava vzorcev za določanje vsebnosti aescina : kristali, ki so se formirali po vakuumskem uparjanju | 25 |
| Slika 4-9. Priprava vzorcev za določanje vsebnosti aescina : izpiranje vzorca z dietil etrom skozi filter papir | 26 |
| Slika 4-10. Izpiranje filter papirja z očetno kislino | 27 |
| Slika 4-11. Ohlajanje končnih vzorcev pred merjenjem s spektrofotometrom in kivete za enkratno uporabo | 28 |
| Slika 5-1. Vpliv volumskega odstotka etanola na vsebnost aescina v ekstraktih | 36 |
| Slika 5-2. Vpliv temperature na vsebnost aescina v ekstraktih | 36 |
| Slika 5-3. Vpliv časa ekstrakcije na vsebnost aescina v ekstraktih | 37 |
| Slika 5-4. Primerjava izkoristkov ekstrakcij in vsebnosti aescina v ekstraktih | 38 |
| Slika 5-5. Graf absorbance v odvisnosti od masne koncentracije za referenčno raztopino ... | 43 |
| Slika 5-6. Graf absorbance v odvisnosti od masne koncentracije za vzorec | 44 |
| Slika 5-7. Izmerjeni intervali spektrov za slepi vzorec, vzorec in standard | 45 |
| Slika 8-1. Vpliv časa ekstrakcije na količino aescina | 54 |
| Slika 8-2. Vpliv koncentracije etanola na količino aescina | 55 |
| Slika 8-3. Vpliv temperature na količino aescina | 55 |

Uporabljeni simboli in kratice

Simboli

| | |
|--------------------------------------|--|
| $%_{std}$ | čistota standarda aescina, ki je v našem primeru znašala 97,56% |
| $A_{standarda}$ | absorbanca referenčne raztopine (/) |
| A_{vzorca} | absorbanca vzorca (/) |
| $V_{100\% \text{ etanola}}$ | količina 100% etanola, ki jo potrebujemo za pripravo 500mL 50 vol% raztopine (mL) |
| $V_{96,2\% \text{ etanola}}$ | količina 96,2% etanola, ki jo potrebujemo za pripravo 500mL 50 vol% raztopine [mL] |
| $V_{končni}$ | željen končni volumen raztopine, ki je v našem primeru znašal 10 mL |
| $V_{raztopine}$ | volumen raztopine z masno koncentracijo 1 g/L, ki ga potrebujemo za pripravo raztopine določene masne koncentracije (mL) |
| $m_{200\% \text{ v } 50 \text{ mL}}$ | masa zatehtanega vzorca/referenčne raztopine za 200 % raztopino v 50 mL (g) |
| $m_{dobljenega \text{ aescina}}$ | masa dobljenega aescina v vzorcih (g) |
| $m_{po \text{ sušenju}}$ | masa bučke po sušenju (g) |
| $m_{pred \text{ uporabo}}$ | masa prazne bučke pred uporabo (g) |
| $m_{produkta}$ | masa dobljenega produkta ekstrakcije (g) |
| $m_{standarda}$ | masa standarda aescina (g) |
| $m_{zatehte}$ | masa zatehte mletih kostanjevih semen (g) |
| m_{vzorca} | masa vzorca (g) |
| $x_4\% \text{ od RSD}$ | 4 % od večje vrednosti RSD (%) |
| $x_{i,p}$ | povprečje meritev |
| x_i | vrednost določene meritve |
| T | temperatura (°C) |
| t | čas (h) |
| N | število vseh meritev |
| k | naklon premice umeritvene krivulje |
| n | odsek premice umeritvene krivulje na osi y |

Grški simboli

| | |
|---|--|
| $\Delta_{povprečij \text{ RSD}}$ | razlika povprečij RSD vrednosti obeh sklopov meritev (%) |
| γ_{vzorca} | masna koncentracija vzorca (g/L) |
| $\gamma_{200\%}$ | masna koncentracija 200 % raztopine (g/L) |
| $\gamma_{referenčne \text{ raztopine}}$ | masna koncentracija referenčne raztopine (g/L) |

| | |
|--------------------------------|---|
| γ uporabljene raztopine | masna koncentracija raztopine, ki jo uporabljamo za pripravo vzorca druge masne koncentracije in je v našem primeru znašala 1 g/L |
| γ željene raztopine | masna koncentracija raztopine, ki jo želimo pripraviti (g/L) |
| η ekstrakcije | izkoristek ekstrakcije (%) |
| φ etanola | volumski odstotek etanola (vol%) |
| Δ | razlika med vzorcema |
| ω (% aescin) | vsebnost aescina, izražena kot masni delež (%) |

Kratice

| | |
|-------|---|
| EtOH | etanol |
| IR | infrardeča svetloba |
| ISO | internacionalna organizacija za standardizacijo, angl. International Organization for Standardization |
| KŠ | kontrolna številka |
| PhEur | evropska Farmakopeja |
| RSD | relativni standardni odmik |
| SD | standardni odmik |
| SOP | standardni operativni postopek |
| Std | standard |
| UV | ultravijolična svetloba |
| VIS | vidna svetloba |

1 Uvod in opredelitev problema

Navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum L.*) je drevo, ki ga uvrščamo v enorodno družino divjekostanjevk. Gre za mogočno drevo z belimi cvetovi in zelenimi, bodičastimi plodovi, v katerih se skrivajo od 1 do 4 semena [1]. Okoli 19. stoletja je navadni divji kostanj postal tudi cenjena zdravilna rastlina. Uporabljali so njegovo lubje, liste iz katerih so si pripravljali kopeli in čaj, semena pa so zmleli v moko in jo uporabljali za živalsko krmo. Ugotovili so, da čeprav služijo semena kot odlična krma za nekatere živalske vrste, za ljudi niso užitna. Razlog za to je, da semena navadnega divjega kostanja vsebujejo kumarin glikozid imenovan eskulin. Poleg eskulina pa semena vsebujejo tudi aescin, na katerega se bomo osredotočili v tej diplomski nalogi [2].

Aescin je mešanica triterpenskih saponinov, ki nastopa v dveh oblikah: α -aescin in β -aescin. Ločimo ju po topnosti v vodi, α -aescin je v vodi topen, β -aescin pa ne. Skozi leta so znanstveniki preučevali navadni divji kostanj in njegove farmakološke učinke ter ugotovili, da jih generira β -aescin. Njegova najbolj znana uporaba je pri kroničnem venskem popuščanju. Opazili so precejšnjo izboljšanje in zmanjšanje simptomov, kot so: krčne žile, boleče in otekle noge, krči in srbečica, saj aescin širi žile in s tem izboljšuje pretok krvi po žilah. Tako se danes seme navadnega divjega kostanja uporablja predvsem za izdelovanje topikalnih in oralnih zdravil. Zaradi strupenosti semen za ljudi pa se moramo posluževati samo pripravkov, v katerih so semena pravilno obdelana [3].

V tej diplomski nalogi nas je zanimalo, pri kakšnih pogojih ekstrakcije se izloči iz semen navadnega divjega kostanja največ aescina. Predvidevali smo, da izkoristek ekstrakcije ne bo sorazmeren z vsebnostjo aescina. Odločili smo se, da spreminjamo tri ekstrakcijske parametre: temperaturo, čas in volumski odstotek etanola, ki služi kot topilo. Pomagali smo si s protokolom, ki ga ima podjetje Vitiva d.d. za izvajanje takšne ekstrakcije in izbrali podobne vrednosti parametrov.

Najprej smo izvedli ekstrakcijo, ki je bila v tem primeru ekstrakcija trdno-tekoče z dispergirano trdno snovjo, ki jo drugače imenujemo tudi maceracija. Je ena izmed najbolj uporabljenih vrst ekstrakcije. Po končani ekstrakciji, smo morali vzorce tudi vakuumsko filtrirati oziroma nučirati in vakuumsko upariti ter jih sušiti pod vakuumom.

Po pripravi ekstraktov smo morali vzorce analizirati in sicer z metodo iz francoske farmakopeje. Analiziranje vzorcev nam je vzelo kar nekaj časa, saj je metoda kar zahtevna in ima več stopenj. Vzorce smo morali ponovno vakuumsko upariti, jih ločevati z lijem ločnikom, filtrirati, izpirati in jih nazadnje analizirati s spektrofotometrom.

Spektrofotometrija ali molekulska absorpcijska spektrometrija temelji na merjenju absorpcije svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca. Meri namreč absorpcijo svetlobe, ki jo prepuščajo molekule vzorca. Delimo jo na več vrst, odvisno od svetlobe, s katero vzbudimo molekule vzorca. Poznamo UV, VIS in IR spektrofotometrijo. V našem primeru smo uporabljali UV-VIS spektrofotometrijo, ki meri količino ultravijolične ali vidne radiacije, ki se absorbira v vzorcu [4].

Metoda merjenja vsebnosti aescina v podjetju Vitiva d.d. še ni bila validirana, zato smo morali izvesti validacijo metode. Validacija je postopek, s katerim potrdimo, da je metoda zanesljiva. Najprej smo sestavili protokol validacije in določili, katere parametre bomo preverjali. V našem primeru so to bili selektivnost, linearnost in natančnost. Predpostavili smo, da bo metoda določanja vsebnosti aescina uspešno validirana. Pomagali smo si z internim postopkom (SOP), ki določa katere parametre je potrebno preverjati in kakšne so omejitve posameznih parametrov.

Namen diplomske naloge je bila torej optimizacija ekstrakcije aescina iz navadnega divjega kostanja. Želeli smo ugotoviti, pri katerih ekstrakcijskih pogojih dobimo produkt, ki vsebuje največji odstotek in količino aescina, ter kako se ta dva parametra spreminjata v odvisnosti od spreminjanja pogojev ekstrakcije. Kot drugo pa je namen bila validacija metode določanja aescina, ki v podjetju Vitiva d.d. do sedaj ni bila validirana.

2 Teoretske osnove

2.1 Navadni divji kostanj

Enorodna družina divjekostanjevk (*Hippocastanaceae L.*) obsega okoli 20 različnih vrst grmov in dreves. Najpogostejši predstavnik te vrste je navadni divji kostanj (*Aesculus hippocastanum L.*), ki je v angleščini znan pod imenom "horse chestnut". Je zelo razširjen in najdemo ga skoraj povsod po svetu, predvsem zaradi njegove nezahtevnosti in sposobnosti prilagajanja različnim podnebjim. Cveti v aprilu in maju in lahko uspeva tudi do 300 let.

V višino zraste tudi do 30 m. Ima široko razvejano in bogato krošnjo, zaradi česar je zelo priljubljen za sajenje v parkih in ob cestah. Izgled drevesa divjega kostanja, lahko vidimo na sliki 2-1.



Slika 2-1. Navadni divji kostanj [5]

Vsak list je sestavljen iz navzkrižno razporejenih od 5 do 7 podolgovatih lističev z nazobčanimi robovi. Cvetove predstavljajo beli listi z rdečimi ali rumenimi lisami [1]. Plodovi so bodičaste, zelene, okrogle kapsule v katerih se nahajajo običajno od 1 do 4 semena. Semena, velika od 2 do 4 cm, so bleščeča in rjava s svetlo liso. Ko so semena zrela, plodovi počijo, kar se zgodi običajno v septembru ali oktobru [3]. Plodovi, kot tudi semena, so neužitni, za razliko od pravega kostanja (*Castanea sativa*), s katerim ga velikokrat zamenjamo. Pravi kostanj, kljub podobnosti, spada pod družino bukovk in z navadnim divjim kostanjem ni v sorodu [2]. Razlog za neužitnost semen in plodov divjega kostanja je, da vsebujejo kumarin glikozid, natančneje eskulin [6]. Na sliki 2-2 lahko vidimo liste, plodove in semena divjega kostanja.



Slika 2-2. Plodovi in semena divjega kostanja [7]

Skozi zgodovino so se ljudje naučili izkoriščati zdravilne učinke navadnega divjega kostanja in tako je le ta okoli 19. stoletja postal cenjen v medicini. Star rek namreč pravi, da je človek, ki nosi tri kostanje v žepu, obvarovan pred vsemi boleznimi [8].

2.2 Uporaba navadnega divjega kostanja v medicini

Skorjo divjega kostanja so včasih uporabljali za pripravljanje obkladkov, s katerimi so zdravili vročino, sončne opekline in kožne bolezni, saj naj bi izboljšali elastičnost kože, prekrvavitev in imeli pomlajevalni učinek. Pospešili naj bi tudi celjenje ran in razjed, ki so se drugače slabo celile. Iz poparjenih listov so pripravljali napitke, ki so jih uporabljali za blaženje kašlja, predvsem pri astmi in bronhitisu. Verjeli pa so tudi, da čaj iz divjega kostanja pomaga dvigniti odpornost. Pripravljali so si tudi kopeli iz listov divjega kostanja, ki naj bi bile učinkovite v boju proti revmatskim obolenjem, artritisu, ozeblinam in bolečinam. Razširjena pa je bila tudi uporaba kostanjeve moke, ki so jo pripravili iz semen divjega kostanja in naj bi v obliki oblog pomagala pri odprtih ranah, krvnih strdkih in razširjenih venah. [8]

Relativno pozen pričetek uporabe navadnega divjega kostanja, kot cenjenega zdravila je bila posledica že zgoraj omenjene toksičnosti navadnega divjega kostanja za ljudi zaradi eskulina. V preteklosti poročajo o zastrupitvah s pripravki iz navadnega divjega kostanja pri odraslih in celo o smrti pri otrocih. Simptomi zastrupitve z navadnim divjim kostanjem so: mišični krči, izguba koordinacije, šibkost, bruhanje in v najhujših primerih celo paraliza. Zaradi tega je bilo potrebno veliko raziskav, da so ugotovili, kako pripraviti pripravke, ki za ljudi niso strupeni [9].

Čeprav so neobdelana semena divjega kostanja neužitna za ljudi pa služijo za izvrstno hrano nekaterim živalim. To so ugotovili Turki, ki so v 19. stoletju pripravljali moko iz kostanjevih semen, ki je služila za krmo konj. Ravno to dejstvo, naj bi pomagalo izoblikovati poimenovanje hippocastanum: hipos po grško pomeni konj, kastanon pa kostanj. Ravno zaradi tega je v angleščini navadnji divji kostanj znan pod besedno zvezo "horse chestnut". [8]

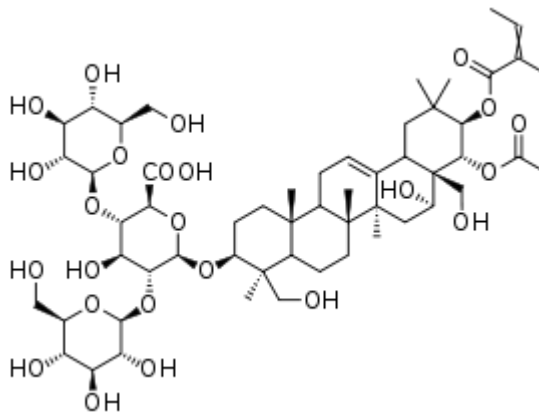
Dandanes se je uporaba navadnega divjega kostanja omejila predvsem na že gotove pripravke, ki se uporabljajo peroralno ali topikalno – tablete, napitke, kreme in mazila in so standardizirani na saponinsko mešanico aescin. Do sedaj so znanstveniki namreč ugotovili, da ravno aescin generira biokemične in farmakološke učinke navadnega divjega kostanja.

2.3 Aescin

Semena divjega kostanja vsebujejo škrob, beljakovine, maščobe, sterole, adenzin, gvanin, vitamine, flavone in dve glavni, kristalinični, aktivni komponenti, ki ju lahko izoliramo : mešanico triterpenskimi saponinov, ki jih s skupnim imenom imenujemo aescin in prosapogenin. Ločimo jih po tem, da je prosapogenin hemolitičen, aescin pa nehemolitičen [3],[8].

Aescin izločimo iz semen s pomočjo ekstrakcije in ga kasneje prečistimo, da je primeren za uživanje. Nastopa v dveh oblikah : α -aescin in β -aescin, vsebuje pa tudi bioflavonoide, antioksidant proantocianidin A2, eskulin in fraksin. β -aescin in α -aescin ločujemo po : temperaturi tališča, rotaciji, hemolitičnemu indeksu in najpogosteje po topnosti v vodi [3]. β -aescin predstavlja namreč v vodi netopno frakcijo, α -aescin pa topno [10]. Pomembnejši je β -aescin, za katerega je predpostavljeno, da je zdravilna učinkovina, oziroma sploh razlog, da ima seme navadnega divjega kostanja zdravilne učinke. Ko ljudje omenjajo aescin, kot spojino, ki generira farmakološke efekte, večinoma mislijo na β -aescin.

Molekulska formula β -aescina se glasi $C_{55}H_{86}O_{24}$, ima molsko maso 1131,3 g/mol in obliko molekule, kot je prikazano na sliki 2-3.



Slika 2-3. Molekula β -aescina [11]

Aescin naj bi deloval protivnetno, zmanjševal otekanje, poškodbe kapilar, krepil naj bi stene ven, lajšal krče, najbolj pa je učinkovit pri ljudeh, ki trpijo za kroničnim venskim popuščanjem. Simptomi bolnikov, ki imajo kronično vensko popuščanje so: krči, občutek težkih in napetih nog, srbečica, boleče in otekle noge ter krčne žile, v bistvu povečane in otečene žile, ki niso samo boleče, ampak so prevsem na nogah zelo vidne in predstavljajo težavo tudi iz estetskega vidika [12]. Pri dolgotrajnem stanju ali sedenju se začne v venah nabirati in stagnirati kri. Aescin naj bi pospešil pretok krvi po žilah in s tem omilil simptome. Pomagal naj bi pri jačanju sten ven, povečal njihov tonus in njihovo elastičnost, karomogoča normalen pretok krvi in preprečuje stagniranje krvi v venah. Običajno se za zdravljenje kroničnega venskega popuščanja in krčnih žil uporabljajo kompresijske nogavice. Kot so

ugotovili pri študiju [13], naj bi bilo zdravljenje s pomočjo aescina učinkovito enako kot uporaba kompresijskih nogavic. Znanstveniki namreč predvidevajo, da aescin uspešno vpliva na zdravljenje kronične venske insuficience, ker znižuje vpliv in nastanek encimov, ki razkrajajo notranje stene žil lasnic [9].

