



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Mojca Hraš

**Pridobivanje produktov iz pegastega badlja (*Silybum
Marianum*)**

Magistrsko delo

Maribor, 2023



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Pridobivanje produktov iz pegastega badlja (*Silybum Marianum*)

Magistrsko delo študijskega programa II. Stopnje

Študentka:	Mojca Hraš
Študijski program:	magistrski študijski program II. stopnje Kemijsko inženirstvo
Predvideni strokovni naslov:	magistrica inženirka biokemijskega inženirstva
Mentorica:	red. prof. dr. Mojca Škerget, univ. dipl. inž. kem. teh.
Zunanji delovni somentorica:	dr. Majda Hadolin Kolar, univ. dipl. inž. kem. teh.

Maribor, 2023



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Kraj in datum: MARIBOR, 05.04.2022

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Uradni list RS, št. 41/2021-UPB13) izdajam

SKLEP O ZAKLJUČNEM DELU

MOJCA HRAŠ, študent/-ka študijskega programa 2. stopnje MAG KEMIJSKO INŽENIRSTVO, smer BIOKEMIJSKO INŽENIRSTVO, izpolnjuje predpisane pogoje in se mu/ji dovoljuje izdelati zaključno delo.

Tema zaključnega dela je pretežno s področja katedre/oddelka/inštituta: KATEDRA ZA KEMIJSKO TEHNOLOGIJO.

Mentorji:

red. prof. dr. MOJCA ŠKERGET, univ. dipl. inž. kem. tehnol., mentor/-ica
dr. MAJDA HADOLIN, univ. dipl. inž. kem. tehnol., somentor/-ica

Naslov zaključnega dela:
Pridobivanje produktov iz pegastega badlja (*Syllibum Marianum*)

Naslov zaključnega dela v angleškem jeziku:
Extraction of products from milk thistle (*Syllibum Marianum*)

Rok za izdelavo in oddajo zaključnega dela je 05.04.2023. Zaključno delo je potrebno izdelati skladno z navodili: *Predloge z navodili za pisanje zaključnega dela*, in ga oddati v pristojnem referatu članice. Število izvodov: 0. Hkrati se odda tudi izjava mentorja/-ice (in morebitne/-ga somentorja/-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:

- kandidata/-ko,
- mentorja/-ico,
- somentorja/-ico,
- arhiv.



red. prof. dr. Zdravko Kravanja, dekan

Zorka Novak Pintarič

Po pooblastilu dekana
prodekanica
red. prof. dr. Zorka Novak Pintarič

Kazalo

Kazalo.....	1
Izjava.....	3
Zahvala	4
Povzetek.....	5
Abstract.....	6
Seznam tabel.....	7
Seznam slik.....	9
Uporabljeni simboli in kratice	12
1 Uvod.....	15
2 Teoretični del.....	17
2.1 Pegasti badelj	17
2.2 Silimarin.....	18
2.3 Zgodovina in uporaba pegastega badlja.....	20
2.4 Olje pegastega badlja	22
2.5 Vitamin E.....	22
2.6 Fenolne spojine	23
2.7 Ogljikovi hidrati.....	24
2.8 DPPH radikalska metoda za določanje antioksidativne aktivnosti ekstraktov	25
3 Metode dela	27
3.1 Laboratorijske metode	27
3.1.1 Separacijske metode	27
3.1.2 Filtracija.....	29
3.1.3 Vakuusko uparjanje	31
3.1.4 Sušenje.....	32
3.1.5 Centrifugiranje.....	33
3.1.6 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.....	34
3.1.7 Plinska kromatografija.....	38
3.1.8 Spektrofotometrija	41
3.2 Design Expert.....	42
3.2.1 Box-Behnkenovo načrtovanje	43
3.3 Farmakopeja.....	44
4 Eksperimentalni del.....	45
4.1 Ekstrakcije.....	45
4.1.1 Ekstrakcija olj iz semen pegastega badlja	46
4.1.2 Določevanje optimalnega topila za ekstrakcijo silimarina	47
4.1.3 Optimizacija pogojev ekstrakcije silimarina iz hladno stiskanih semen s programom Design Expert	50
4.1.4 Ekstrakcija silimarina iz različno razmaščenega materiala pri optimalnih pogojih	52
4.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.....	54
4.2.1 Določanje vsebnosti silimarina v ekstraktih	54
4.2.2 Določevanje vsebnosti vitamina E v olju	56
4.3 Plinska kromatografija	57
4.3.1 Določevanje topil v oljih	57
4.4 Spektrofotometrične metode.....	58
4.4.1 Določevanje vsebnosti totalnih fenolov.....	58
4.4.2 Določevanje vsebnosti totalnih ogljikovih hidratov	61