Pripravke iz semen navadnega divjega kostanja uporabljajo tudi pri poškodbah. Aescin namreč s svojim delovanjem zmanjša prepustnost kapilar in posledično preprečuje zatekanje tekočin v bližnja tkiva, ki ga povzročajo poškodbe. Zatekanje tekočin povzroči otečenost na mestu udarca in posledično nastajanje modric. Tako se z uporabo mazil, ki vsebujejo aescin, otečenost hitreje zmanjša in modrica hitreje izgine ali pa sploh ne nastane [14].

Ravno zaradi njegovega nehemolitičnega delovanja, ga lahko uporabljamo oralno in tudi celo intravenozno. Kot že omenjeno zgoraj, se danes uporabljajo predvsem pripravki iz semen divjega kostanja, ki so namenjeni oralni ali topikalni uporabi. Uporaba zavrtilnih učinkovin listov, lubja in vej pa se je močno zmanjšala. Pripravki iz navadnega divjega kostanja so zelo razširjeni predvsem po Evropi. Leta 1996 so bili pripravki iz divjega kostanja v Nemčiji tretji najbolj prodajani pripravki iz določene rastline [15].

Aescin se slabo prebavlja v prebavnem traktu, prebavi se samo okoli 12,5 % zaužitega aescina. Aktivnost pripravka iz aescina je največja okoli 16 ur po zaužitju. Izločamo pa ga preko ledvic in žolčnika [16].

Čeprav so ekstrakti navadnega divjega kostanja varni za uporabo, moramo biti vseeno previdni zaradi toksičnosti neprocesiranih semen. Posluževati se moramo samo pravilno obdelanih ekstraktov in zdravil. Pri prekomerni uporabi pa poročajo o srbečici, glavobolu, slabosti, omotičnosti in gastrointestinalnih motnjah kot stranskih učinkih [8].

3 Metode dela

Uporabili smo različne metode dela.

Zmleta kostanjeva semena smo ekstrahirali z metodo ekstrakcije trdno-tekoče z dispergirano trdno snovjo, ki jo drugače imenujemo tudi maceracija. Vzorec smo nato nučirali oziroma vakuumsko filtrirali, vakuumsko uparili in vakuumsko sušili. Tako smo pripravili osem ekstraktov za nadaljnjo analizo.

V sklopu določanja vsebnosti aescina v ekstraktih smo izvajali ekstrakcijo tekoče-tekoče s pomočjo lija ločnika, gravitacijsko filtracijo, vakuumsko uparjanje in analizno metodo - spektrofotometrijo.

Metodo določanja vsebnosti aescina smo morali tudi validirati, zato smo sestavili načrt validacije in določili parametre, ki smo jih preverjali ter njihove omejitve.

Pogoje za izvajanje prvotne ekstrakcije trdno-tekoče smo določili s pomočjo pogojev, ki jih za ekstrakcijo iz semen navadnega divjega kostanja, določa farmakopeja. Iz le-te izhaja tudi metoda za določanje vsebnosti aescina.

3.1 Laboratorijske metode

Uporabili smo naslednje laboratorijske metode:

- ekstrakcija (ekstrakcija trdno-tekoče z dispergirano trdno snovjo in ekstrakcija tekoče-tekoče z lij ločnikom),
- filtriranje (vakuumska filtracija, gravitacijska filtracija),
- vakuumsko uparjanje,
- vakuumsko sušenje,
- spektrofotometrija.

3.1.1 Ekstrakcija

Postopek, s katerim odstranjujemo topne komponente iz trdnih ali tekočih zmesi s pomočjo topila, se imenuje ekstrakcija. Sestavljena je iz dveh faz: v prvi fazi spravimo zmes v intenziven stik s topilom, v drugi fazi pa le ti fazi ločimo. Ekstrakcija se uporablja za pridobivanje olj, začimb, arom in farmacevtskih substanc iz rastlin in sadežev. Za topilo se uporabljajo lahko hlapna organska topila, kot so propan, butan, aceton, etanol, etilacetat in tudi voda [17].

Poznamo več različnih vrst ekstrakcije. Aescin smo izolirali z ekstrakcijo trdno-tekoče in pri tem uporabili maceracijo. V okviru metode določevanja vsebnosti aescina pa smo uporabili ekstrakcijo tekoče-tekoče s pomočjo lija ločnika.

3.1.1.1 Ekstrakcija z dispergirano trdno snovjo

V našem primeru bomo uporabljali ekstrakcijo z dispergirano trdno snovjo, ki jo drugače imenujemo tudi maceracija in spada med konvencionalne ekstrakcijske metode. Uporablja se za ekstrakcijo eteričnih olj in bioaktivnih komponent iz trdnih snovi. Gre za podvrsto ekstrakcije, kjer trdno snov raztapljamo v topilu s pomočjo neprestanega mešanja z mehanskimi mešali [17]. Mi smo izvajali mešanje s pomočjo magnetnega mešala.

Pred začetkom ekstrakcije, moramo trdno snov pripraviti in jo zamleti, da povečamo površino trdne snovi, kar pospeši prenos snovi. Pred mletjem snov, ki jo želimo ekstrahirati tudi ustrezno pripravimo, tako da odstranimo vso listje, kamenje, korenine in skratka vse materiale, ki niso primerni za ekstrakcijo oziroma jih ne želimo ekstrahirati [18].

Topilo, ki ga uporabljamo, je lahko hladno, lahko pa ga segrevamo. Izbira, ali bomo uporabili hladno ali vročo maceracijo, je odvisna od tega, kako sta trdna snov in bioaktivna komponenta, ki jo ekstrahiramo, obstojni pri višjih temperaturah. Seveda moramo izbrati tudi ustrezno topilo. Topilo izberemo na podlagi sestave snovi, ki jo ekstrahiramo, glede na nadaljnjo uporabo produkta in topnost komponente, ki jo želimo z ekstrakcijo izolirati. V veliki večini za topilo uporabljamo alkohole, saj ti uspejo ekstrahirati večino molekul, ki jih vsebujejo rastline, tudi tiste, ki so hidrofilne ali lipofilne [19].

Po končani ekstrakciji nam ostaneta dve fazi: trdna in tekoča, ki ju moramo ločiti, običajno s sedimentacijo ali filtriranjem. Mi smo uporabili vakuumsko filtriranje.

3.1.1.2 Ekstrakcija tekoče-tekoče z lij ločnikom

Ekstrakcija s pomočjo lija ločnika spada med ekstrakcije tekoče-tekoče. Ločujemo dve tekočini, ki sta različnih polarnosti in tudi gostot in se zato ne mešata. Ravno zaradi tega je potrebno dobro razmisliti, kaj bomo izbrali kot topilo. Ena izmed faz je običajno vodna faza, druga pa lipofilno organsko topilo, kot je na primer eter, diklorometan, kloroform ali etil acetat [20]. Med obema tekočinama se mora namreč tvoriti jasna meja, ki se oblikuje zaradi razlik v polarnosti in gostoti. Obe tekočini vlijemo v lij ločnik in ga stresamo, da se obe fazi med seboj zmešata. Nato se zaradi razlik v polarnosti, gostotah in zaradi gravitacije obe fazi ločita. Tekočina nižje gostote oziroma tista z nižjo specifično težo je zgoraj, tista višje gostote oziroma tista, ki ima višjo specifično težo pa spodaj. Spodnjo fazo nato ločimo od zgornje tako, da jo spustimo skozi ventil lija ločnika.

Tveganje pri delu z lij ločnikom predstavlja tlak, ki se lahko ustvari v notranjosti lija. Tlak nastaja, če med stresanjem lija prihaja do reakcije, ki povzroči nastajanje plinov. Zaradi tega je potrebno sprotno odzračevanje. Lij obrnemo navzdol in preprosto odpremo ventil lija, da iz njega izpustimo pline. Pazimo, da ventil obrnemo v stran od telesa in postopek izvajamo v digestoriju[21].

3.1.2 Filtriranje

Izvajali smo dve različni metodi filtriranja in sicer: vakuumsko filtracijo pri pripravljanju ekstraktov ter gravitacijsko oziroma klasično filtracijo v sklopu metode določevanja aescina v ekstraktih.

3.1.2.1 Vakuumska filtracija

Filtracija je separacijska tehnika, kjer odstranjujemo trdne delce iz tekočine. Pomembno je, da izberemo pravi filtrirni medij, ki ga v laboratoriju predstavlja filtrirni papir.

Vakuumsko filtriranje je ena izmed najbolj uporabljenih filtracijskih metod, ki jo z drugim imenom imenujemo nučiranje. Gre za filtriranje, kjer povzročimo znižanje pritiska v erlenmajerici, kar pospeši hitrost same filtracije. S to vrsto filtracije naj bi dobili tudi čistejši filtrat, kot s katerim drugim načinom filtriranja, trdni delci pa so boljše osušeni. Najprej si moramo pripraviti aparaturo, ki jo sestavljajo : Büchnerjev lij, erlenmajerica za vakuumsko filtriranje z nastavkom za vakuum, gumijast zamašek za erlenmajerico, cev s katero ustvarimo tlak in seveda filtrirni papir, ki mora biti pravilne velikosti, da ga lahko položimo v Büchnerjev lij [22].

Prava velikost filtrirnega papirja je zelo pomembna, saj bi pri uporabi premajhnega papirja, trdni delci lahko prehajali skozi lij. Filtrirni papir moramo pred pričetkom filtracije omočiti in sicer z enakim topilom, ki smo ga uporabljali pri ekstrakciji. To povzroči, da se filtrirni papir bolje oprime Büchnerjevega lija in ne prepušča trdnih delcev.

Pomembna je tudi izbira ustreznega velikega gumijastega zamaška, saj le ta preprečuje, da v erlenmajerico prihaja zrak in tako ustvarimo vakuum [23].

Ko je aparatura pripravljena, je potrebno vklopiti črpalko, ki ustvari podtlak v erlenmajerici. V lij se prenese zmes trdnih delcev in tekočine, ki teče skozi lij in jo zberemo v erlenmajerici. Imenujemo jo filtrat. Odvisno od poizkusa, ki ga izvajamo, potrebujemo včasih filtrat, včasih pa trdne delce, ki ostanejo na filtrirnem papirju.

Filtrat, ki smo ga zbrali v erlenmajerici smo kasneje še vakuumsko uparjali.

3.1.2.2 Gravitacijska filtracija

Gravitacijska ali klasična filtracija predstavlja najbolj uporabljeno vrsto filtracije, predvsem zaradi svoje enostavnosti. Uporabljamo jo, ko želimo ločiti zmes v kateri se nahajata trdna in tekoča faza. Mi smo jo uporabili pri metodi določanja vsebnosti aescina. Filtrirni medij predstavlja filter papir, pravilno zložen v lij. Vanj zlijemo zmes, ki jo želimo filtrirati in gravitacija potem povzroči, da se tekočina giblje navzdol in pronica skozi filterni papir, trdni delci pa ostanejo na filter papirju, saj ne morejo prehajati skozi njegove pore. Trdni delci na filter papirju lahko predstavljajo odpad ali pa snov, ki jo potrebujemo za nadaljno analizo, kar nam določa poizkus, katerega izvajamo [23], [24].

3.1.3 Vakuumsko uparjanje

Proces uparjanja temelji na ločevanju komponent glede na njihovo hlapnost. Nehlapne topljence ločimo od topila, tako da le-tega z uparjanjem odstranimo iz vrele raztopine [17]. Uparjanje katerega bomo uporabili, si izberemo na podlagi lastnosti komponent, ki se nahajajo v vzorcu. Posebna metoda uparjanja je vakuumsko uparjanje. Vakuumsko uparjanje izvajamo z vakuumskim uparjalnikom – rotavaporjem. Ta metoda uparjanja topilo upari veliko hitreje, prav tako pa omogoča uparjanje raztopin, ki niso termično obstojne.

Uparjanje izvedemo tako, da v bučki, v kateri se nahaja vzorec, znižamo tlak in sicer pod parni tlak tekočine in le ta izhlapi pri nižji temperaturi kot običajno. Z drugimi besedami, znižamo vrelišče zmesi in tako potrebujemo manj energije za segrevanje le-te. Na ta način se iz raztopine upari hlapno topilo, nehlapni topljenec pa ostane [25].

Vakuumsko uparjanje ima tudi številne prednosti. Potrebujemo manjšo količino energije, saj vzorca ne rabimo segrevati na visoke temperature, zaradi nizkega tlaka, ki zniža vrelišče raztopin. To pomeni, da ne potrebujemo zelo intenzivnega segrevanja, kar posledično pomeni tudi nižje stroške [26].

3.1.4 Vakuumsko sušenje

Sušenja se poslužujemo, kadar želimo iz vlažnih snovi odstraniti hlapno tekočino.

Vakuumsko sušenje naj bi imelo pred klasičnim sušenjem številne prednosti. Material se hitreje posuši in sušenje se lahko uspešno izvede pri nižji temperaturi, kot pri klasičnem sušenju, kar povzroči tudi manjšo porabo energije. Preprečuje oksidacijo in ohranja barvo, teksturo in okus snovi, ki jih sušimo [27]. Zaradi tega se ga obsežno uporablja predvsem v prehrabeni industriji. Uporablja pa se tudi za pridobivanje farmacevtskih izdelkov, saj učinkovine včasih izgubijo svoj zdravilni učinek, če so izpostavljene visokim temperaturam. Prav tako pa ga uporabljamo tudi za procesiranje plastike in kemikalij, ki začnejo sproščati toksine, pri izpostavljenosti visokim temperaturam. Vakuumsko uparjanje nam torej omogoča, da sušimo pri nižjih temperaturah, zato je primerno tudi za sušenje termično nestabilnih snovi.

Za vakuumsko sušenje uporabljamo vakuumske sušilnike. Vakuumski sušilniki so dobro zaprte komore, v katerih s pomočjo vakuumske črpalke znižamo tlak. To povzroči, da se vrelišče vode zniža [28]. Molekule vode se dvigajo na površje, kjer izhlapijo. To se zaradi znižanega tlaka zgodi veliko hitreje, kot bi se, če bi uporabljali navadni sušilnik, ki deluje samo s pomočjo toplote in ne tudi tlaka [29]. V našem primeru smo uporabljali vakuumski sušilnik, ki je predstavljen na sliki 3-1.



Slika 3-1. Vakuumski sušilnik

3.1.5 Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je metoda kvantitativne analize, ki jo uvrščamo med molekularno absorpcijsko spektrometrijo. Značilnosti spektrofotometričnih metod so enostavnost uporabe, selektivnost in široka možnost uporabe. Sem spadajo vse metode, ki merijo absorpcijo svetlobe, ki prehaja skozi raztopino vzorca. S pomočjo različnih vrst svetlobe vzbudimo molekule vzorca, katerim se spremenijo elektronska stanja. Poznamo različne vrste spektrofotometrije, glede na svetlobo, ki jo uporabljamo: UV, VIS in IR spektrofotometrijo. VIS je območje svetlobe pri valovnih dolžinah od 400 do 700 nm in mu drugače pravimo tudi vidno območje, ter predstavlja edino svetlobo, ki je vidna prostemu očesu. Območje pod vidnim se imenuje ultravijolično – UV območje, območje nad pa infrardečo – IR območje.

V našem primeru smo uporabljali UV-VIS spektrofotometrijo, ki je ena izmed najbolj uporabljenih metod za kvantitativno analizo. Meri količino ultravijolične ali vidne radiacije, ki se absorbira, glede na raztopino vzorca. Za merjenje takšne vrste radiacije uporabljamo UV-VIS spektrofotometre, ki uporabljajo svetlobo v ultravijoličnem območju (od 185 do 400 nm) in vidnem območju (od 400 do 700 nm). Pri pripravljanju vzorca, ki ga nameravamo analizirati z UV-VIS spektrofotometrom, moramo paziti pri izbiri topila. Topilo mora vzorec dobro raztapljati in mora biti transparentno. Če analiziramo vzorce v katerih se nahajajo majhni delčki, je potrebno raztopino predhodno obvezno filtrirati.

Paziti moramo tudi na to, da morajo biti spektrofotometri umerjeni, preden začnemo meriti vzorce. To pomeni, da moramo pripraviti tako imenovani slepi vzorec, ki ga pomerimo kot prvega. Absorbance vzorcev pa so potem prikazane glede na slepi vzorec. Vzorce prenašamo v kivete, ki so lahko take za enkratno ali pa za večkratno uporabo. To so transparentne celice kvadratne oblike, ki jih vstavljamo v spektrofotometer in jih osvetli svetlobni vir. Pazimo, da so kivete vedno čiste, saj bi umazana kiveta povzročila napačne meritve [4], [30].

V našem primeru smo uporabljali spektrofotometer, ki je prikazan na sliki 3-2.



Slika 3-2. Spektrofotometer PerkinElmer Lambda 25

3.2 Validacija

Validacija analizne metode je postopek s katerim ugotavljamo ali je metoda primerna za določeno analitsko aplikacijo ter ovrednotimo značilnosti analizne metode. Naša naloga je dokazati ali metoda izpolnjuje vse zahteve, ki so običajno predhodno določene za posamezno analizno metodo. Vse metode, ki se uporabljajo, bi morale biti validirane, kadar :

- razvijamo ali smo razvili novo analizno metodo,
- metodo prvič uporabljamo v določenem laboratoriju,
- kadar se pogoji ali parametri metode spremenijo, na primer, ko zamenjamo instrument na katerem izvajamo to metodo ali spremenimo pogoje metode [31].

Če želimo, da je validacija uspešna, mora tudi oprema, ki jo uporabljamo za validacijo, ustrezati določenim specifikacijam ter biti umerjena in vzdrževana [32], [33].

Validacija se prične z izbiro metode, ki jo želimo validirati. Naredi se načrt kako bomo metodo validirali, katere parametre bomo ovrednotili in kaj vse bomo preverjali. Običajno je to že predhodno določeno. Po pripravljenem načrtu se napiše protokol za izvedbo validacije. Kasneje se izvedejo vse določene meritve in dobljeni rezultati se obdelajo. Dobljene rezultate nato primerjamo z zahtevami predpisov. Pomembno je, da vse rezultate in meritve beležimo in sproti dokumentiramo [33].

Pri izdelovanju načrta za validacijo metode določanja vsebnosti aescina v ekstraktu divjega kostanja smo upoštevali standardni operativni postopek, ki ga je sestavilo podjetje Vitiva d.d. Standardni operativni postopek, ki ga označujemo običajno s kratico SOP, predstavlja potek in načrt vseh opravil, ki so povezani z opravljanji poskusov. Napišejo ga običajno v vsakem

podjetju posebej in mora biti napisan in sestavljen v skladu z ISO standardi. ISO predstavlja mednarodno organizacijo za standardizacijo.