4.4.3	DPPH radikalska aktivnost ekstraktov.....	63
5	Rezultati in diskusija.....	65
5.1	Olje pegastega badlja.....	65
5.1.1	Ekstrakcija olja.....	65
5.1.2	Vsebnost topil	66
5.1.3	Vsebnost vitamina E v oljih	67
5.2	Ekstrakt silimarina iz predhodno razmaščenih semen pegastega badlja.....	69
5.2.1	Izbira topila	69
5.2.2	Optimizacija pogojev ekstrakcije razmaščenih semen pegastega badlja z acetonom.....	71
5.2.3	Ekstrakcije različno razmaščenega materiala pri optimalnih pogojih	78
5.2.4	Vsebnost totalnih fenolov	80
5.2.5	Vsebnost ogljikovih hidratov	81
5.2.6	Določanje antioksidativne aktivnosti z DPPH radikalsko metodo	83
6	Zaključek	84
7	Literatura.....	86
8	Priloge.....	92
8.1	Ekstrakcija olja	92
8.2	Izbira topila za ekstrakcijo silimarina iz hladno stiskanega materiala	92
8.3	Optimizacija ekstrakcijskih pogojev za ekstrakcijo silimarina iz predhodno razmaščenega materiala s programom Design Expert 13	95
8.4	Ekstrakcije nerazmaščenega materiala in materiala razmaščenega na različne načine pri optimalnih pogojih.....	97
8.5	Vsebnost totalnih fenolov v ekstraktih silimarina, ekstrahiranih pri optimalnih pogojih.....	98
8.6	Vsebnost ogljikovih hidratov v ekstraktih silimarina, ekstrahiranih pri optimalnih pogojih.....	99
8.7	Določanje antioksidativne aktivnosti z DPPH radikalsko metodo v ekstraktih silimarina, ekstrahiranih pri optimalnih pogojih	101
	Izjava o avtorstvu zaključnega dela	102

Izjava

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

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

Gesla:	Število referenc
silymarin	5 799
milk thistle	4 347
vitamin E	450 535
HPLC	684 770
GC	682 330
DPPH	47 398
total polyphenols	86 172
carbohydrates	628 148

Vir: COBISS+ (<https://plus.si.cobiss.si/cobiss/si/sl/bib/search>)

Gesla:	Število referenc
pegasti badelj	37
tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	676
milk thistle	25
silybum marianum	34
silimarin	10

Vir: PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Gesla:	Število referenc
silymarin	4 303
milk thistle	1 221
vitamin E	46 785

Skupno število pregledanih člankov: 187

Skupno število pregledanih knjig: 14

Zahvala

Sprva bi se rada zahvalila svoji mentorici, red. prof. dr. Mojci Škerget, ki mi je bila vedno na voljo za pomoč.

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

Hvala tudi gospodu Davorinu Baumanu, ki mi je omogočil hladno stiskanje olja in mi pomagal s številnimi nasveti.

Mojim sodelavcem iz analiznega laboratorija podjetja Vitiva, d. o. o., hvala za vso pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela.

Zahvala gre seveda tudi samemu podjetju Vitiva, d. o. o., ki mi je omogočilo izvajanje magistrskega dela v njihovih prostorih in mi zagotovilo ves potreben material ter kemikalije.

Predvsem pa bi se rada zahvalila svojim staršem, prijateljem in fantu, ki so vedno verjeli vame in me spodbujali.

Hvala!

Pridobivanje produktov iz pegastega badlja (*Silybum Marianum*)

Povzetek

Pegasti badelj spada med eno najbolj cenjenih zdravilnih rastlin, ki se je razširila že skoraj po vsem svetu. V semenih pegastega badlja se skriva mešanica flavonolignanov, ki jih s skupnim imenom imenujemo silimarin.

Ekstrakcija silimarina iz pegastega badlja poteka v dveh stopnjah, saj semena vsebujejo tudi veliko maščob in jih je treba predhodno razmastiti. Razmaščevanje običajno poteka s pomočjo heksana. V tem magistrskem delu smo za razmaščevanje uporabili še druga topila in metodo hladnega stiskanja. V ekstrahiranih oljih smo določevali tudi vsebnost tokoferolov in topil. Kot pričakovano smo dokazali, da je metoda hladnega stiskanja najbolj ugodna, saj ohrani sestavo in kvaliteto olja ter je za zdravje in okolje najmanj škodljiva.

V nadaljevanju smo želeli optimirati ekstrakcijo silimarina iz razmaščenih semen. Najprej smo določili najboljše topilo, za katero se je izkazal aceton. Nato smo z računalniškim programom Design Expert določili optimalno temperaturo, čas ekstrakcije in razmerje topilo : material. Ugotovili smo, da se vsebnost silimarina s temperaturo niža, viša z višanjem razmerja topilo : material in da vsebnost začne padati po 11 urah ekstrakcije.

V ekstraktih smo določili tudi vsebnost ogljikovih hidratov, vsebnost totalnih fenolov in antioksidativno aktivnost. Predhodno smo predvideli, da bo ekstrakt pridobljen iz materiala, ki je bil predhodno razmaščen z metodo hladnega stiskanja, imel najboljše lastnosti in imel najvišjo antioksidativno aktivnost. To trditev smo v magistrskem delu tudi potrdili.

Ključne besede: pegasti badelj, olje, silimarin, optimizacija postopka ekstrakcije, Design Expert, antioksidativna aktivnost

UDK: 66.061.3:[633.88:582.991](043.2)

Obtaining products from milk thistle (*Silybum marianum*)

Abstract

Milk thistle belongs to one of the most valued medicinal plants and has already spread almost all over the world. The seeds of the milk thistle contain a mixture of flavonolignans, generally known as silymarin.

Generally the extraction of silymarin from milk thistle takes place in two stages, as the seeds also contains a lot of fats and must be previously defatted. Extraction of fats is usually done with hexane, while in this master's thesis, other solvents and the cold pressing method for degreasing were examined. In the extracted oil the content of tocopherols and solvents were determined. We proved that as expected the cold pressing method gives the best results, as it preserves the composition and quality of the oil and is the least harmful to human health and environment.

Furthermore, the aim was to optimize the extraction of silymarin from defatted seeds. First, we determined the best solvent, which proved to be acetone. Then the Design Expert 13 software was used to determine the optimal temperature, extraction time and solvent : material ratio. We found that the content of silymarin decreases with increasing temperature, increases with increasing solvent : material ratio and that the content starts to decrease after 11 hours of extraction.

The final extracts were analysed for carbohydrate content, total phenol content and antioxidant activity. It was expected, that the extract obtained from material, defatted by cold pressing would have the biggest content of silymarin and phenolic compounds and would possess the highest antioxidant activity. This claim was confirmed.

Key words: milk thistle, silymarin, oil, optimization of extraction, Design Expert, antioxidant activity

UDK: 66.061.3:[633.88:582.991](043.2)