Validacija sicer obsega večje število parametrov, ki jih moramo preverjati, da dokažemo ustreznost metode. V našem primeru smo validirali metodo iz farmakopeje, ki ne potrebuje celotne validacije, saj so te metode že predhodno validirane. Preverjati smo morali le linearnost, selektivnost in natančnost, ki obsega ponovljivost sistema, ponovljivost metode ter vmesno natančnost in obnovljivost.

3.2.1 Natančnost

Natančnost nam pove, za koliko nihajo rezultati meritev znotraj neke določene skupine meritev. Izraža se z relativnim standardnim odklikom. Meritve izvedemo večkrat ter jih potem primerjamo med seboj. Ni potrebno, da vedno merimo vzorce, temveč lahko merimo referenčne standarde in sicer takrat, ko nam metoda to dovoljuje in če ima vzorec podoben matriks referenčnemu ter oba dajeta približno enake rezultate. S tem si tudi olajšamo delo, saj so vzorci običajno zahtevnejši za pripravo kot pa referenčne raztopine. Pod natančnost spadajo ponovljivost sistema, ponovljivost metode in obnovljivost [31], [32].

Za računanje relativnega standardnega odklika moramo najprej izračunati še povprečje meritev in standardni odklik [33] :

- povprečje meritev

$$x_{i,p} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_i}{N} \quad (3.1)$$

- standardni odklik : je najboljša možna ocena merilne negotovosti posamezne meritve oziroma ocenjuje zanesljivost posamezne določitve, ki jo nekemu vzorcu določamo z dano metodo.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - x_{i,p})^2}{N-1}} \quad (3.2)$$

- relativni standardni odklik

$$RSD = \frac{SD \cdot 100\%}{x_{i,p}} \quad (3.3)$$

kjer je :

N = število vseh meritev

x_i = vrednost določene meritve

$x_{i,p}$ = povprečje meritev.

3.2.1.1 Ponovljivost sistema

Ponovljivost sistema nam pove, kako natančna je naprava s katero izvajamo meritve. V ta namen si pripravimo samo en vzorec, ki ga z napravo pomerimo od 6 do 10 krat in tako primerjamo razlike med rezultati. Meritve izvajamo v istem laboratoriju, pod enakimi pogoji kot jih zapoveduje analizna metoda, izvesti pa jih mora isti analitik. Za meritve, ki nam opredelijo ali je sistem ponovljiv ali ne, ne rabimo pripravljati vzorcev, temveč lahko merimo kar referenčno raztopino [32].

3.2.1.2 Ponovljivost metode

Ponovljivost metode predstavlja natančnost, ki jo dobimo, če vzorec pripravimo večkrat po enaki metodi, v istem laboratoriju, pri enakih pogojih, z enako opremo in reagenti ter če vse meritve izvede isti analitik. Ponovljivost metode mora biti izvedena na vzorcih in ne na referenčni raztopini, saj le tako preverimo ali je celoten postopek pripravljanja vzorcev ponovljiv. Za ponovljivost metode moramo pripraviti najmanj šest vzorcev [32].

3.2.1.3 Vmesna natančnost in obnovljivost

Obnovljivost predstavlja natančnost, ki jo dobimo, če meritve ponovimo spet čez nekaj časa. Meritve izvaja drug analitik v istem laboratoriju, pripravlja pa vzorce po enaki metodi kot njegov predhodnik. Tudi preverjanje obnovljivosti se mora izvajati na vzorcih in ne na referenčni raztopini [32].

3.2.2 Linearnost

Linearnost je definirana kot sposobnost metode, da producira rezultate, ki so proporcionalni koncentraciji analita v raztopini. Z naraščanjem koncentracije, bi naj naraščale tudi meritve, katere v našem primeru predstavlja absorbanca.

Lahko jo dokazujemo neposredno na vzorcih ali pa na referenčni raztopini. Včasih preverjamo kar oboje.

Za preverjanje linearnosti si pripravimo vzorce, ki vsebujejo različne koncentracije analita. Običajno je razpon koncentracij 80-120 % navzgor ali navzdol od pričakovane koncentracije. Potrebno je izvesti meritve za vsaj pet različnih koncentracij. Rezultate predstavimo z umeritveno krivuljo, kjer na x-os nanašamo koncentracije analita, na y-os pa neodvisno spremenljivko oziroma tisto, kar merimo [31]. Enačba umeritvene krivulje je naslednja :

$$y = k \cdot x + n \quad (3.4)$$

kjer je :

k = naklon krivulje

n = odsek krivulje na osi y .

Izračunamo še regresijsko premico po metodi najmanjših kvadratov. Običajno je določeno kolikšna mora biti vrednost korelacijskega koeficienta R . Ravno ta je namreč eden izmed pokazateljev linearnosti. Čim bolj je korelacijski koeficient R blizu ± 1 , tem bolj linearna je premica. Velja tudi, da čim bližje umeritvena krivulja seka koordinatno izhodišče, tem bolj je linearna [32], [33].

3.2.3 Selektivnost

Metoda je selektivna, kadar dokažemo, da na meritve elementa v mešanici ne vpliva nobena komponenta iz te mešanice. V našem primeru smo dokazovali selektivnost spektrofotometrične metode. Potrebno je bilo dokazati, da slepi vzorec ne vpliva na meritev. V primeru, da bi opazili, da spektrofotometer zazna slepi vzorec po umerjanju, je metoda neselektivna, saj reagira tudi na druge elemente iz mešanice, ne samo na željenega.

Pomembno je bilo tudi dokazati, da sta krivulji referenčne raztopine in vzorca približno enaki, ter da je njun vrh najvišji pri približno enaki valovni dolžini [32], [33].

3.3 Farmakopeja

Farmakopeja je knjiga, v kateri so zbrani razni farmacevtski predpisi, kako je potrebno analizirati, pripravljati, preiskovati, hraniti in označevati zdravila ali farmacevtske substance, ki jih uporabijo za pripravo končnega izdelka. Farmakopeja vsebuje več tisoč monografij. Naloga farmakopeje je, da zagotovi varnost, kakovost in učinkovitost zdravil, ki se izdelujejo [35].

V Sloveniji je leta 1997 začelo veljati, da je potrebno vsa zdravila, ki so na voljo v Sloveniji, izdelati po metodah in zahtevah, ki jih določa evropska Farmakopeja. Evropska Farmakopeja na splošno velja po celotni Evropi, posamezne države pa imajo še svoje Farmakopeje, ki jih uporabljajo poleg evropske. Če evropska Farmakopeja ne vsebuje monografije, ki narekuje izdelavo določenega zdravila, se lahko uporabi Farmakopejo, ki jo je ustvarila in uporablja katera druga država [36].

V našem primeru smo se zgledovali po francoski Farmakopeji, ki vsebuje navodilo za ekstrakcijo aescina iz semen divjega kostanja in navodilo za določanje aescina v teh ekstraktih [37].

4 Eksperimentalni del

V sklopu eksperimentalnega dela smo najprej izvedli ekstrakcijo in nato pridobljenim ekstraktom določili vsebnost aescina s spektrofotometrijo. Na koncu pa smo izvedli še validacijo metode, s katero smo določali vsebnost aescina. Celotni eksperimentalni del smo izvajali v podjetju Vitiva d.d., natančneje v analiznem laboratoriju.

4.1 Ekstrakcija

Eksperimentalni del smo pričeli z ekstrakcijo, ki smo jo izvajali v razvojnem laboratoriju podjetja Vitiva d.d.

4.1.1 Material in kemikalije

- semena navadnega divjega kostanja, PhEur, Amoros Nature, KŠ : 100906012,
- etanol, PhEur, 96,2 %, Hungrana Kft., KŠ : 100610044.

4.1.2 Laboratorijska oprema in inventar

- aluminijasta folija,
- analitska tehtnica (Sartorius CPA224S, max 220g),
- Büchnerjev lij (keramičen, Isolab)
- bučke za rotavapor z okroglim dnom (500 mL, Schott Duran),
- cev, priklopljena na vodno črpalko,
- čaše (400 mL, Schott Duran),
- erlenmajerica za vakuumsko filtriranje (1 L, Isolab),
- filter papir (Sartorius, premer : 125 mm),
- gumijast nastavek za Büchnerjev lij,
- magnetna palica,
- magnetne grelne plošče z vgrajenim termometrom in uro,
- magnetni mešalčki,
- merilni valji (250 mL, 500 mL, Isolab Duran),
- plastični pokrovi za vialo,
- plutovinasti podstavki za bučke z okroglim dnom,
- steklena palčka,
- vakuumski sušilnik (Memmert, VO29),
- vakuumski uparjalnik (Büchi rotavapor R-124),
- vialo (30 mL),
- žličke in spatule.

4.1.3 Izvedba ekstrakcij

Pred začetkom izvajanja ekstrakcij smo naredili načrt, katere parametre bomo spreminjali in kako. Zaradi zapletenosti določevanja vsebnosti aescina v ekstraktih, smo se odločili, da naredimo samo osem različnih ekstrakcij. Pri določevanju samih pogojev ekstrakcije, smo si pomagali s proizvodnjim postopkom, ki ga v podjetju Vitiva d.d. uporabljajo za ekstrakcijo divjega kostanja in ga določa francoska farmakopeja.

Odločili smo se, da spreminjamo:

- temperaturo,
- volumski odstotek etanola in
- čas ekstrakcije.

V podjetju Vitiva d.d. ekstrakcijo izvajajo pri 50 °C, 2-4 ure in z 50 vol% etanolom. Izbrali smo si torej podobne vrednosti, pri katerih smo izvajali ekstrakcijo. Za temperaturo smo izbrali 40 °C in 60 °C, za volumski odstotek etanola 50 vol% in 60 vol% ter za čas ekstrakcije 2 h in 4 h. Skupaj smo izvedli torej osem ekstrakcij pri različnih pogojih, ki so predstavljeni v tabeli 4-1.

Tabela 4-1. Načrt ekstrakcij

| ŠTEVILKA EKSTRAKCIJE | T [°C] | $\varphi_{etanola}$ [vol%] | t [h] |
|-------------------------|--------|----------------------------|-------|
| 1 | 40 | 50 | 2 |
| 2 | 40 | 50 | 4 |
| 3 | 60 | 50 | 2 |
| 4 | 60 | 50 | 4 |
| 5 | 40 | 60 | 4 |
| 6 | 60 | 60 | 4 |
| 7 | 40 | 60 | 2 |
| 8 | 60 | 60 | 2 |

Najprej smo pripravili po 500 mL 50 vol% in 60 vol% etanola, za kar smo uporabili 96,2 % etanol.

Izračun količine etanola, ki jo potrebujemo za pripravo 500 mL 50 vol% raztopine etanola :

$$V_{100\% \text{ etanola}} = \frac{50\% \cdot 500 \text{ mL}}{100\%} = 250 \text{ mL} \quad (4.1)$$

kjer je :

$V_{100\% \text{ etanola}}$ = količina 100% etanola, ki jo potrebujemo za pripravo 500mL 50 vol% raztopine[mL]

$$V_{96,2 \% \text{ etanola}} = \frac{250 \text{ mL}}{0,962} = 259,9 \text{ mL} = 260 \quad (4.2)$$

kjer je :

$V_{96,2 \% \text{ etanola}}$ = količina 96,2% etanola, ki jo potrebujemo za pripravo 500mL 50 vol% raztopine [mL]

Pri pripravljanju 500 mL 50 vol% etanola smo torej zmešali 260 mL 96,2 % etanola in 240 mL destilirane vode.

Izračun za pripravo 500 mL 60 vol% etanola :

$$V_{100 \% \text{ etanola}} = \frac{60 \% \cdot 500 \text{ mL}}{100 \%} = 300 \text{ mL} \quad (4.3)$$

$$V_{96,2 \% \text{ etanola}} = \frac{300 \text{ mL}}{0,962} = 311,9 \text{ mL} = 312 \text{ mL} \quad (4.4)$$

Za 500 mL 60 vol% etanola smo zmešali 312 mL etanola in 188 mL destilirane vode.

V 400 mL čaše smo natehtali po 20 g mletih semen navadnega divjega kostanja, ki so prikazana na sliki 4-1.



Slika 4-1. Mleta semena navadnega divjega kostanja

Naenkrat smo izvajali ekstrakcijo štirih vzorcev. Vsem štirim prvim vzorcem smo dodali po 120 mL 50 vol% etanola s pomočjo merilnega valja in vsakemu po en mešalček. Količino etanola, ki smo ga dodali, smo določili na podlagi dejstva, da mora biti razmerje med kostanji in topilom 1:6. Čaše smo pristavili na magnetne grelne plošče in nastavili mešanje, temperaturo in čas. Čaše smo pokrili z aluminijevo folijo, da nam etanol ni hlapel. Na sliki 4-2 lahko vidimo mešanje in segrevanje vzorca na magnetnih grelnih ploščah.



Slika 4-2. Ekstrakcija iz semen divjega kostanja

Ko je pretekel potreben čas ekstrakcije, smo pripravili Büchnerjev lij in predhodno izrezan filter papir. Nučirali smo v veliko erlenmajerico za vakuumsko filtriranje, saj se produkti iz divjega kostanja radi penijo. Erlenmajerico smo priklopili na vakuum in v Büchnerjev lij zlili vsebino čaše iz katere smo predhodno odstranili mešalček. Filtracija je bila končana, ko nismo več opazili pretoka filtrata.

Po končanem nučiranju smo vsebino iz erlenmajerice za vakuumsko filtriranje prelili v bučko za rotavapor in pričeli z uparjanjem do suhega. Ves čas smo nadzorovali in uravnavali tlak, da se raztopina ni preveč penila. Uparjali smo pri maksimalno 60 °C in z rotavaporjem Büchi R-124, ki ga lahko vidimo na spodnji sliki. Z uparjanjem smo končali, ko je v bučki ostala le še gosta, tekoča, rjava pasta. Vakuumsko uparjanje vzorca je prikazano na sliki 4-3.



Slika 4-3. Vakuumsko uparjanje dobljenega ekstrakta

Postopek smo nato ponovili še za štiri druge vzorce, ki smo jih pripravili tokrat z 60 vol% etanolom. Produkti po končanem uparjanju so prikazani na sliki 4-4.



Slika 4-4. Produkti ekstrakcije po vakuumskem uparjanju in pred vakuumskim sušenjem

Po končanem uparjanju smo vzorce sušili še v vakuumskem sušilniku in sicer smo jih pustili, da se sušijo čez noč na 50 °C in tlaku 50 mbar. Naslednji dan pa smo iz vsake posamezne bučke s pomočjo spatul in žličk v vialo postrgali produkt, ki se je nabral na stenah bučk. Na sliki 4-5 so prikazani produkti, po končani ekstrakciji.



Slika 4-5. Končni produkti ekstrakcije

Vse bučke za rotavapor smo stehali pred uporabo in po zaključku sušenja. Tako smo lahko izračunali količino produkta in izkoristek ekstrakcije.

4.2 Določevanje vsebnosti aescina v ekstraktih

Vsebnost aescina smo določali v osmih produktih, ki smo jih dobili z ekstrakcijo.

4.2.1 Material in kemikalije

- Osem ekstraktov iz semen navadnega divjega kostanja,
- kloroform ($\geq 99,5\%$, Honeywell),
- 1-propanol (99,5 %, Acros Organics),
- 0,1 M klorovodikova kislina koncentrat (Fixanal, Honeywell),
- dietil eter (Merck),
- očetna kislina (J.T. Baker),
- železov (III) klorid heksahidrat (98-102 %, Honeywell),
- žveplova kislina (96 %, Carlo Erba),
- aescin standard (97,56 %, Extrasynthese, šarža : 12)

4.2.2 Laboratorijska oprema in inventar

- analitska tehtnica (Mettler Toledo XPE206DR, max 81/220 g),
- analitska tehtnica (Sartorius CPA224S, max 220 g),
- avtomatska pipeta (Brand accu-jet pro),
- bučke (50 mL, 100 mL : Witeg Duran),
- bučke za rotavapor z okroglim dnom (250 mL : Schott Duran),
- epruvete (12x100 mm, Isolab),
- erlenmajerice z obrusom (250 mL, Schott Duran),
- filtrirni papir (Sartorius, premer : 125 mm),
- kivete za enkratno uporabo (Brand, 2,5 mL makro, 12,5x12,5x45 mm),
- lij ločnik (500 mL, Isolab)
- lijak (Isolab),
- merilni valji (50 mL : Isolab, 100 mL : Witeg),
- plastični zamaški za erlenmajerice,
- steklene pipete (5 mL : Witeg, 1 mL : Isolab),
- stojalo za epruvete,
- ultrazvočna kopel (Haver & Boecker, Haver USC 200 MULTI),
- UV-VIS spektrofotometer (PerkinElmer Lambda 25),
- vakuumski uparjalnik (Büchi rotavapor R-200),
- viala (60 mL),
- vodna kopel (Elma, Elmasonic S 60 H),
- zamaški za epruvete,
- zamaški za lij ločnik.

4.2.3 Določevanje vsebnosti aescina v ekstraktih

Uporabljali smo metodo določevanja vsebnosti aescina v ekstraktih divjega kostanja, ki jo predpisuje francoska farmakopeja [37].

Pred začetkom priprave vzorca, referenčne raztopine in slepega vzorca smo morali pripraviti naslednje raztopine :

- **Raztopina železovega klorida in očetne kisline**

Piprava :

V 100 mL bučko smo natehtali 75 mg železovega (III) klorida heksahidrata. S pomočjo merilnega valja smo dolili 50 mL očetne kisline in dali bučko na ultrazvočno kopel, da se je železov klorid raztopil. Po tem smo dodali še 50 mL žveplove kisline in vse skupaj dobro pretresli, da so mehurčki izginili. Ta raztopina je morala stati 2 uri, preden smo jo lahko uporabili.

- **Mešanica 1-propanola in kloroforma**

Priprava :

Pripravili smo 1,4 L raztopine 1-propanola in kloroforma v razmerju 20:50, kar pomeni, da smo zmešali 400 mL 1-propanola in 1000 mL kloroforma.