Seznam tabel

Tabela 4-1. Osnovni fizikalni podatki uporabljenih topil za ekstrakcijo olja [99].	46
Tabela 4-2. Osnovni fizikalni podatki uporabljenih topil za ekstrakcijo silimarina [99].	48
Tabela 4-3. Ekstrakcijski načrt ekstrakcij silimarina z acetonom, iz predhodno stiskanih semen, programa Design Expert 13.	51
Tabela 4-4. Kodirane spremenljivke ekstrakcijskega načrta ekstrakcij silimarina z acetonom, iz predhodno stiskanih semen, ki nam jih je določil program Design Expert 13.	52
Tabela 5-1. Vsebnosti topil v oljih pegastega badlja, pridobljenih s tremi različnimi topili, pred in po termični obdelavi.	67
Tabela 5-2. Vsebnosti tokoferolov v oljih pegastega badlja, pridobljenih na različne načine, pred in po termični obdelavi.	68
Tabela 5-3. Pogoji ekstrakcij za ekstrakcije silimarina iz predhodno razmaščenih semen s hladnim stiskanjem, z acetonom, pri pogojih, ki jih je določil program Design Expert 13.	72
Tabela 5-4. Predlagan eksperimentalni načrt po Box-Behnken metodi in vsebnosti silimarina v ekstraktih: primerjava eksperimentalnih in izračunanih vrednosti s polinomom tretje stopnje.	75
Tabela 5-5. Vrednosti regresijskih koeficientov in analiza variance modela za vsebnost silimarina.	76
Tabela 8-1. Izračun izkoristkov ekstrakcij olja iz semen pegastega badlja.	92
Tabela 8-2. Izkoristki ekstrakcij silimarina, ekstrahiranih iz predhodno razmaščenih semen pegastega badlja s hladnim stiskanjem, z različnimi topili.	92
Tabela 8-3. Podatki o pikih, dobljenih za ekstrakcije silimarina iz predhodno razmaščenih semen, z metodo hladnega stiskanja, z različnimi topili.	93
Tabela 8-4. Vsebnosti komponent silimarina v ekstraktih, ekstrahiranih iz predhodno razmaščenih semen z metodo hladnega stiskanja, z različnimi topili.	94
Tabela 8-5. Vsebnosti komponent silimarina v ekstraktih, ekstrahiranih iz predhodno razmaščenih semen z metodo hladnega stiskanja, z različnimi topili, preračunanimi na suho snov.	94
Tabela 8-6. Izkoristki ekstrakcij predhodno razmaščenih semen pegastega badlja z metodo hladnega stiskanja, z acetonom, pri različnih pogojih, ki jih je določil program Design-Expert 13.	95
Tabela 8-7. Podatki o pikih za ekstrakcije silimarina, ekstrahirane iz predhodno razmaščenih semen pegastega badlja z metodo hladnega stiskanja, pri različnih pogojih, ki jih je določil program Design-Expert 13.	95
Tabela 8-8. Vsebnosti silimarina v ekstraktih, ekstrahiranih iz predhodno razmaščenih semen pegastega badlja z metodo hladnega stiskanja, z acetonom, pri različnih pogojih, ki jih je določil program Design-Expert 13.	96
Tabela 8-9. Vsebnosti silimarina v ekstraktih, ekstrahiranih iz predhodno razmaščenih semen pegastega badlja z metodo hladnega stiskanja, z acetonom, pri različnih pogojih, ki jih je določil program Design-Expert 13, preračunane na suho snov.	96
Tabela 8-10. Izkoristki ekstrakcij silimarina iz nerazmaščenih in predhodno razmaščenih semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih.	97
Tabela 8-11. Vsebnosti silimarina v ekstraktih, ekstrahiranih iz nerazmaščenih in razmaščenih semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih.	97

Tabela 8-12. Vsebnosti silimarina v ekstraktih, ekstrahiranih iz nerazmaščenih in razmaščenih semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih, preračunani na suho snov.....	98
Tabela 8-13. Podatki za preračun vsebnosti totalnih fenolov v ekstraktih, ekstrahiranih iz nerazmaščenih in razmaščenih semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih.	98
Tabela 8-14. Vsebnosti totalnih polifenolov v vzorcih, ekstrahiranih iz nerazmaščenih in razmaščenih semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih..	99
Tabela 8-15. Podatki za preračun totalnih ogljikovih hidratov, ekstrahiranih iz nerazmaščenih in razmaščenih semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih..	99
Tabela 8-16. Vsebnosti totalnih ogljikovih hidratov v vzorcih, ekstrahiranih iz nerazmaščenih in razmaščenih semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih..	100
Tabela 8-17. Rezultati antioksidativne aktivnosti v vzorcih, ekstrahiranih iz nerazmaščenih in razmaščenih semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom pri optimalnih pogojih..	101

Seznam slik

Slika 2-1. Razširjenost pegastega badlja po Evropi [6].	17
Slika 2-2. Cvetovi in semena pegastega badlja [15].	18
Slika 2-3. Nastajanje silimarina. Povzeto po [17].	19
Slika 2-4. Komponente silimarina. Povzeto po [17].	20
Slika 2-5. Molekula α tokoferola [27].	23
Slika 2-6. Reakcija Folin-Ciocalteu reagenta pri določanju totalnih polifenolov. Povzeto po [38].	24
Slika 2-7. Fenol-žveplova metoda za analiziranje vsebnosti ogljikovih hidratov. Povzeto po [42].	25
Slika 2-8. Molekula DPPH [44].	26
Slika 2-9. Reakcija DPPH z antioksidantom [47].	26
Slika 3-1. Stroj za hladno stiskanje olja [50].	28
Slika 3-2. Gravitacijska filtracija. Povzeto po [59].	30
Slika 3-3. Vakuumska filtracija. Povzeto po [60].	31
Slika 3-4. Merilnik vlage Mettler Toledo HX204.	33
Slika 3-5. Centrifugiranje. Povzeto po [77].	34
Slika 3-6. Centrifuga NeoLab 3-1810.	34
Slika 3-7. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti. Povzeto po [79].	35
Slika 3-8. Ločevanje komponent v HPLC koloni. Povzeto po [81].	36
Slika 3-9. UPLC Waters Aquity.	37
Slika 3-10. HPLC Agilent 1200.	37
Slika 3-11. Sestava plinskega kromatografa. Povzeto po [86].	38
Slika 3-12. Plinski kromatograf Agilent 7890A.	40
Slika 3-13. UV/VIS spektrofotometrija. Povzeto po [89].	41
Slika 3-14. Spektrofotometer Perkin Elmer Lambda 25.	42
Slika 3-15. Box-Behnkenov načrt za tri neznanke [92].	43
Slika 4-1. Načrt eksperimentalnega dela.	45
Slika 4-2. Semena pegastega badlja.	47
Slika 4-3. Potek ekstrakcije: a) vakuumsko filtriranje razmaščenih semen, b) vakuumsko uparjanje vzorcev.	49
Slika 4-4. Izgled vzorca: a) pred uparjanjem, b) po vakuumskem uparjanju, c) kristali v bučki po vakuumskem uparjanju.	49
Slika 4-5. Material, uporabljen za ekstrakcijo silimarina z acetonom pri optimalnih pogojih: a) semena, razmaščena s heksanom, b) semena razmaščena s hladnim stiskanjem.	53
Slika 4-6. HPLC kromatogram silimarina.	55
Slika 4-7. Vzorci standardnih raztopin galne kisline za pripravo za umeritvene krivulje za analizo totalnih fenolov.	59
Slika 4-8. Umeritvena krivulja za totalne polifenole.	60
Slika 4-9. Vzorci ekstraktov silimarina, v katerih smo določili vsebnost totalnih fenolov....	60