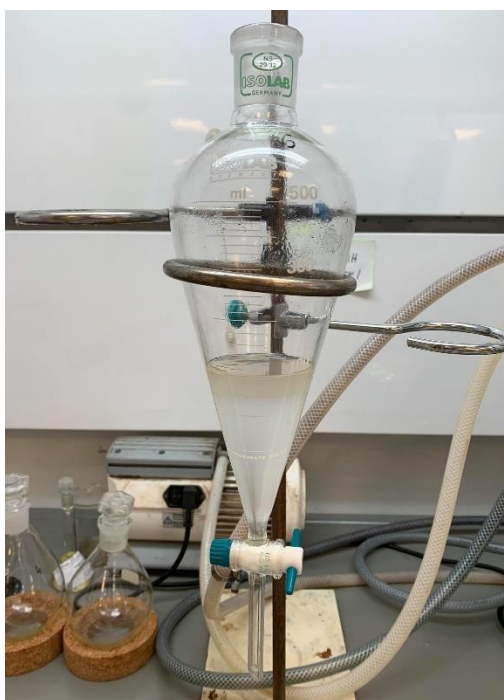
- **0,1 M klorovodikova kislina**

Priprava :

0,1 M klorovodikovo kislino smo pripravili s pomočjo izdelka : 0,1 M Hydrochloric acid FIXANAL, proizvajalca Honeywell. Vsebino iz tube smo iztisnili v 1 L bučko in dopolnili z destilirano vodo do oznake.

Priprava vzorcev :

Pripravili smo 250 mL erlenmajerico v katero smo zatehtali 0,100 g ekstrakta. S pomočjo merilnega valja smo v erlenmajerico dodali 30 mL 0,1 M klorovodikove kisline. Erlenmajerico z vzorcem smo pustili na ultrazvočni kopeli okoli 5 minut, da se je ekstrakt raztopil. Vse skupaj smo nato prenesli v lij ločnik. Vsebini lij ločnika smo dodali 70 mL prej pripravljene mešanice 1-propanola in kloroforma in začeli močno stresati lij ločnik za 2 minuti. Pazili smo, da redno odzračujemo. Nato smo lij ločnik z vsebino pustili 15 minut, da sta se fazi ločili. Na sliki 4-6 lahko vidimo dve fazi, ki sta se oblikovali po stresanju lija ločnika.



Slika 4-6. Priprava vzorcev za določanje vsebnosti aescina : ekstrakcija tekoče-tekoče s pomočjo lij ločnika

Po 15 minutah smo v okroglo bučko za rotavapor zbrali spodnjo, kloroformsko fazo in jo uparili do suhega na rotavaporju pri 60 °C. Ta postopek smo ponovili 3-krat. Uporabljali smo 250 mL bučke za rotavapor, saj smo kasneje njihovo vsebino morali izpirati z etrom, ker pa ta

hlapi, je bilo veliko lažje izpirati manjše bučke, kot večje. Vakuumsko uparjanje, ki smo ga izvajali, je prikazano na sliki 4-7.



Slika 4-7. Priprava vzorcev za določanje vsebnosti aescina : vakuumsko uparjanje v sklopu določevanja vsebnosti aescina v ekstraktih

P končanem uparjanju, smo počakali, da se je bučka z vsebino ohladila do sobne temperature pri čemer bučke nismo zamašili z zamaškom, dokler se ni ohladila. V nasprotnem primeru bi lahko v bučki prišlo do kondenzacije in navlažitve vzorca. Opaziti smo morali svetlo rjave kristale, ki so se formirali med uparjanjem in jih lahko vidimo na sliki 4-8.



Slika 4-8. Priprava vzorcev za določanje vsebnosti aescina : kristali, ki so se formirali po vakuumskem uparjanju

Bučko smo nato po 3-krat sprali z 10 mL dietil etra in suspenzijo prefiltrirali skozi filter papir, ki smo ga zložili v lij. Pazili smo, da smo bučko res dobro sprali, kar je bilo težko, saj je eter zelo hitro hlapel. Raztopino smo zbrali v 60 mL vialo. Na filter papirju so bili vidni svetlo rjavi kristali, v viali pa smo zbirali eter, ki smo ga po koncu spiranja zavrgli. Filtriranje je prikazano na sliki 4-9.



Slika 4-9. Priprava vzorcev za določanje vsebnosti aescina : izpiranje vzorca z dietil etrom skozi filter papir

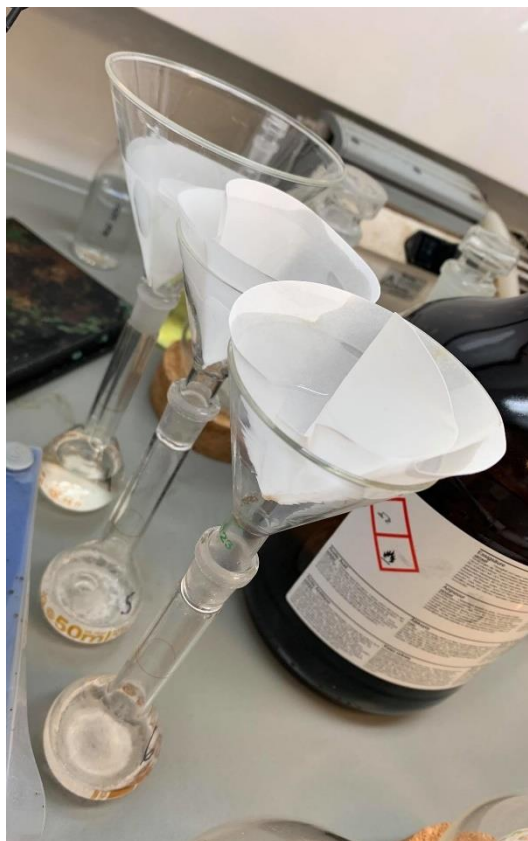
Lij s filter papirjem, na katerem smo zbrali vzorec, smo nato prestavili na 50 mL bučko. Ostanek na filter papirju smo raztopili z 50 mL očetne kisline. Izračunali smo masno koncentracijo dobljenega vzorca :

$$\gamma_{\text{vzorca}} = \frac{0,1 \text{ g} \cdot 1 \text{ L}}{0,05 \text{ L}} = 2 \text{ g/L}$$

kjer je :

γ_{vzorca} = masna koncentracija vzorca [g/L]

To raztopino smo poimenovali 100 % raztopina vzorca. Izpiranje z očetno kislino je prikazano na sliki 4-10.



Slika 4-10. Izpiranje filter papirja z očetno kislino

Odpipetirali smo po 1 mL pripravljene raztopine v male epruvetke in vsaki dodali po 4 mL vnaprej pripravljene raztopine železovega klorida in očetne kisline.

Priprava referenčne raztopine :

V 50 mL bučko smo natehtali 0,025 g standarda aescina, mu dodali nekaj očetne kisline in ga raztopili. Ko se je aescin raztopil, smo bučko dopolnili do oznake z istim topilom.

Izračunali smo masno koncentracijo dobljenega vzorca :

$$\gamma_{\text{referenčne raztopine}} = \frac{0,025 \text{ g} \cdot 1 \text{ L}}{0,05 \text{ L}} = 0,5 \text{ g/L}$$

kjer je :

$\gamma_{\text{referenčne raztopine}}$ = masna koncentracija referenčne raztopine [g/L]

To raztopino smo poimenovali 100 % raztopine referenčne raztopine.

1 mL te raztopine smo odpipetirali v malo epruvetko in dodali 4 mL raztopine železovega klorida in očetne kisline.

Priprava slepega vzorca :

V malo epruvetko smo odpipetirali 1 mL očetne kisline in dodali 4 mL raztopine železovega klorida in očetne kisline.

Tako smo imeli pripravljene vse vzorce, slepi vzorec in referenčno raztopino. Raztopine v epruvetkah so bile rumene barve. Epruvetke smo zaprli z zamaški in jih označili. Vse skupaj smo nato segrevali na vodni kopeli 25 minut pri 60 °C. Barva se je vsem vzorcem, razen slepemu, spremenila v rožnato barvo. Glede na intenzivnost barve smo lahko že predhodno sklepali, kateri vzorec je vseboval največ aescina. Po končanem segrevanju smo vzorce ohladili v časi z vodo, kot je prikazano na sliki 4-11 in nadaljevali z merjenjem na spektrofotometru.



Slika 4-11. Ohlajanje končnih vzorcev pred merjenjem s spektrofotometrom in kivete za enkratno uporabo

Na računalniku smo najprej zagnali program PerkinElmer Lambda 25 in izbrali merjenje pri valovni dolžini 540 nm. Najprej smo morali izmeriti slepi vzorec, nato pa smo nadaljevali z merjenjem vzorcev in na koncu smo izmerili še referenčno raztopino. Uporabljali smo kivete za enkratno uporabo. Pazili smo tudi pri prelivanju raztopin v kiveto, saj je raztopina železovega klorida in očetne kisline bila viskoznejša in se ni dala lepo obrisati iz kivete. Vzorcev pred merjenji tudi nismo mešali, saj so se takrat začeli tvoriti mehurčki, ki so lahko vplivali na absorbanco.

Med izvajanjem poizkusov smo ves čas pazili, da je bila steklovina dobro očiščena, saj je aescin mešanica saponinov, prav tako pa najdemo saponine v čistilih, ki smo jih uporabljali za čiščenje steklovine. Zato smo morali paziti, da je bilo čisto dobro izprano iz steklovine, saj bi drugače lahko imelo vpliv na končne rezultate.

4.3 Validacija metode določanja vsebnosti aescina v ekstraktih

Pri validaciji je bilo potrebno dokazati : linearnost, selektivnost in natančnost. Šarža na kateri smo delali validacijo je bila 302305-20-01.

4.3.1 Natančnost

Natančnost zajema : ponovljivost sistema, ponovljivost metode ter vmesno natančnost in obnovljivost.

4.3.1.1 Ponovljivost sistema

Potrebno je bilo dokazati, da je naprava, ki koncentracijo v vzorcih natančna in da se rezultati med seboj ne razlikujejo preveč. V našem primeru je to napravo predstavljal spektrofotometer PerkinElmer Lambda 25, ki je pomeril absorbanco vzorcev, s pomočjo katere smo potem izračunali vsebnost aescina.

V tem primeru sme merili kar referenčno raztopino in ne vzorca. To smo lahko naredili zato, ker nas ni zanimala vsebnost aescina, temveč le ponovljivost in natančnost spektrofotometra. Referenčno raztopino smo pripravili na enak način kot je bilo opisano v poglavju 4.2.3. Pripravili smo tudi slepi vzorec, saj brez njega nismo mogli meriti absorbance.

Enak vzorec smo nato pomerili 6-krat na UV-VIS spektrofotometru PerkinElmer Lambda 25 ter izračunali povprečje vseh šestih izmerjenih absorbanc in RSD, ki ni smel presegati 5 %.

4.3.1.2 Ponovljivost metode

Potrebno je bilo določiti, kako ponovljiva je metoda ter ali dobimo približno enake vsebnosti, če enak vzorec pripravimo večkrat pod istimi pogoji. Isti pogoji pomenijo : ista metoda, isti reagenti, isti eksperimentator, isti laboratorij in kratek čas med posameznimi meritvami.

V tem primeru smo pripravili šest vzorcev iz istega ekstrakta, referenčno raztopino in slepi vzorec na enak način kot je bilo opisano v poglavju 4.2.3. Vsak vzorec smo pomerili 1-krat, nato pa smo pomerili tudi referenčno raztopino s pomočjo katere smo lahko preračunali vsebnosti aescina. Izračunali smo povprečje vsebnosti aescina vseh šestih vzorcev in RSD, ki tudi sedaj ni smel presegati 5 %.

4.3.1.3 Vmesna natančnost in obnovljivost

Potrebno je bilo dokazati, da je metoda obnovljiva. Za prve rezultate smo vzeli tiste, ki smo jih dobili pri prejšnjem poglavju 4.3.1.2. Druge rezultate pa smo dobili tako, da smo čez nekaj dni poizkus ponovili in na enak način kot pri ponovljivosti metode pripravili vzorce in jih pomerili. Tako smo dobili dva sklopa meritev. Pomembno je bilo dokazati, da se razlika povprečji, ki smo jih izračunali za prvi in drugi sklop, ni razlikovala za več kot 4 % od največje vrednosti in da je RSD za prvi in drugi dan manjši kot 5 %.

4.3.2 Linearnost

Linearnost metode smo dokazovali za referenčno raztopino in za vzorec. Najprej smo se lotili referenčne raztopine. Pripravili smo raztopino z enkrat večjo masno koncentracijo, kot jo je imel vzorec, ki smo ga poimenovali 100 % referenčna raztopina. Tako smo dobili raztopino, ki smo jo poimenovali 200 % referenčna raztopina.

Upoštevali smo, da 100 % raztopino predstavlja vzorec z masno koncentracijo 0,5 g/L, pripravljen enako, kot vzorec v poglavju 4.2.3.

Tako je 200 % raztopino predstavljal vzorec z masno koncentracijo 1 g/L. Pripravili smo 50 mL vzorca, zato smo potrebovali za željeno masno koncentracijo zatehtati 50 mg standarda aescina namesto 25 mg. Iz vzorca z masno koncentracijo 1 g/L, ki je predstavljal 200 % raztopino vzorca, smo pripravili vzorce z naslednjimi masnimi koncentracijami :

- $\gamma_{\text{referenčne raztopine}} = 0,125 \text{ g/L}$, ki je predstavljala 25 % raztopino vzorca,
- $\gamma_{\text{referenčne raztopine}} = 0,25 \text{ g/L}$, ki je predstavljala 50 % raztopino vzorca,
- $\gamma_{\text{referenčne raztopine}} = 0,5 \text{ g/L}$, ki je predstavljala 100 % raztopino vzorca in
- $\gamma_{\text{referenčne raztopine}} = 0,75 \text{ g/L}$, ki je predstavljala 150 % raztopino vzorca.

kjer je :

$\gamma_{\text{referenčne raztopine}}$ = masna koncentracija referenčne raztopine [g/L]

Najprej smo izračunali, koliko raztopine z masno koncentracijo 1 g/L, ki je predstavljala 200 % raztopino vzorca, potrebujemo za pripravo vzorca določene masne koncentracije. Pripravljali smo raztopine po 10 mL. Primer izračuna za raztopino, z masno koncentracijo 0,75 g/L, ki smo jo imenovali tudi 150 % referenčna raztopina :

$$V_{\text{raztopine}} = \frac{V_{\text{končni}} \cdot \gamma_{\text{željene raztopine}}}{\gamma_{\text{uporabljene raztopine}}} \quad (4.5)$$

$$V_{\text{raztopine}} = \frac{10 \text{ mL} \cdot 0,75 \text{ g/L}}{1 \text{ g/L}} = 7,5 \text{ mL} \quad (4.6)$$

kjer je :

$V_{\text{raztopine}}$ = volumen raztopine z masno koncentracijo 1 g/L, ki ga potrebujemo za pripravo raztopine določene masne koncentracije [mL]

$V_{\text{končni}}$ = željen končni volumen raztopine, ki je v našem primeru znašal 10 mL

$\gamma_{\text{željene raztopine}}$ = masna koncentracija raztopine, ki jo želimo pripraviti [g/L]

$\gamma_{\text{uporabljene raztopine}}$ = masna koncentracija raztopine, ki jo uporabljamo za pripravo vzorca druge masne koncentracije in je v našem primeru znašala 1 g/L

Tako smo si pripravili naslednje raztopine :

- Za raztopino z masno koncentracijo 0,75 g/L smo odpipetirali 7,5 mL referenčne raztopine z masno koncentracijo 1 g/L in jo redčili z očetno kislino do 10 mL.
- Za raztopino z masno koncentracijo 0,50 g/L smo odpipetirali 5,0 mL referenčne raztopine z masno koncentracijo 1 g/L in jo redčili z očetno kislino do 10 mL.

- Za raztopino z masno koncentracijo 0,25 g/L smo odpipetirali 2,5 mL referenčne raztopine z masno koncentracijo 1 g/L in jo redčili z očetno kislino do 10 mL.
- Za raztopino z masno koncentracijo 0,125 g/L smo odpipetirali 1,25 mL referenčne raztopine z masno koncentracijo 1 g/L in jo redčili z očetno kislino do 10 mL.

Pripravili smo tudi slepi vzorec, saj smo z njim umerili spektrofotometer. Vsem vzorcem smo nato izmerili absorbanco in narisali umeritveno krivuljo.

Linearnost smo nato preverjali še za vzorec. Pripravili smo raztopino z masno koncentracijo 2 g/L, ki smo jo poimenovali 100 % raztopina vzorca. Nato smo pripravili raztopino z enkrat večjo masno koncentracijo in sicer tako, da smo namesto 0,1 g ekstrakta zatehtali 0,2 g ekstrakta in ga pripravili na enak način kot je predstavljeno v poglavju 4.2.3. Ko smo končali s spiranjem filter papirja z očetno kislino in smo dobili 50 mL raztopino, ki je imela masno koncentracijo 4 g/L. Le to smo nato uporabili za nadaljno redčenje na druge masne koncentracije. Ponovno smo si pripravljali po 10 mL raztopin različnih masnih koncentracij. Tako smo si pripravili naslednje raztopine :

- Za pripravo raztopine z masno koncentracijo 3 g/L, ki smo jo poimenovali 150 % raztopina vzorca, smo odpipetirali 7,5 mL raztopine z masno koncentracijo 4 g/L in jo dopolnili do 10 mL z očetno kislino.
- Za pripravo raztopine z masno koncentracijo 2 g/L, ki smo jo poimenovali 100 % raztopina vzorca, smo odpipetirali 5,0 mL raztopine z masno koncentracijo 4 g/L in jo dopolnili do 10 mL z očetno kislino.
- Za 50 % raztopino smo odpipetirali 2,5 mL 200 % vzorca in jo redčili z očetno kislino do 10 mL.
- Za pripravo raztopine z masno koncentracijo 1 g/L, ki smo jo poimenovali 50 % raztopina vzorca, smo odpipetirali 2,5 mL raztopine z masno koncentracijo 4 g/L in jo dopolnili do 10 mL z očetno kislino.
- Za pripravo raztopine z masno koncentracijo 0,5 g/L, ki smo jo poimenovali 25 % raztopina vzorca, smo odpipetirali 1,25 mL raztopine z masno koncentracijo 4 g/L in jo dopolnili do 10 mL z očetno kislino.