Slika 4-10. Vzorci standardnih raztopin glukoze za pripravo umeritvene krivulje za določevanje vsebnosti totalnih ogljikovih hidratov.	62
Slika 4-11. Umeritvena krivulja za totalne ogljikove hidrate.	62
Slika 4-12. Vzorci ekstraktov silimarina, v katerih smo določili vsebnost totalnih ogljikovih hidratov.	63
Slika 4-13. Vzorci ekstraktov silimarina za določitev radikalske aktivnosti z DPPH metodo.	64
Slika 5-1. Olje pegastega badlja ekstrahirano z: 1 – heksanom, 2 – cikloheksanom, 3 – etil acetatom, 4 – hladnim stiskanjem.	65
Slika 5-2. Izkoristki ekstrakcije olja iz semen pegastega badlja v odvisnosti od načina razmaščevanja.	66
Slika 5-3. Vsebnosti tokoferolov v oljih pegastega badlja, pridobljenih na različne načine, pred termično obdelavo.	67
Slika 5-4. Posušeni ekstrakti silimarina, ekstrahirani z različnimi topili: 1 – acetonom, 2 – etanolom, 3 – metanolom, 4 – 2-propanolom, 5 – acetonitrilom in 6 – etil acetatom.	69
Slika 5-5. Izkoristki ekstrakcij predhodno razmaščenih semen pegastega badlja s hladnim stiskanjem, v odvisnosti od uporabljenega topila, preračunani glede na dobljeno količino olja in trdnega ekstrakta.	69
Slika 5-6. Izkoristki ekstrakcij predhodno razmaščenih semen pegastega badlja s hladnim stiskanjem, v odvisnosti od uporabljenega topila, preračunani glede na količino trdnega ekstrakta.	70
Slika 5-7. Vsebnosti silimarina v ekstraktih, dobljenimi z različnimi topili, iz razmaščenih semen pegastega badlja s hladnim stiskanjem pri pogojih: razmerje topilo : material = 3 mL/g, T = sobna temperatura, t = 8h.	71
Slika 5-8. Ekstrakti silimarina iz hladno stiskanih semen, pridobljeni z acetonom, ekstrahirani po določenem ekstrakcijskem načrtu programa Design Expert 13 (tabela 5-3).	72
Slika 5-9. Izkoristki ekstrakcij silimarina, iz predhodno razmaščenih semen pegastega badlja s hladnim stiskanjem, izvedenih z acetonom, v odvisnosti od pogojev ekstrakcije (razmerje topilo : material, temperatura, čas ekstrakcije), podani na dobljeno količino olja in trdnega ekstrakta.	73
Slika 5-10. Izkoristki ekstrakcij silimarina, iz predhodno razmaščenih semen pegastega badlja s hladnim stiskanjem, izvedenih z acetonom, v odvisnosti od pogojev ekstrakcije (razmerje topilo : material, temperatura, čas ekstrakcije), podani na dobljeno količino trdnega ekstrakta.	73
Slika 5-11. Vsebnosti komponent silimarina v ekstraktih, pridobljenih z acetonom, iz predhodno razmaščenih semen pri različnih ekstrakcijskih pogojih (razmerje topilo : material, temperatura, čas ekstrakcije).	74
Slika 5-12. Vpliv temperature, razmerja topilo : material in časa ekstrakcije na vsebnost silimarina.	77
Slika 5-13. Tridimenzionalna odzivna površina modela za določanje vsebnosti silimarina v ekstraktih pri razmerju topilo : material = 4 mL/g.	77
Slika 5-14. Ekstrakti silimarina po optimirani ekstrakciji z acetonom iz semen pegastega badlja, ki so bila razmaščena na različne načine: 1 – s heksanom, 2 – s cikloheksanom, 3 – z etil acetatom, 4 – s hladnim stiskanjem in 5 – semena, ki predhodno niso bila razmaščena.	78