Narisali smo graf absorbanco v odvisnosti od masnih koncentracij za vzorec in za referenčno raztopino. Želeli smo dokazati, da je korelacijski koeficient R^2 pri obeh grafih večji ali enak 0,990.

4.3.3 Selektivnost

Selektivnost nam pove, da metoda uspešno ločuje med analiti in da so meje med njimi jasno vidne in očitne. V ta namen, nismo izmerili samo absorbance vzorca pri 540 nm, ampak interval med 490 nm in 590 nm, ter opazovali krivulje. Želeli smo, da je jasno razvidno, da slepi vzorec predstavlja ravno črto, kar pomeni, da na meritve nima vpliva. Medtem, ko pa je moralo biti pri referenčni raztopini in vzorcu razvidno, da je absorbanca v okolici 540 nm največja in da je krivulja, ki jo izmerimo vzorcu in referenčni raztopini približno enaka.

V ta namen smo še enkrat pripravili en vzorec, referenčno raztopino in slepi vzorec. Kot že omenjeno zgoraj smo merili absorbanco na intervalu od 490 do 590 nm. Najprej smo spektrofotometer umerili s pomočjo slepega vzorca, nato pa ga še enkrat posebej izmerili. Po meritvi slepega vzorca, smo izmerili še vzorec in referenčno raztopino. Izrisal se nam je graf absorbanca v odvisnosti od valovne dolžine, katerega smo potem opazovali in preučevali.

5 Rezultati in diskusija

Najprej smo preučili ekstrakcijo, kjer nas je zanimala količina dobljenega ekstrakta in izkoristek ekstrakcije. Opazovali smo, kjer sta le ta največja in najmanjša. Potem smo določili vsebnost aescina v ekstraktih, preračunali količino dobljenega aescina in določili najbolj optimalne pogoje ekstrakcije, pri katerih je bila vsebnost aescina v vzorcih najvišja. Zanimalo nas je tudi, kateri parameter ekstrakcije, ki smo ga spreminjali, povzroči, da se vzorci najbolj razlikujejo.

Na koncu smo preračunali vse potrebne vrednosti za validacijo in jih primerjali z zahtevami, ki smo jih predhodno dobili po interni metodi iz SOP-a, ki ga je napisalo podjetje Vitiva d.d.

5.1 Ekstrakcija

Najprej smo izvajali ekstrakcije, s katerimi smo pripravili ekstrakte, ki smo jim potem določali vsebnosti aescina. Zabeležili smo zatehte kostanjev ter stehali bučke pred uporabo in po končanem sušenju. S pomočjo teh podatkov smo nato izračunali količino produkta in izkoristek ekstrakcije po naslednjih enačbah :

Izračun količine dobljenega produkta :

$$m_{\text{produkta}} = m_{\text{po sušenju}} - m_{\text{pred uporabo}} \quad (5.1)$$

kjer je :

m_{produkta} = masa dobljenega produkta ekstrakcije [g]

$m_{\text{po sušenju}}$ = masa bučke po sušenju [g]

$m_{\text{pred uporabo}}$ = masa prazne bučke pred uporabo [g].

Izračun izkoristka :

$$\eta_{\text{ekstrakcije}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot 100\%}{m_{\text{zatehte}}} \quad (5.2)$$

kjer je :

$\eta_{\text{ekstrakcije}}$ = izkoristek ekstrakcije [%]

m_{zatehte} = masa zatehte mletih kostanjevih semen [g].

Zatehte mletih kostanjev ter izračuni, s katerimi smo izračunali količino dobljenega produkta in izkoristke ekstrakcij, so podani v prilogi 8.1.

Izračunane količine dobljenih produktov in izkoristki so predstavljeni v tabeli 5-1.

Tabela 5-1. Količine dobljenih produktov in izkoristki ekstrakcij za posamezno ekstrakcijo

| ŠTEVILKA EKSTRAKCIJE | φ etanola [vol%] | T [°C] | t [h] | m_{produkta} [g] | $\eta_{\text{ekstrakcije}}$ [%] |
|-------------------------|--------------------------------|--------|-------|---------------------------|------------------------------------|
| 1 | 50 | 40 | 2 | 2,99 | 14,95 |
| 2 | 50 | 40 | 4 | 3,34 | 16,70 |
| 3 | 50 | 60 | 2 | 3,08 | 15,41 |
| 4 | 50 | 60 | 4 | 3,05 | 15,25 |
| 5 | 60 | 40 | 4 | 2,94 | 14,69 |
| 6 | 60 | 60 | 4 | 3,15 | 15,73 |
| 7 | 60 | 40 | 2 | 2,85 | 14,22 |
| 8 | 60 | 60 | 2 | 3,13 | 15,66 |

kjer je :

φ_{etanola} = volumski odstotek etanola [vol%]

Pri računanju količine dobljenega produkta in izkoristka ekstrakcije smo dobili precej primerljive rezultate, odstopala je samo ekstrakcija številka 2. Izkoristek ekstrakcije je bil pri ekstrakciji številka 2 precej višji kot pri ostalih. Ekstrakcijo številka 2 smo izvajali 4 ure, s 50 vol% etanolom in pri temperaturi 40 °C. Najmanjši izkoristek ekstrakcije pa smo dobili pri ekstrakciji številka 7, ki smo jo izvajali 2 uri, s 60 vol% etanolom in pri temperaturi 40 °C. Farmakopeja narekuje, da mora biti izkoristek ekstrakcij iz semen navadnega divjega kostanja v območju od 12,50 % do 20,00 %. V tabeli 5-1 vidimo, da se vsi dobljeni rezultati gibljejo v tem območju.

5.2 Določevanje vsebnosti aescina v ekstraktih

Z absorbancami vzorcev in referenčnih raztopin, ki smo jih izmerili s spektrofotometrom ter zatehtami standarda aescina in ekstrakta smo izračunali vsebnost aescina po naslednji enačbi:

$$\omega (\% \text{ aescin}) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} \quad (5.3)$$

kjer je :

$\omega (\% \text{ aescin})$ = vsebnost aescina, izražena kot masni delež [%]

A_{vzorca} = absorbanca vzorca [/]

$m_{\text{standarda}}$ = masa standarda aescina [g]

$\%std$ = čistota standarda aescina, ki je v našem primeru znašala 97,56 %

$A_{\text{standarda}}$ = absorbanca referenčne raztopine [/]

m_{vzorca} = masa vzorca [g]

Preračunali smo tudi količino dobljenega aescina glede na maso produkta dobljenega z ekstrakcijo po naslednji enačbi :

$$m_{\text{dobljenega aescina}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot \omega (\% \text{ aescin})}{100 \%} \quad (5.4)$$

kjer je :

$m_{\text{dobljenega aescina}}$ = masa dobljenega aescina v vzorcih [g]

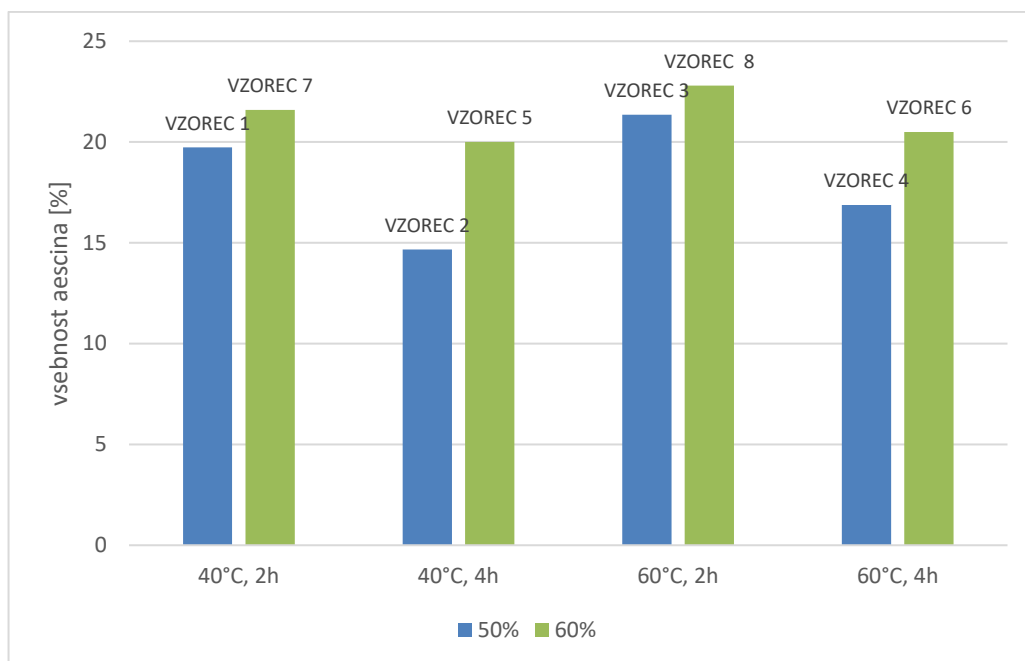
Izračuni za vsebnosti aescina v ekstraktih in za količine dobljenega aescina so predstavljeni v prilogi 8.2, rezultati pa v tabeli 5-2.

Tabela 5-2. Vsebnosti aescina in količine dobljenega aescina za posamezne vzorce

| ŠTEVILKA VZORCA | φ_{etanola} [vol%] | T [°C] | t [h] | ω (% aescin) [%] | $m_{\text{dobljenega aescina}}$ [g] |
|--------------------|--------------------------------------|--------|-------|----------------------------|--|
| 1 | 50 | 40 | 2 | 19,73 | 0,590 |
| 2 | 50 | 40 | 4 | 14,67 | 0,490 |
| 3 | 50 | 60 | 2 | 21,35 | 0,658 |
| 4 | 50 | 60 | 4 | 16,87 | 0,515 |
| 5 | 60 | 40 | 4 | 20,00 | 0,588 |
| 6 | 60 | 60 | 4 | 20,49 | 0,625 |
| 7 | 60 | 40 | 2 | 21,6 | 0,616 |
| 8 | 60 | 60 | 2 | 22,8 | 0,714 |

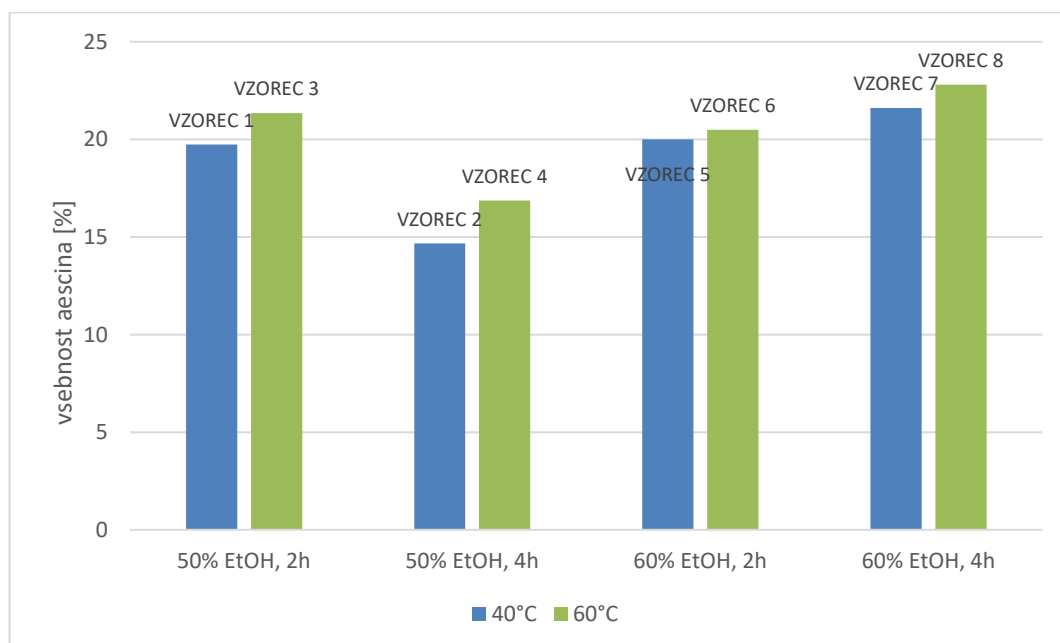
Ugotovili smo, da je najvišja vsebnost aescina v vzorcu 8, najnižja pa v vzorcu številka 2. Enako velja za količino dobljenega aescina. Nato smo primerjali še vsebnost aescina glede na spremembo temperature, volumski odstotek etanola in čas ekstrakcije.

Primerjali smo vzorce, ki so bili pripravljene pri isti temperaturi in pri enakem času. Opazimo da je vsebnost aescina v vzorcih pripravljenih z višjim odstotkom etanola (60 vol%), višja od vzorcev pripravljenih s 50 vol% etanolom (slika 5-1).



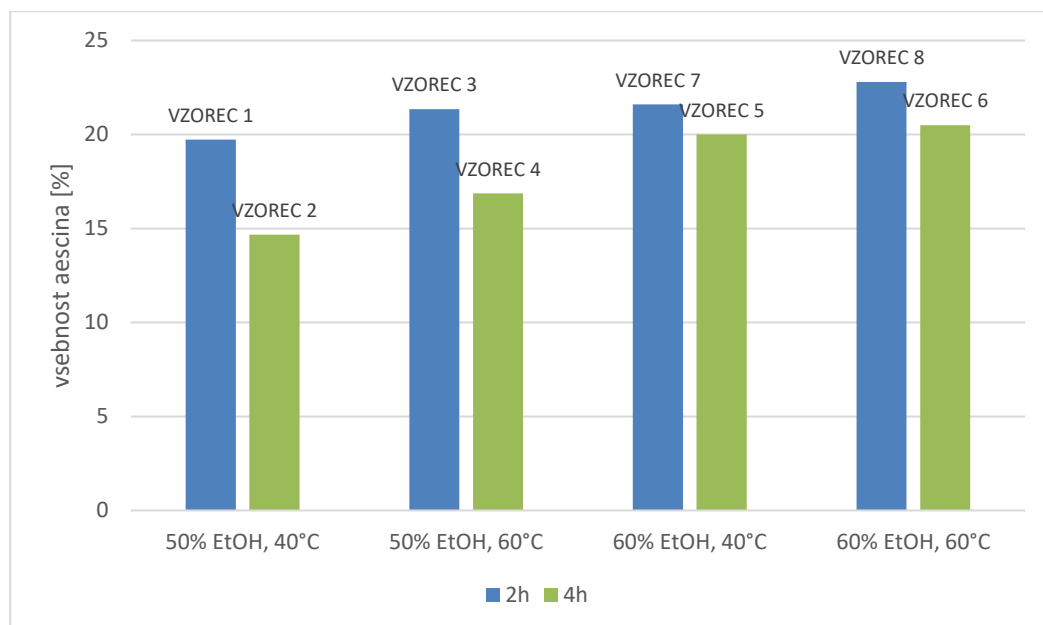
Slika 5-1. Vpliv volumskega odstotka etanola na vsebnost aescina v ekstraktih

Primerjali smo vzorce, ki so bili pripravljene z enakim volumskim odstotkom etanola in pri enakem času. Vzorca ekstrahirani pri 60 °C, so imeli višjo koncentracijo aescina kot vzorca ekstrahirani pri 40 °C (slika 5-2).



Slika 5-2. Vpliv temperature na vsebnost aescina v ekstraktih

Kot zadnje smo primerjali še vpliv časa ekstrakcije na vsebnost aescina v ekstraktih. Opazimo, da je bila pri ekstrakcijah, ki so potekale 2 uri, vsebnost aescina v ekstraktih višja kot pri tistih, ki so potekale 4 ure (slika 5.3).



Slika 5-3. Vpliv časa ekstrakcije na vsebnost aescina v ekstraktih

Zanimalo nas je, kateri parameter je najbolj vplival na ekstrakcijo navadnega divjega kostanja. V ta namen smo izračunali razlike v koncentraciji aescina med posameznimi vzorci, ki smo jih primerjali in povprečje vseh razlik. Izračuni razlik so podani v prilogi, v poglavju 8.3.

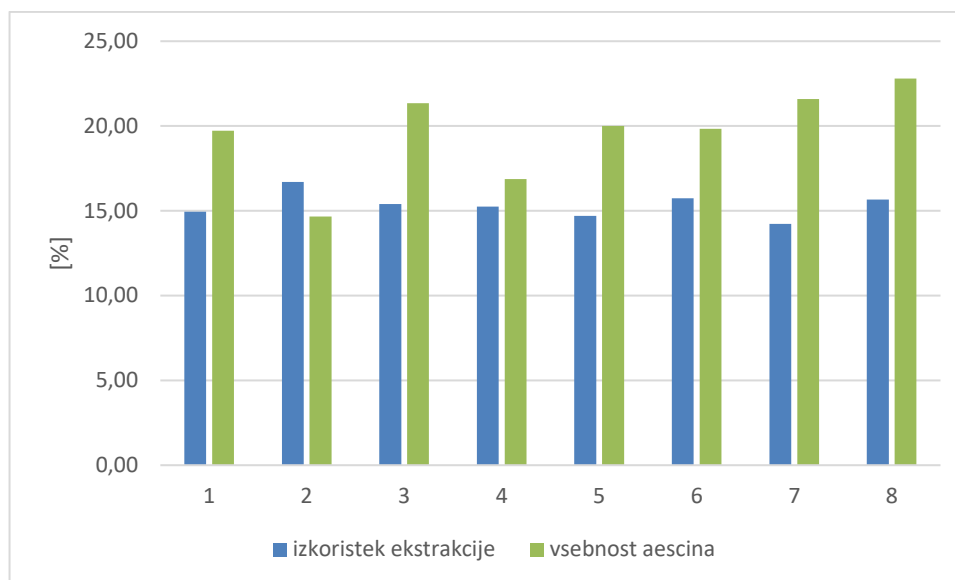
Opazimo, da je na vsebnost aescina v ekstraktih najmanj vplivala sprememba temperature. Koncentracija etanola in čas ekstrakcije sta imela večji vpliv, najbolj pa je na vsebnost aescina vplival čas ekstrakcije.

Podobno primerjavo smo naredili tudi za količino dobljenega aescina in čas ekstrakcije, temperaturo ter volumski odstotek etanola. Dobili smo podobne rezultate kot za vsebnost aescina. Vsi grafi in izračuni so predstavljeni v prilogi 8.4. Ugotovili smo, da tudi na količino dobljenega aescina najbolj vpliva čas ekstrakcije in da več aescina dobimo pri ekstrakcijah, ki so izvedene pri višji temperaturi, z višjo koncentracijo etanola in jih izvajamo krajši čas. Iz tega lahko sklepamo, da se aescin dokaj hitro ekstrahira, kasneje pa se začnejo ekstrahirati druge komponente in nečistoče, ki posledično znižajo vsebnost aescina v vzorcu. Obstaja možnost, da je aescin začel razpadati, če smo ekstrakcijo izvajali dlje časa, vendar o tem nismo zasledili nobenih člankov ali predhodnih raziskav, tako da je to samo domneva.

Tako smo glede na vsebnost aescina v ekstraktih in količino dobljenega aescina določili optimalne pogoje ekstrakcije, ki so :

- čas ekstrakcije: 2 h,
- temperatura ekstrakcije: 60 °C in
- volumski odstotek etanola: 60 vol% EtOH.

To so optimalni pogoji ekstrakcije, ki dajo najvišjo vsebnost in količino aescina, ne pa tudi največjega izkoristka same ekstrakcije. Izkoristek ekstrakcije ne sovpada s vsebnostjo aescina kot lahko vidimo na naslednjem grafu (slika 5-4).



Slika 5-4. Primerjava izkoristkov ekstrakcij in vsebnosti aescina v ekstraktih

5.3 Validacija

Pri validaciji metode smo testirali naslednje parametre:

- natančnost (ponovljivost sistema, ponovljivost metode in vmesna natančnost in obnovljivost),
- linearnost in
- selektivnost.

Postavili smo si kriterije uspešno validirane metode, ki so predstavljeni v Tabeli 5-3.

Tabela 5-3. Kriteriji za posamezne parametre pri validaciji

| PARAMETER | KRITERIJ |
|--|---|
| PONOVLJIVOST SISTEMA | $RSD \leq 5$ |
| PONOVLJIVOST METODE | $RSD \leq 5$ |
| VMESNA NATANČNOST IN OBNOVLJIVOST | $RSD \leq 5$; razlika povprečij, ki smo jih izračunali za prvi in drugi dan, se od večje vrednosti ne razlikujeta za več kot 4 %. |
| LINEARNOST | korelacijski koeficient $\geq 0,990$. |
| SELEKTIVNOST | metoda se ne odzove na druge analite |

Kriteriji so bili določeni po internem predpisu podjetja Vitiva d.d..

5.3.1 Natančnost

K natančnosti spadajo ponovljivost sistema, ponovljivost metode ter vmesna natančnost in obnovljivost. Če vsi trije parametri ustrezajo omejitvam, ki smo jih imeli določene, potem je metoda natančna.

5.3.1.1 Ponovljivost sistema

Pripravili smo referenčno in slepo raztopino ter pomerili referenčno raztopino 6-krat. Iz teh podatkov smo nato izračunali povprečje, SD in RSD, ki ni smel presežati 5 %.

Tabela 5-4. Meritve in rezultati za ponovljivost sistema

| VZOREC | <i>A</i> pri 540 nm [/] |
|------------------|-------------------------|
| 1 | 0,5749 |
| 2 | 0,5756 |
| 3 | 0,5757 |
| 4 | 0,5770 |
| 5 | 0,5764 |
| 6 | 0,5765 |
| povprečje | 0,5760 |
| SD | ±0,0008 |
| RSD [%] | ±0,1300 |

Z izračunanim povprečjem in standardnim odklikom, smo izračunali RSD, ki je znašal ± 0,13 % in ustreza zahtevam.

5.3.1.2 Ponovljivost metode

Pri ponovljivosti metode smo pripravili po šest vzorcev, referenčno raztopino in slepi vzorec. Vsak vzorec smo izmerili 1-krat in s pomočjo referenčne raztopine preračunali vsebnosti aescina. Potrebno je bilo dokazati, da je tudi tokrat RSD manjši od 5 %. Vse izračune smo zbrali v prilogi 8.5, rezultate pa v naslednji tabeli.

Tabela 5-5. Meritve in rezultati za ponovljivost metode

| VZOREC | $m_{zatehte}$ [mg] | A pri 540 nm [/] | ω (% aescin) [%] |
|----------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|
| 1 | 102,650 | 0,4044 | 19,49 |
| 2 | 104,035 | 0,4030 | 19,16 |
| 3 | 103,870 | 0,4043 | 19,25 |
| 4 | 102,920 | 0,4032 | 19,38 |
| 5 | 103,025 | 0,4035 | 19,37 |
| 6 | 102,635 | 0,4031 | 19,43 |
| referenčna raztopina | 26,015 | 0,5131 | / |
| | | povprečje | 19,35 |
| | | SD | 0,12 |
| | | RSD [%] | 0,62 |

RSD je torej manjši od 5 %, ustreza zahtevi in s tem smo dokazali, da je metoda ponovljiva.

5.3.1.3 Vmesna natančnost in obnovljivost

Za ta parameter je bilo potrebno pripraviti dva sklopa meritev. Pripravili smo referenčno raztopino, šest vzorcev in slepi vzorec, enako kot za preverjanje parametra ponovljivost metode. Za prvi sklop meritev smo lahko vzeli kar meritve za ponovljivost metode. Drugi sklop meritev je moral biti izveden pri drugačnih pogojih. Izvajati ga je moral drug analitik, v drugem laboratoriju, pri drugačnih pogojih, kot smo izvajali prvi sklop meritev. Prvi sklop meritev sem izvedla sama, drugi sklop pa je izvajala analitičarka Romana Žvegla iz analiznega laboratorija v podjetju Vitiva d.d.

Zatehte in absorbance obeh sklopov meritev so podane v prilogi, v poglavju 8.6. Za lažjo interpretacijo smo v naslednji tabeli 5-6 predstavili že preračunane vsebnosti aescina.

Tabela 5-6. Meritve in rezultati za vmesno natančnost in obnovljivost

| VZOREC | ω (% <i>aescin</i>) (PRVI SKLOP MERITEV) [%] | ω (% <i>aescin</i>) (DRUGI SKLOP MERITEV) [%] |
|------------------|--|---|
| 1 | 19,49 | 20,19 |
| 2 | 19,16 | 19,91 |
| 3 | 19,25 | 20,04 |
| 4 | 19,38 | 19,61 |
| 5 | 19,37 | 19,74 |
| 6 | 19,43 | 19,64 |
| povprečje | 19,35 | 19,85 |
| SD | 0,12 | 0,24 |
| RSD [%] | 0,62 | 1,2 |

Pri tem parametru smo morali dokazati, da je RSD za prvi in drugi sklop meritev manjši od 5 %, ter da se razlika obeh povprečij razlikuje za manj kot 4 % od večje vrednosti. RSD za prvi in drugi sklop meritev sta 0,62 % in 1,2 % in torej ustrezata.

Da se razlika obeh povprečij razlikuje za manj kot 4 % od večje vrednosti smo izračunali po naslednjem postopku.

Najprej smo izračunali razliko povprečij :

$$\Delta_{\text{povprečij RSD}} = 19,85 \% - 19,35 \% = 0,5 \% \quad (5.5)$$

Kjer je :

$$\Delta_{\text{povprečij RSD}} = \text{razlika povprečij RSD vrednosti obeh sklopov meritev} [\%]$$

Nato smo izračunali še 4 % od večje vrednosti povprečij. Večja vrednost je bila vrednost 19,85, zato smo računali 4 % od te vrednosti.

$$x_{4 \% \text{ od RSD}} = \frac{4 \% \cdot 19,85 \%}{100 \%} = 0,794 \% \quad (5.6)$$

kjer je :

$$x_{4 \% \text{ od RSD}} = 4 \% \text{ od večje vrednosti RSD} [\%]$$

Razlika povprečij je manjša od 4 % večje vrednosti. S tem smo dokazali, da sta oba potrebna pogoja izpolnjena in je metoda obnovljiva.

5.3.2 Linearnost

Linearnost metode smo dokazovali za referenčno raztopino, nato pa še za vzorec. Potrebno je bilo dokazati, da je korelacijski koeficient večji od vrednosti 0,990 za oba primera.

Najprej smo analizirali referenčno raztopino.

Tako kot omenjeno v poglavju 4.3.2, smo raztopino z masno koncentracijo 0,5 g/L poimenovali 100 % referenčna raztopina. Potrebovali pa smo raztopino z enkrat večjo koncentracijo, torej z masno koncentracijo 1 g/L, ki smo jo poimenovali 200 % raztopina. Le to smo potem redčili na določene koncentracije. Dobili smo jo tako, da smo zatehtali enkrat več standarda aescina. Upoštevajoč, da je bila naša zatehta naslednja, smo preračunali natančne masne koncentracije za vsako raztopino posebej.

$$m_{200\% \text{ raztopina v } 50 \text{ mL}} = 50,25 \text{ mg} = 0,05025 \text{ g}$$

$$\gamma_{200\%} = \frac{0,05025 \text{ g} \cdot 1 \text{ L}}{0,05 \text{ L}} = 1,005 \text{ g/L} \quad (5.7)$$

kjer je :

$m_{200\% \text{ raztopina v } 50 \text{ mL}}$ = masa zatehtanega vzorca/referenčne raztopine za 200 % raztopino v 50 mL [g]

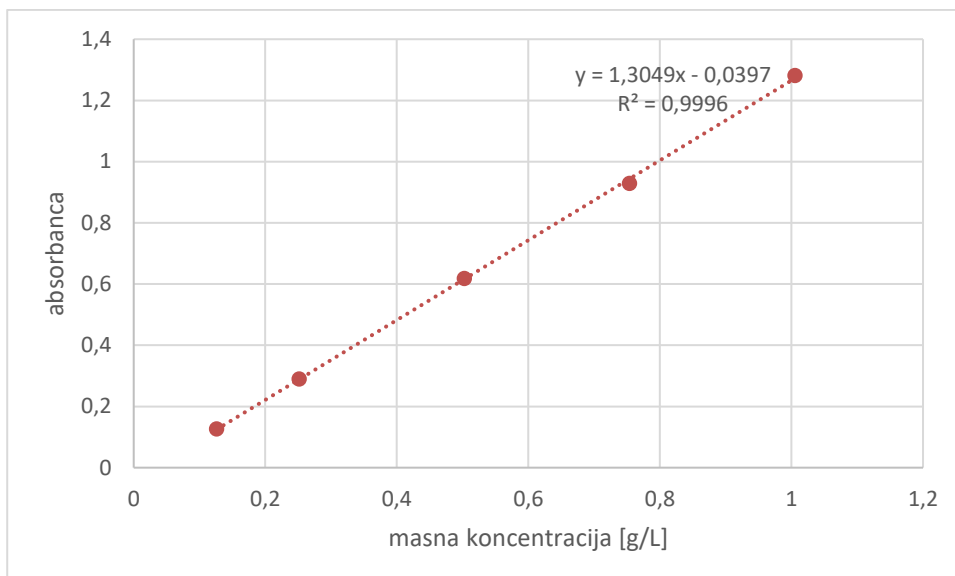
$\gamma_{200\%}$ = masna koncentracija 200 % raztopine [g/L]

Preostale izračune za masne koncentracije smo zbrali v prilogi, v poglavju 8.7, rezultate pa v tabeli 5-7.

Tabela 5-7. Meritve za linearnost za referenčno raztopino

| $\gamma_{\text{referenčne raztopine}}$ [g/L] | A pri 540 nm [/] |
|--|------------------|
| 0,1256 | 0,1243 |
| 0,2513 | 0,2894 |
| 0,5025 | 0,6182 |
| 0,7538 | 0,9286 |
| 1,0050 | 1,2815 |

S pomočjo teh podatkov smo si narisali graf. X os predstavlja masne koncentracije, y os pa absorbanco.



Slika 5-5. Graf absorbance v odvisnosti od masne koncentracije za referenčno raztopino

Vidimo, da korelacijski koeficient znaša 0,9996, kar je več kot 0,990 in ustreza kriteriju..

Nato smo test linearnosti izvedli še na vzorcu. Namesto 0,1 g vzorca, smo si zatehtali 0,2 g vzorca.

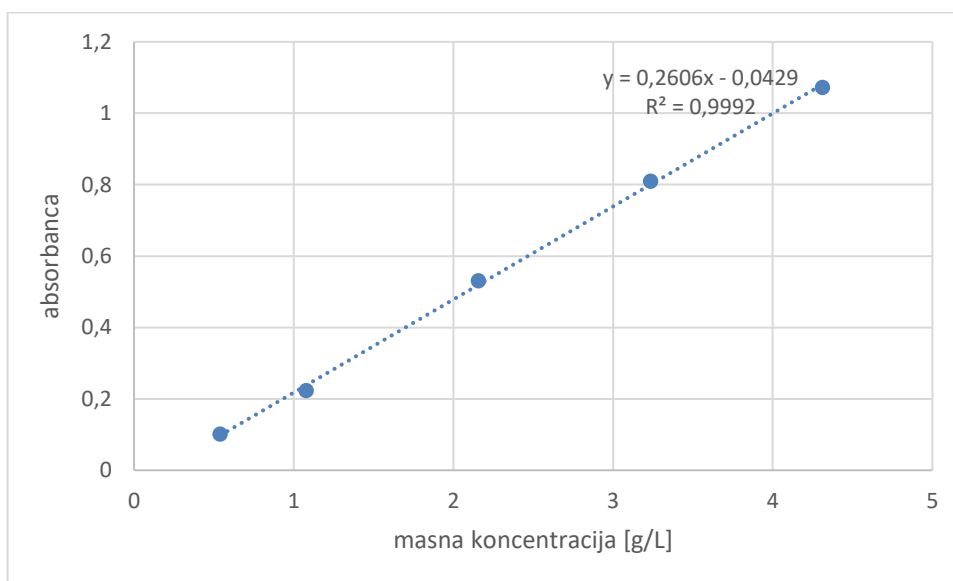
$$m_{200\% \text{ v } 50 \text{ mL}} = 215,635 \text{ mg} = 0,215635 \text{ g}$$

$$\gamma_{200\%} = \frac{0,215635 \text{ g} \cdot 1 \text{ L}}{0,05 \text{ L}} = 4,3127 \text{ g/L} \quad (5.8)$$

Tabela 5-8. Meritve za linearnost za vzorec

| γ vzorca [g/L] | A pri 540 nm [I] |
|-----------------------|--------------------|
| 0,5391 | 0,1015 |
| 1,0782 | 0,2228 |
| 2,1564 | 0,5303 |
| 3,2345 | 0,8094 |
| 4,3127 | 1,0717 |

Grafično so rezultati prikazani na sliki 5-6.

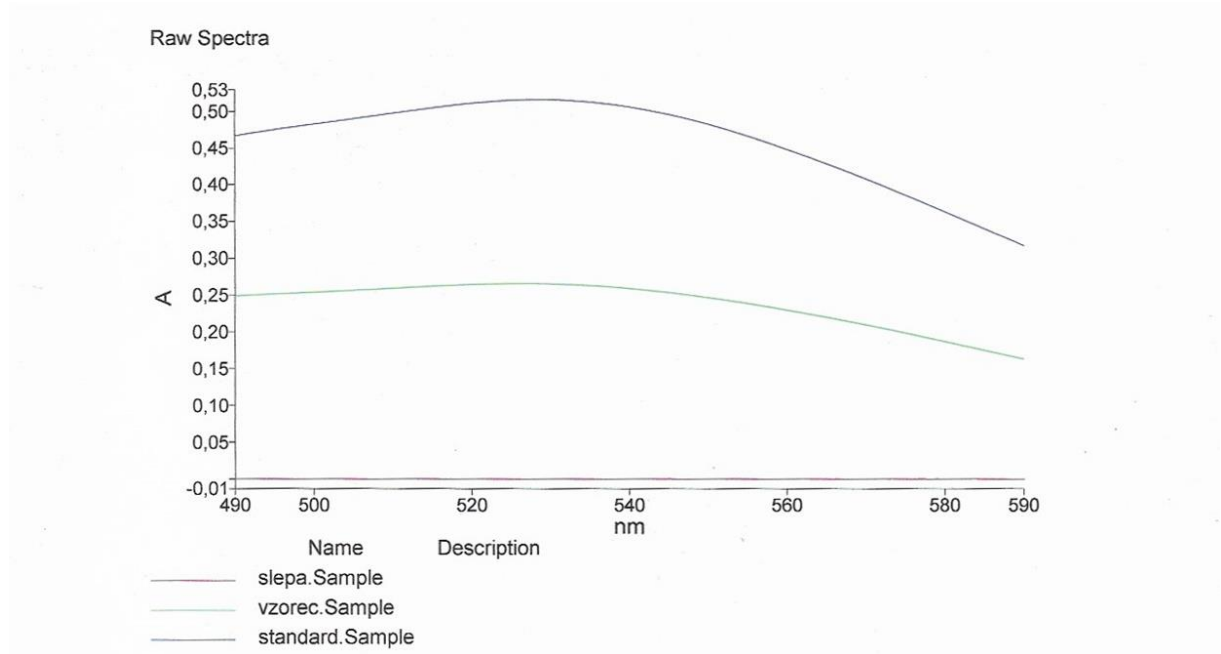


Slika 5-6. Graf absorbanca v odvisnosti od masne koncentracije za vzorec

Tudi pri vzorcu korelacijski koeficient R^2 znaša več kot 0,990 in sicer 0,9992. S tem smo dokazali tudi linearnost metode za vzorec.

5.3.3 Selektivnost

Za preverjanje selektivnosti smo morali izmeriti absorbanco slepe probe, vzorca in referenčne raztopine oziroma standarda. Dokazati smo morali, da je metoda selektivna in da slepa proba predstavlja ravno črto in da ne absorbira svetlobe v določenem območju valovnih dolžin. S tem smo dokazali, da je metoda občutljiva samo na določene komponente v raztopini – v tem primeru na aescin. V slepi probi pa aescina ni, zato je absorbanca konstantna in je ves čas enaka nič. Absorbanco smo merili v območju ± 50 nm od merjene vrednosti, ki znaša 540 nm, torej od 490 do 590 nm. Čeprav je bila v tem primeru absorbanca vzorca precej nižja od absorbanca referenčne raztopine, opazimo, da je oblika krivulje obeh približno enaka in da je maksimum absorbanca v okolici 540 nm. Meritve so predstavljene na sliki 5-7.



Slika 5-7. Izmerjeni intervali spektrov za slepi vzorec, vzorec in standard

S tem smo dokazali, da je metoda oziroma sistem, ki meri vzorce, občutljiv na določen analit, ki je v našem primeru aescin in ne na druge komponente.