Slika 5-15. Izkoristki ekstrakcij predhodno razmaščenih semen pegastega badlja (s hladnim stiskanjem in s tremi različnimi topili) in nerazmaščenih semen, izvedenih z acetonom, pri optimalnih pogojih, podani na dobljeno količino olja in trdnega ekstrakta.	78
Slika 5-16. Izkoristki ekstrakcij predhodno razmaščenih semen pegastega badlja (s hladnim stiskanjem in s tremi različnimi topili) in nerazmaščenih semen, izvedenih z acetonom, pri optimalnih pogojih, podani na dobljeno količino trdnega ekstrakta.....	79
Slika 5-17. Vsebnosti silimarina v ekstraktih, dobljenih z ekstrakcijo z acetonom, pri optimalnih pogojih, iz materiala, ki je bil predhodno razmaščen z različnimi topili, hladno stiskan in iz nerazmaščenega materiala.	79
Slika 5-18. Količina izoliranih polifenolov v ekstraktih silimarina, ekstrahiranih z acetonom, pri optimalnih pogojih, iz nerazmaščenih semen pegastega badlja in iz semen razmaščenih na različne načine.	80
Slika 5-19. Količina izoliranih polifenolov na enoto mase materiala, ki je bil uporabljen za ekstrakcijo silimarina.....	81
Slika 5-20. Količina izoliranih ogljikovih hidratov v ekstraktih silimarina, ekstrahiranih z acetonom, pri optimalnih pogojih, iz nerazmaščenih semen pegastega badlja in iz semen razmaščenih na različne načine.	82
Slika 5-21. Količina izoliranih ogljikovih hidratov na enoto mase materiala, ki je bil uporabljen za ekstrakcijo silimarina.	82
Slika 5-22. Antioksidativna aktivnost končnih ekstraktov.	83
Slika 6-1. Predlagan diagram poteka ekstrakcije silimarina in olja pegastega badlja.	85

Uporabljeni simboli in kratice

Simboli

$\%$ tokoferolov	seštevek vseh tokoferolov (%)
$\%$ totalni silimarin eksp.	eksperimentalno določena vsebnost silimarina (%)
$\%$ totalni silimarin izr.	izračunana vsebnost silimarina (%)
$\%$ α tokoferolov	vsebnost α tokoferola (%)
$\%$ γ tokoferolov	vsebnost γ tokoferola (%)
$\%$ δ tokoferolov	vsebnost δ tokoferola (%)
$\%$ silibinina A + silibinina B	vsebnost silibinina A in silibinina B (%)
$\%$ totalnega silimarina	vsebnost totalnega silimarina (%)
$\%$ $_{SS}$	odstotek suhe snovi v vzorcu (%)
$\%$ izosilibinina A + izosilibinina B	vsebnost izosilibinina A in izosilibinina B (%)
$\%$ silikristina + silidianina	vsebnost silikristina in silidianina (%)
$\%$ $_{std}$	čistost standarda (%)
$\%$ tokoferola	vsebnost posameznega tokoferola (%)
$\%$ totalni silimarin SS	vsebnost totalnega silimarina preračunana na suho snov (%)
$\%$ totalni silimarin eksp.	vsebnost totalnega silimarina, določena eksperimentalno (%)
$\%$ totalni silimarin izr.	izračunana vsebnost totalnega silimarina (%)
A_{490}	absorbanca raztopine vzorca pri valovni dolžini 490 nm (/)
A_{760}	absorbanca raztopine vzorca pri valovni dolžini 760 nm (/)
A_{ref}^0	absorbanca referenčne raztopine v času 0 minut
A_{std}	površina standarda posameznega tokoferola
A_{vz}^{15}	absorbanca vzorca v času 15 minut
A_{vzorca}	površina pika vzorca
$V_{raztopine}$	volumen raztopine vzorca (ml)
C_{topila}	koncentracija posameznega topila (ppm)
m_b	masa bučke (g)
m_{b+o}	masa bučke in olja po uparjanju (g)
$m_{b+o+ekstr}$	masa bučke, ekstrahiranega olja in trdnega ekstrakta (g)
m_{ekstr}	masa trdnega ekstrakta (g)
m_o	masa ekstrahiranega olja (g)
$m_{o+ekstr}$	masa ekstrahiranega olja in trdnega ekstrakta (g)
$m_{razmaščenih\ semen}$	masa zatehtanih razmaščenih semen pegastega badlja za ekstrakcijo silimarina (g)
m_{semen}	masa zatehtanih semen za ekstrakcijo olja (g)
m_{std}	masa standarda (mg)
m_v	masa vial (g)
$m_{v+ekstr}$	masa vial in trdnega ekstrakta (g)
$m_{zatehte}$	masa zatehtanega vzorca (g)
η_{ekstr}	izkoristek ekstrakcije glede na količino ekstrahiranega trdnega ekstrakta (%)