6 Zaključek

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, pri katerih ekstrakcijskih pogojih dobimo največjo vsebnost in količino aescina iz semen navadnega divjega kostanja. Semena vsebujejo poleg aescina še veliko drugih komponent, ki se prav tako ekstrahirajo, z izbiro pogojev ekstrakcije pa lahko vplivamo na koncentracijo aescina v ekstraktih.. V ta namen smo se odločili, da spreminjamo temperaturo, koncentracijo etanola, ki smo ga uporabljali kot topilo in čas ekstrakcije.

Izvedli smo osem ekstraktij pod različnimi pogoji.

Primerjali smo izkoristke ekstrakcije z vsebnostmi aescina in ugotovili, da niso premosorazmerni. Več aescina se je izločilo pri višji temperaturi in višjem volumskem odstotku etanola. S podaljševanjem časa ekstrakcije pa se je vsebnost aescina zmanjševala. Predvidevamo, da se aescin iz navadnega divjega kostanja izolira dokaj hitro, nato pa se začnejo izločati še preostale komponente, ki povzročijo nižanje vsebnosti aescina v ekstraktih.

Metoda, po kateri smo izvajali določevanje vsebnosti aescina v ekstraktih, je bila vzeta iz francoske farmakopeje, s katero smo si pomagali tudi pri določitvi topila in parametrov za ekstrakcijo. Sama metoda je sicer precej zamudna in temelji sprektofotometrični analizi.

Obstaja tudi metoda določevanja vsebnosti aescina s pomočjo HPLC-ja, ki je predpisana metoda v skladu z evropsko farmakopejo. Smiselno bi bilo narediti primerjavo med spektrofotometrično metodo, po kateri smo ekstrakte analizirali v tej diplomski nalogi in med metodo s pomočjo HPLC-ja.

Namen diplomske naloge pa je bila tudi validacija zgoraj omenjene metode, saj v podjetju Vitiva d.d., kjer smo izvajala eksperimentalni del diplomske naloge, še ni bila validirana. Z validacijo metode smo potrdili, da je le ta natančna, linearna in selektivna ter primerna za analizo aescina v ekstraktih navadnega divjega kostanja.

7 Literatura

- [1] Spohn, M., Spohn, R. Katero drevo je to ?. Kranj : Založba Narava, 2008.
- [2] Galle Toplak, K. Zdravilne rastline na Slovenskem. Ljubljana : Mladinska knjiga, 2017.
- [3] Sirtori, C. R. Aescin : pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacological Research* 44(3), 183-193, 2001.
- [4] Behera, S., Ghanty, S., Ahmad, F., Santra, S., Banerjee, S. UV-Visible spectrophotometric method development and validation of assay of paracetamol tablet formulation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(12), 4945-4953, 2012.
- [5] Nature notes : horse chestnut trees. <https://www.thetimes.co.uk/article/nature-notes-horse-chestnut-trees-xbkxx3qjrbh>. (dostop 29.7.2020)
- [6] Guide to Poisonous Plants. https://csuvth.colostate.edu/poisonous_plants/Plants/Details/62. (dostop 8.8.2020)
- [7] Horse chestnut seed extract. <http://yoffeecare.com/horse-chestnut-seed-extract/>. (dostop 29.7.2020)
- [8] Oblak, T. Divji kostanj : uporaba in njegovi zdravilni pripravki. <https://www.bodieko.si/divji-kostanj>. (dostop 21.7.2020)
- [9] Castleman, M. *The new Healing Herbs : the classic guide to nature's best medicines*. Rodale Inc., 2001.
- [10] Hippocastanaceae. *Meyler's Side Effects of Drugs*, 750, 2016.
- [11] Aescin. <https://en.wikipedia.org/wiki/Aescin>. (dostop 29.7.2020)
- [12] Narasaraju, M., Akheel, A. S. Simple Spectrophotometric Method For The Determination Of Aescin From Aesculus Hippocastanum. *Natural Products : An Indian Journal*, 3(2), 77-80, 2007.
- [13] Diehm, C., Trampisch, H., Lange, S., Schmidt, C. Comparison of leg compression stocking and oral horse chestnut seed extract therapy in patients with chronic venous insufficiency. *The Lancet*, 347, 292-294, 1996.
- [14] Balick, J. M. *Rodale's 21st Century Herbal : A practical guide for healthy living using nature's most powerful plants*. Rodale Inc., 86, 2014.
- [15] Boon, H., Smith, M. *The Complete Natural Medicine Guide to the 50 Most Common Medicinal Herbs*. The Institute of Naturopathic Education and Research, 2004.
- [16] Ramelet, A. A. Venoactive Drugs. *Schlerotherapy*, 426-434, 2017.
- [17] Knez, Ž., Škerget, M. *Termodifuzijski separacijski procesi (zbrano gradivo)*. Maribor : Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2009.
- [18] Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A Review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436, 2013.

- [19] Cold Maceration : what it means and why you want it for your e-juice. <https://www.blacknote.com/cold-maceration-for-your-e-juice-explained/>. (dostop 28.7.2020)
- [20] Berk, Z. Extraction. *Food Process Engineering and Technology*, 259-277, 2009.
- [21] Separatory funnel. https://en.wikipedia.org/wiki/Separatory_funnel. (dostop 28.7.2020)
- [22] Vacuum filtration. <https://labsociety.com/lab-equipment-category/vacuum-filtration/>. (dostop 29.7.2020)
- [23] Organic laboratory techniques 3. <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/laboratory/filtration.pdf>. (dostop 28.7.2020)
- [24] Filtration. <https://orgchemboulder.com/Technique/Procedures/Filtration/Filtration.shtml>. (dostop 28.7.2020)
- [25] The basis of vacuum evaporation. <https://blog-en.condorchem.com/basis-vacuum-evaporation/#.XzfCKugzbIU>(<https://sci-hub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780750645683500390>). (dostop 29.7.2020)
- [26] Vacuum evaporation. <https://aquadest.cz/en/vacuum-evaporation>. (dostop 27.7.2020)
- [27] Jiang, H., Zhang, M., Adhikari, B. Fruit and vegetable powders. *Handbook of Food Powders*, 532-552, 2013.
- [28] Vacuum drying. <https://www.amixon.com/en/vacuum-drying>. (dostop 27.7.2020)
- [29] Punathil, L., Basak, T. Microwave Processing of Frozen and Packaged Food Materials : Experimental. Reference Module in Food Science, 2016.
- [30] Finšgar, M. Analizna kemija 2 : skripta. 2018.
- [31] Huber, L. Validation of Analytical Methods. Nemčija, Agilent Technologies, 2010.
- [32] Moder, M. Validacija analizne metode. V : Statistične metode in merilna negotovost (zbornik predavanj). Ljubljana : ZTI – Zavod za tehnično izobraževanje, 1998.
- [33] Kalra, K. Method Development and Validation of Analytical Procedures. Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas, 3-15, 2011.
- [34] Zupan, J. Kemometrija in obdelava eksperimentalnih podatkov. Ljubljana : Inštitut Nove revije, Zavod za humanistiko in Kemijski inštitut Ljubljana, 2009.
- [35] Cvelbar, M., Šmid Korbar, J., Budihna, M. Farmacevtski zakoniki : evropska Farmakopeja in formularium slovenicum z dopolnili. *Zdravniški vestnik*, 72: 25-26, 2003.
- [36] Uradni list Republike Slovenije. <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/1998-01-1956/> (dostop 29.7.2020)
- [37] Marron D'Inde – *Aesculus hippocastanum*. French Pharmacopeia. Januar, 1995.

8 Priloge

8.1 Ekstrakcije

Tabela 8-1. Zatehte kostanjev, mase bučk pred uporabo in po sušenju

| ŠTEVILKA EKSTRAKCIJE | $m_{zatehte}$ [g] | $m_{pred\ uporabo}$ [g] | $m_{po\ sušenju}$ [g] |
|-------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------|
| 1 | 20,00 | 186,69 | 189,68 |
| 2 | 20,00 | 185,19 | 188,53 |
| 3 | 19,99 | 185,87 | 188,95 |
| 4 | 20,00 | 176,43 | 179,48 |
| 5 | 20,01 | 185,51 | 188,45 |
| 6 | 20,02 | 196,72 | 199,87 |
| 7 | 20,04 | 187,20 | 190,05 |
| 8 | 19,99 | 187,64 | 190,77 |

kjer je :

$m_{po\ sušenju}$ = masa bučke po sušenju (g)

$m_{pred\ uporabo}$ = masa bučke pred uporabo (g)

$m_{zatehte}$ = masa zatehte mletih kostanjevih semen (g)

Izračuni mas produkta in izkoristkov ekstrakcije

Ekstrakcija 1 :

$$m_{produkta} = m_{po\ sušenju} - m_{pred\ uporabo} = 189,69\ g - 186,69\ g = 2,99\ g \quad (8.1.1)$$

$$\eta_{ekstrakcije} = \frac{m_{produkta} \cdot 100\%}{m_{zatehte}} = \frac{2,99\ g \cdot 100\%}{20,00\ g} = 14,95\ \% \quad (8.1.2)$$

Ekstrakcija 2 :

$$m_{produkta} = m_{po\ sušenju} - m_{pred\ uporabo} = 188,53\ g - 185,19\ g = 3,34\ g \quad (8.1.3)$$

$$\eta_{ekstrakcije} = \frac{m_{produkta} \cdot 100\%}{m_{zatehte}} = \frac{3,34\ g \cdot 100\%}{20,00\ g} = 16,70\ \% \quad (8.1.4)$$

Ekstrakcija 3 :

$$m_{produkta} = m_{po\ sušenju} - m_{pred\ uporabo} = 188,95\ g - 185,87\ g = 3,08\ g \quad (8.1.5)$$

$$\eta_{ekstrakcije} = \frac{m_{produkta} \cdot 100\%}{m_{zatehte}} = \frac{3,08\ g \cdot 100\%}{19,99\ g} = 15,41\ \% \quad (8.1.6)$$

Ekstrakcija 4 :

$$m_{\text{produkta}} = m_{\text{po sušenju}} - m_{\text{pred uporabo}} = 179,48 \text{ g} - 176,43 \text{ g} = 3,05 \text{ g} \quad (8.1.7)$$

$$\eta_{\text{ekstrakcije}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot 100\%}{m_{\text{zatehte}}} = \frac{3,05 \text{ g} \cdot 100\%}{20,00 \text{ g}} = 15,25 \% \quad (8.1.8)$$

Ekstrakcija 5 :

$$m_{\text{produkta}} = m_{\text{po sušenju}} - m_{\text{pred uporabo}} = 188,45 \text{ g} - 185,51 \text{ g} = 2,94 \text{ g} \quad (8.1.8)$$

$$\eta_{\text{ekstrakcije}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot 100\%}{m_{\text{zatehte}}} = \frac{2,94 \text{ g} \cdot 100\%}{20,01 \text{ g}} = 14,69 \% \quad (8.1.9)$$

Ekstrakcija 6 :

$$m_{\text{produkta}} = m_{\text{po sušenju}} - m_{\text{pred uporabo}} = 199,87 \text{ g} - 196,72 \text{ g} = 3,15 \text{ g} \quad (8.1.10)$$

$$\eta_{\text{ekstrakcije}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot 100\%}{m_{\text{zatehte}}} = \frac{3,15 \text{ g} \cdot 100 \%}{20,02 \text{ g}} = 15,73\% \quad (8.1.11)$$

Ekstrakcija 7 :

$$m_{\text{produkta}} = m_{\text{po sušenju}} - m_{\text{pred uporabo}} = 190,05 \text{ g} - 187,20 \text{ g} = 2,85 \text{ g} \quad (8.1.12)$$

$$\eta_{\text{ekstrakcije}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot 100\%}{m_{\text{zatehte}}} = \frac{2,85 \text{ g} \cdot 100 \%}{20,04 \text{ g}} = 14,22\% \quad (8.1.13)$$

Ekstrakcija 8 :

$$m_{\text{produkta}} = m_{\text{po sušenju}} - m_{\text{pred uporabo}} = 190,77 \text{ g} - 187,64 \text{ g} = 3,13 \text{ g} \quad (8.1.14)$$

$$\eta_{\text{ekstrakcije}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot 100\%}{m_{\text{zatehte}}} = \frac{3,31 \text{ g} \cdot 100 \%}{19,99 \text{ g}} = 15,66\% \quad (8.1.15)$$

8.2 Izračuni vsebnosti in količin aescina

Ekstrakt 1 :

$$m_{\text{standarda}} = 0,02522 \text{ g}$$

$$A_{\text{standarda}} = 0,5193 \text{ nm}$$

$$\omega (\% \text{ aescin}) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,4494 \text{ nm} \cdot 0,02522 \text{ g} \cdot 97,56 \%}{0,5193 \text{ nm} \cdot 0,1079 \text{ g}} = 19,73 \% \quad (8.2.1)$$

$$m_{\text{dobljenega aescina}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot \%(\text{aescin})}{100\%} = \frac{2,99 \text{ g} \cdot 19,73 \%}{100 \%} = 0,590 \text{ g} \quad (8.2.2)$$

Ekstrakt 2 :

$$m_{\text{standarda}} = 0,025785 \text{ g}$$

$$A_{\text{standarda}} = 0,5258 \text{ nm}$$

$$\omega (\% \text{ aescin}) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,3183 \text{ nm} \cdot 0,025785 \text{ g} \cdot 97,56 \%}{0,5258 \text{ nm} \cdot 0,1038 \text{ g}} = 14,67 \% \quad (8.2.3)$$

$$m_{\text{dobljenega aescina}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot \%(\text{aescin})}{100\%} = \frac{3,34 \text{ g} \cdot 14,67 \%}{100 \%} = 0,490 \text{ g} \quad (8.2.4)$$

Ekstrakt 3 :

$$m_{\text{standarda}} = 0,02522 \text{ g}$$

$$A_{\text{standarda}} = 0,5193 \text{ nm}$$

$$\omega (\% \text{ aescin}) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,4578 \text{ nm} \cdot 0,02522 \text{ g} \cdot 97,56 \%}{0,5193 \text{ nm} \cdot 0,1016 \text{ g}} = 21,35 \% \quad (8.2.5)$$

$$m_{\text{dobljenega aescina}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot \%(\text{aescin})}{100\%} = \frac{3,08 \text{ g} \cdot 21,35 \%}{100 \%} = 0,658 \text{ g} \quad (8.2.6)$$

Ekstrakt 4 :

$$m_{\text{standarda}} = 0,025525 \text{ g}$$

$$A_{\text{standarda}} = 0,5586 \text{ nm}$$

$$\omega (\% \text{ aescin}) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,3788 \text{ nm} \cdot 0,025525 \text{ g} \cdot 97,56 \%}{0,4548 \text{ nm} \cdot 0,1022 \text{ g}} = 16,87 \% \quad (8.2.7)$$

$$m_{\text{dobljenega aescina}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot \%(\text{aescin})}{100\%} = \frac{3,05 \text{ g} \cdot 16,87 \%}{100 \%} = 0,515 \text{ g} \quad (8.2.8)$$

Ekstrakt 5 :

$$m_{\text{standarda}} = 0,025625 \text{ g}$$

$$A_{\text{standarda}} = 0,6426 \text{ nm}$$

$$\omega (\% \text{ aescin}) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,5295 \text{ nm} \cdot 0,025625 \text{ g} \cdot 97,56 \%}{0,6426 \text{ nm} \cdot 0,103 \text{ g}} = 20,00 \% \quad (8.2.9)$$

$$m_{\text{dobljenega aescina}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot \%(\text{aescin})}{100\%} = \frac{2,94 \text{ g} \cdot 20,00\%}{100\%} = 0,588 \text{ g} \quad (8.2.10)$$

Ekstrakt 6 :

$$m_{\text{standarda}} = 0,025525 \text{ g}$$

$$A_{\text{standarda}} = 0,5586 \text{ nm}$$

$$\omega (\% \text{ aescin}) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,4548 \text{ nm} \cdot 0,025525 \text{ g} \cdot 97,56\%}{0,5586 \text{ nm} \cdot 0,0989 \text{ g}} = 20,49\% \quad (8.2.11)$$

$$m_{\text{dobljenega aescina}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot \%(\text{aescin})}{100\%} = \frac{3,15 \text{ g} \cdot 20,49\%}{100\%} = 0,625 \text{ g} \quad (8.2.12)$$

Ekstrakt 7 :

$$m_{\text{standarda}} = 0,025785 \text{ g}$$

$$A_{\text{standarda}} = 0,5258 \text{ nm}$$

$$\omega (\% \text{ aescin}) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,4896 \text{ nm} \cdot 0,02785 \text{ g} \cdot 97,56\%}{0,5258 \text{ nm} \cdot 0,1084 \text{ g}} = 21,60\% \quad (8.2.13)$$

$$m_{\text{dobljenega aescina}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot \%(\text{aescin})}{100\%} = \frac{2,85 \text{ g} \cdot 21,6\%}{100\%} = 0,616 \text{ g} \quad (8.2.14)$$

Ekstrakt 8 :

$$m_{\text{standarda}} = 0,025785 \text{ g}$$

$$A_{\text{standarda}} = 0,5258 \text{ nm}$$

$$\omega (\% \text{ aescin}) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,5038 \text{ nm} \cdot 0,025785 \text{ g} \cdot 97,56\%}{0,5258 \text{ nm} \cdot 0,1056 \text{ g}} = 22,8\% \quad (8.2.15)$$

$$m_{\text{dobljenega aescina}} = \frac{m_{\text{produkta}} \cdot \%(\text{aescin})}{100\%} = \frac{3,13 \text{ g} \cdot 22,8\%}{100\%} = 0,714 \text{ g} \quad (8.2.16)$$

8.3 Odvisnost vsebnosti aescina od spreminjanja parametrov

Razlika med vzorci zaradi časa ekstrahiranja :

Tabela 8-2. Razlike med vsebnostmi aescina v ekstraktih glede na čas ekstrakcije

| | 2 uri | 4 ure | Δ |
|-----------------------|--------------|------------------|----------|
| 50% EtOH, 40°C | 19,73 % | 14,67 % | 5,06 % |
| 50% EtOH, 60°C | 21,35 % | 16,87 % | 4,48 % |
| 60% EtOH, 40°C | 21,60 % | 20,00 % | 1,6 % |
| 60% EtOH, 60°C | 22,80 % | 20,49 % | 2,31 % |
| | | | |
| | | povprečje | 3,36 % |

kjer je :

Δ = razlika med vzorcema

Razlika med vzorci zaradi volumskega odstotka etanola :

Tabela 8-3. Razlike med vsebnostmi aescina zaradi volumskega odstotka etanola

| | 50% EtOH | 60% EtOH | Δ |
|-----------------|-----------------|------------------|----------|
| 40°C, 2h | 19,73 % | 21,60 % | 1,87 % |
| 40°C, 4h | 14,67 % | 20,00 % | 5,33 % |
| 60°C, 2h | 21,35 % | 22,80 % | 1,45 % |
| 60°C, 4h | 16,87 % | 20,49 % | 3,62 % |
| | | | |
| | | povprečje | 3,07 % |

Razlika med vzorci zaradi temperature :

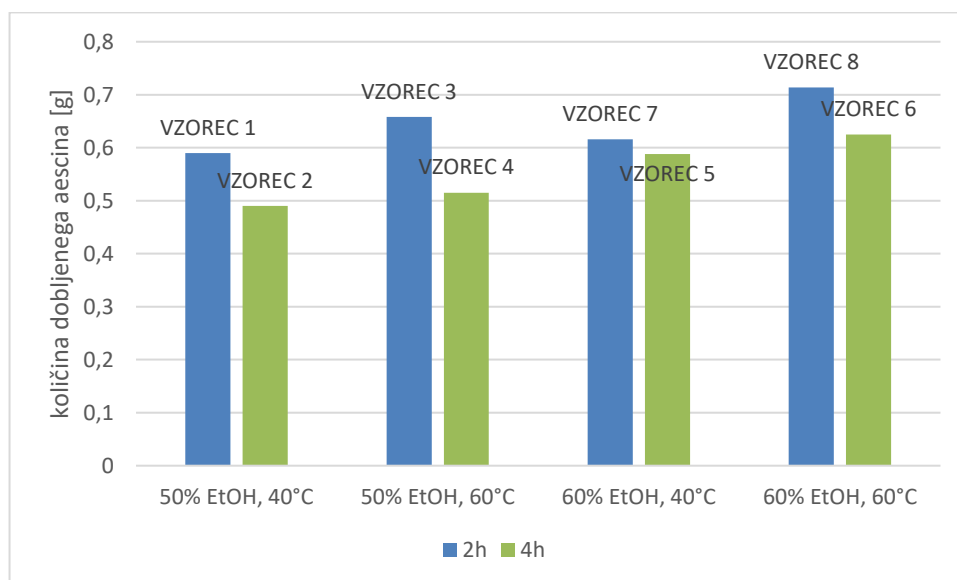
Tabela 8-4. Razlike med vsebnostmi aescina zaradi temperature

| | 40°C | 60°C | Δ |
|---------------------|-------------|------------------|----------|
| 50% EtOH, 2h | 19,73 % | 21,35 % | 1,62 % |
| 50% EtOH, 4h | 14,67 % | 16,87 % | 2,20 % |
| 60% EtOH, 2h | 20,00 % | 20,49 % | 0,49 % |
| 60% EtOH, 4h | 21,60 % | 22,80 % | 1,20 % |
| | | | |
| | | povprečje | 1,38 % |

8.4 Odvisnost količine aescina od spreminjanja parametrov

Tabela 8-5. Razlike med količinami dobljenega aescina zaradi časa ekstrakcije

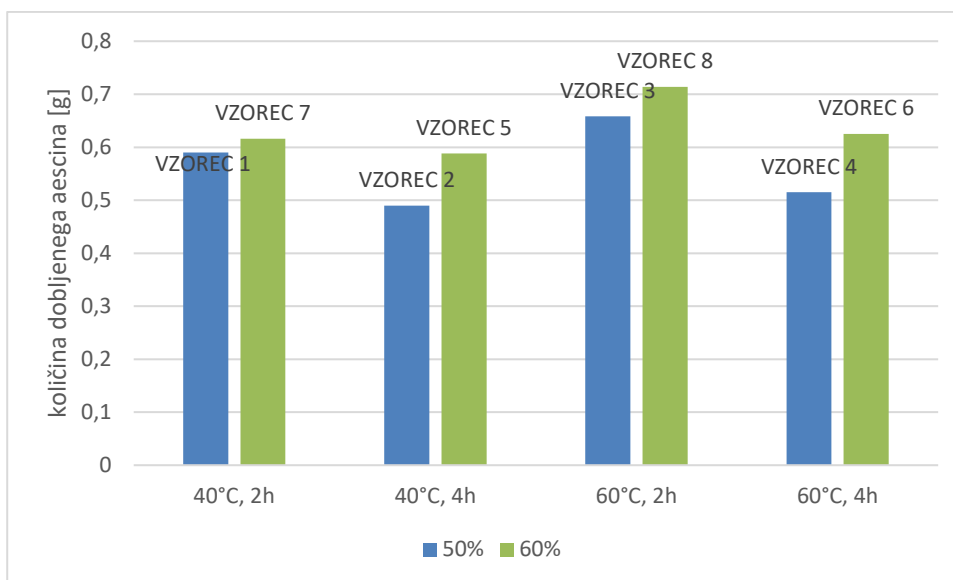
| | 2 h | 4 h | Δ |
|-----------------------|------------------|---------|----------|
| 50% EtOH, 40°C | 0,59 g | 0,49 g | 0,10 g |
| 50% EtOH, 60°C | 0,658 g | 0,515 g | 0,14 g |
| 60% EtOH, 40°C | 0,616 g | 0,588 g | 0,03 g |
| 60% EtOH, 60°C | 0,714 g | 0,625 g | 0,09 g |
| | | | |
| | povprečje | | 0,09 g |



Slika 8-1. Vpliv časa ekstrakcije na količino aescina

Tabela 8-6. Razlike med količinami dobljenega aescina zaradi koncentracije etanola

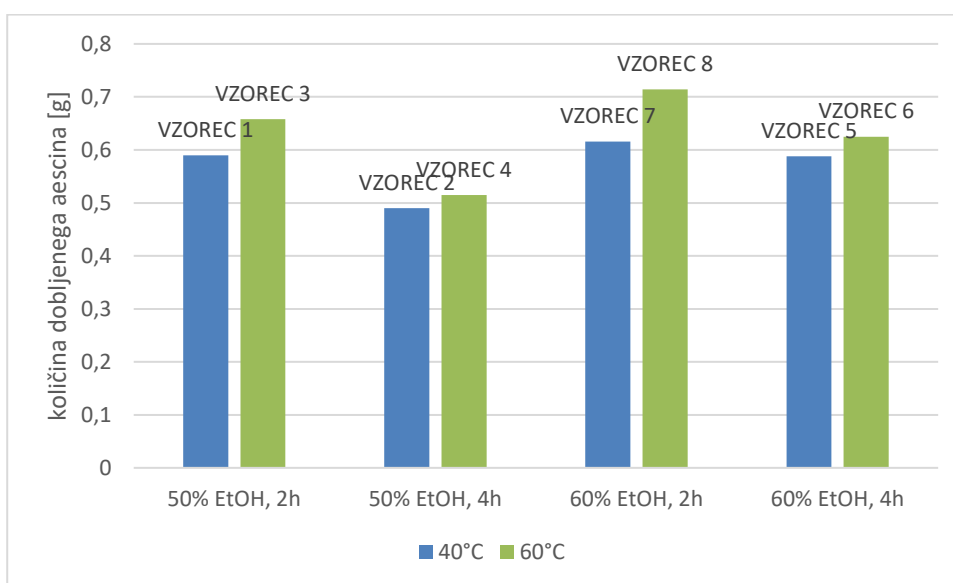
| | 50% | 60% | Δ |
|-----------------|------------------|---------|----------|
| 40°C, 2h | 0,59 g | 0,616 g | 0,03 g |
| 40°C, 4h | 0,49 g | 0,588 g | 0,10 g |
| 60°C, 2h | 0,658 g | 0,714 g | 0,06 g |
| 60°C, 4h | 0,515 g | 0,625 g | 0,11 g |
| | | | |
| | povprečje | | 0,07 g |



Slika 8-2. Vpliv koncentracije etanola na količino aescina

Tabela 8-7. Razlike med količinami dobljenega aescina zaradi temperature

| | 40°C | 60°C | Δ |
|---------------------|---------|------------------|--------|
| 50% EtOH, 2h | 0,59 g | 0,658 g | 0,07 g |
| 50% EtOH, 4h | 0,49 g | 0,515 g | 0,03 g |
| 60% EtOH, 2h | 0,616 g | 0,714 g | 0,10 g |
| 60% EtOH, 4h | 0,588 g | 0,625 g | 0,04 g |
| | | | |
| | | povprečje | 0,06 g |



Slika 8-3. Vpliv temperature na količino aescina

8.5 Ponovljivost metode

| VZOREC | $m_{zatehte\ vzorca}$ [mg] | $A\ pri\ 540\ nm\ [I]$ | $\omega\ (\% aescin)\ [\%]$ |
|-------------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| 1 | 102,650 | 0,4044 | 19,49 |
| 2 | 104,035 | 0,4030 | 19,16 |
| 3 | 103,870 | 0,4043 | 19,25 |
| 4 | 102,920 | 0,4032 | 19,38 |
| 5 | 103,025 | 0,4035 | 19,37 |
| 6 | 102,635 | 0,4031 | 19,43 |
| referenčna raztopina | 26,015 | 0,5131 | / |

Vzorec 1 :

$$\omega(\%aescin) = \frac{A_{vzorca} \cdot m_{standarda} \cdot \%std}{A_{standarda} \cdot m_{vzorca}} = \frac{0,4044\ nm \cdot 0,026015\ g \cdot 97,56\ \%}{0,5131\ nm \cdot 0,10265\ g} = 19,49\ \% \quad (8.5.1)$$

Vzorec 2 :

$$\omega(\%aescin) = \frac{A_{vzorca} \cdot m_{standarda} \cdot \%std}{A_{standarda} \cdot m_{vzorca}} = \frac{0,4030\ nm \cdot 0,026015\ g \cdot 97,56\ \%}{0,5131\ nm \cdot 0,104035\ g} = 19,16\ \% \quad (8.5.2)$$

Vzorec 3 :

$$\omega(\%aescin) = \frac{A_{vzorca} \cdot m_{standarda} \cdot \%std}{A_{standarda} \cdot m_{vzorca}} = \frac{0,4043\ nm \cdot 0,026015\ g \cdot 97,56\ \%}{0,5131\ nm \cdot 0,10387\ g} = 19,25\ \% \quad (8.5.3)$$

Vzorec 4 :

$$\omega(\%aescin) = \frac{A_{vzorca} \cdot m_{standarda} \cdot \%std}{A_{standarda} \cdot m_{vzorca}} = \frac{0,4032\ nm \cdot 0,026015\ g \cdot 97,56\ \%}{0,5131\ nm \cdot 0,10292\ g} = 19,38\ \% \quad (8.5.4)$$

Vzorec 5 :

$$\omega(\%aescin) = \frac{A_{vzorca} \cdot m_{standarda} \cdot \%std}{A_{standarda} \cdot m_{vzorca}} = \frac{0,4031\ nm \cdot 0,026015\ g \cdot 97,56\ \%}{0,5131\ nm \cdot 0,103025\ g} = 19,37\ \% \quad (8.5.5)$$

Vzorec 6 :

$$\omega(\%aescin) = \frac{A_{vzorca} \cdot m_{standarda} \cdot \%std}{A_{standarda} \cdot m_{vzorca}} = \frac{0,4031\ nm \cdot 0,026015\ g \cdot 97,56\ \%}{0,5131\ nm \cdot 0,102635\ g} = 19,43\ \% \quad (8.5.6)$$

8.6 Vmesna natančnost in obnovljivost

$$m_{\text{standarda}} = 26,165 \text{ mg} = 0,026165 \text{ g}$$

$$A_{\text{standarda}} = 0,6688 \text{ nm}$$

Vzorec 1 :

$$\omega(\%aescin) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,5502 \text{ nm} \cdot 0,026165 \text{ g} \cdot 97,56 \%}{0,6688 \text{ nm} \cdot 0,104 \text{ g}} = 20,19 \% \quad (8.6.1)$$

Vzorec 2 :

$$\omega(\%aescin) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,5455 \text{ nm} \cdot 0,026165 \text{ g} \cdot 97,56 \%}{0,6688 \text{ nm} \cdot 0,104585 \text{ g}} = 19,91 \% \quad (8.6.2)$$

Vzorec 3 :

$$\omega(\%aescin) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,5466 \text{ nm} \cdot 0,026165 \text{ g} \cdot 97,56 \%}{0,6688 \text{ nm} \cdot 0,104080 \text{ g}} = 20,04 \% \quad (8.6.3)$$

Vzorec 4 :

$$\omega(\%aescin) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,5455 \text{ nm} \cdot 0,026165 \text{ g} \cdot 97,56 \%}{0,6688 \text{ nm} \cdot 0,106185 \text{ g}} = 19,61 \% \quad (8.6.4)$$

Vzorec 5 :

$$\omega(\%aescin) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,5431 \text{ nm} \cdot 0,026165 \text{ g} \cdot 97,56 \%}{0,6688 \text{ nm} \cdot 0,10501 \text{ g}} = 19,74 \% \quad (8.6.5)$$

Vzorec 6 :

$$\omega(\%aescin) = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot m_{\text{standarda}} \cdot \%std}{A_{\text{standarda}} \cdot m_{\text{vzorca}}} = \frac{0,5435 \text{ nm} \cdot 0,026165 \text{ g} \cdot 97,56 \%}{0,6688 \text{ nm} \cdot 0,10576 \text{ g}} = 19,61 \% \quad (8.6.6)$$

Tabela 8-8. Vsebnosti aescina za vmesno natančnost in obnovljivost

| VZOREC | $m_{\text{zatehte vzorca}}$ [mg] | A pri 540 nm [/] | ω (% aescin) [%] |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| 1 | 104,000 | 0,5502 | 20,19 |
| 2 | 104,585 | 0,5455 | 19,91 |
| 3 | 104,080 | 0,5466 | 20,04 |
| 4 | 106,185 | 0,5455 | 19,61 |
| 5 | 105,010 | 0,5431 | 19,74 |
| 6 | 105,760 | 0,5435 | 19,61 |
| referenčna raztopina | 0,026165 | 0,6688 | / |

8.7 Linearnost

Izračun masnih koncentracij referenčnih raztopin, ki smo si jih pripravljali z redčitvijo 1,005 g/L raztopine.

150 % referenčna raztopina :

$$\gamma_{\text{referenčna raztopina}} = \frac{1,005 \frac{\text{g}}{\text{L}} \cdot 150 \%}{200 \%} = 0,7538 \text{ g/L} \quad (8.7.1)$$

100 % referenčna raztopina :

$$\gamma_{\text{referenčna raztopina}} = \frac{1,005 \frac{\text{g}}{\text{L}} \cdot 100 \%}{200 \%} = 0,5025 \text{ g/L} \quad (8.7.2)$$

50 % referenčna raztopina :

$$\gamma_{\text{referenčna raztopina}} = \frac{1,005 \frac{\text{g}}{\text{L}} \cdot 50 \%}{200 \%} = 0,2513 \text{ g/L} \quad (8.7.3)$$

25 % referenčna raztopina :

$$\gamma_{\text{referenčna raztopina}} = \frac{1,005 \frac{\text{g}}{\text{L}} \cdot 25 \%}{200 \%} = 0,1256 \text{ g/L} \quad (8.7.4)$$

Izračun masnih koncentracij vzorcev

150 % raztopina vzorca :

$$\gamma_{\text{vzorca}} = \frac{4,3127 \frac{\text{g}}{\text{L}} \cdot 150 \%}{200 \%} = 3,2345 \text{ g/L} \quad (8.7.5)$$

100 % raztopina vzorca :

$$\gamma_{\text{vzorca}} = \frac{4,3127 \frac{\text{g}}{\text{L}} \cdot 100 \%}{200 \%} = 2,1564 \text{ g/L} \quad (8.7.6)$$

50 % raztopina vzorca :

$$\gamma_{\text{vzorca}} = \frac{4,3127 \frac{\text{g}}{\text{L}} \cdot 50 \%}{200 \%} = 1,0782 \text{ g/L} \quad (8.7.7)$$

25 % raztopina vzorca :

$$\gamma_{\text{vzorca}} = \frac{4,3127 \frac{\text{g}}{\text{L}} \cdot 25 \%}{200 \%} = 0,5391 \text{ g/L} \quad (8.7.8)$$

9 Življenjepis

Mojca Hraš

Državljanstvo: slovensko

☎ (+386) 40475596

Datum rojstva: 10/08/1997

Spol: Ženski

✉ E-naslov: hras.mojca@gmail.com

📍 Naslov : Ob potoku 27, 2327 Rače (Slovenija)

IZOBRAŽEVANJE IN USPOSABLJANJE

Diplomirana inženirka kemijske tehnologije
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo UM [2016 – Trenutno]

Naslov: Smetanova ulica 17, 2000 Maribor (Slovenija)
<https://www.fkkt.um.si/>

Gimnazijska maturantka
II. gimnazija Maribor [2012 – 2016]

Naslov: Trg Miloša Zidanška 1, 2000 Maribor (Slovenija)
<https://www.druga.si/>

DELOVNE IZKUŠNJE

Delo v laboratoriju (študentsko delo)
Vitiva d.d. [07/2020 – Trenutno]

Kraj: Markovci
Država: Slovenija

Delo v analiznem in mikrobiološkem laboratoriju.

Opravljanje študijske prakse
Vitiva d.d. [08/2019 – 09/2019]

Kraj: Markovci
Država: Slovenija

Delo v analiznem in mikrobiološkem laboratoriju.

Razna dijaška in študentska dela
[2013 – 2018]

JEZIKOVNO ZNANJE

Materni jezik/-i:

slovenščina

angleščina

SLUŠNO RAZUMEVANJE: C2

BRALNO RAZUMEVANJE: C2 RAZUMEVANJE: C2

GOVORNO SPOROČANJE: C2

GOVORNO SPORAZUMEVANJE: C2

nemščina

SLUŠNO RAZUMEVANJE: B2

BRALNO RAZUMEVANJE: B2 RAZUMEVANJE: B1

GOVORNO SPOROČANJE: B1

GOVORNO SPORAZUMEVANJE: B1