$\eta_{o+ekstr}$	izkoristek ekstrakcije glede na količino ekstrahiranega olja in trdnega ekstrakta (%)
A	površina posameznega pika
A_1	območje pika silikristina testne raztopine
A_2	območje pika silidianina testne raztopine
A_3	območje pika silibinina A testne raztopine
A_4	območje pika silibinina B testne raztopine
A_5	območje pika isosilbinina A testne raztopine
A_6	območje pika isosilbinina B testne raztopine
A_7	območje pika silibinina A standardne raztopine
A_8	območje pika silibinina B standardne raztopine
b	koncentracija, pri kateri umeritvena premica seka ordinatno os
c	koncentracija določenega topila (ppm)
k	naklon umeritvene krivulje (mL/mg)
m_1	masa zatehtanega standarda (g)
m_2	masa zatehtanega ekstrakta (g)
n	odsek premice umeritvene krivulje na y osi (/)
p	odstotek standarda (%)
t	čas (h)
T	temperatura (°C)
$T_{vrel.}$	temperatura vrelišča (°C)
X_1	temperatura
X_2	čas ekstrakcije
X_3	razmerje topilo : topljenec
a	naklon umeritvene premice za izbrano topilo
η	izkoristek ekstrakcije (%)

Grški simboli

$\%_{GL}$ v ekstraktu	vsebnost ogljikovih hidratov v ekstraktu (%)
γ_{GA} vzorec	koncentracija galne kisline v vzorcu (mg/mL)
γ_{GA}	koncentracija galne kisline v raztopini vzorca (mg/mL)
γ_{GL} vzorec	koncentracija glukoze v vzorcu (mg/mL)
γ_{GL}	koncentracija glukoze v raztopini vzorca (mg/mL)
γ_{vzorec}	koncentracija ekstrakta (mg/mL)
η_{ekstr}	izkoristek, preračunan glede na dobljeno količino ekstrakta (%)
$\eta_{o+ekstr}$	izkoristek, preračunan glede na dobljeno količino olja in ekstrakta (%)
ω_{GL} ekstrakt	vsebnost ogljikovih hidratov v ekstraktu (mg GL/g ekstrakta)
ω_{GL} material	vsebnost ogljikovih hidratov v materialu (mg GL/g materiala)
ϵ	dielektrična konstanta (As/Vm)
ρ	gostota (g/mL)
η	izkoristek (%)

Kratice

DNK	deoksiribonukleinska kislina
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EMA	Evropska medicinska agencija
FID	plamensko-ionizacijski detektor
GA	galna kislina
GC	plinska kromatografija
GL	glukoza
GMP	dobra proizvodna praksa
H ₂ SO ₄	žveplova kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IR	infrardeča svetloba
Na ₂ CO ₃	natrijev karbonat
TLC	tankoslojna kromatografija
UPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti
UV	ultravijolična svetloba
VIS	vidna svetloba

1 Uvod

Pegasti badelj (*Silybum Marianum*) je pomembna zdravilna rastlina, ki farmacevtski industriji prinaša veliko dobička. Že v stari Grčiji so jo pogosto omenjali in uporabljali za zdravljenje najrazličnejših bolezni. Zaradi velikega zanimanja je bilo izvedenih veliko študij glede uporabe in delovanja pegastega badlja. Precej zanimanja je vzbudil v zadnjih 30. letih, ko so začeli promovirati njegovo hepaprotektivno delovanje. Deluje antioksidativno in antiinflamatorno. Pozitivno naj bi vplival tudi na bolnike z diabetesom tipa 2, preprečeval nevrološke bolezni, zniževal holesterol, uporablja pa se tudi kot podporna terapija pri bolnikih z nekaterimi vrstami raka [1, 2, 3].

Pegasti badelj je znan po značilnem vijoličnem cvetu in bodečih listih z belimi madeži. Izvira iz Sredozemlja, vendar se je razširil skoraj po vsem svetu. Veliko držav ga tudi načrtno goji, ravno zaradi njegovega medicinskega pomena. Čeprav so v zgodovini v medicinske namene uporabljali celotno rastlino s koreninami vred, so sodobne študije pokazale, da se večina aktivne učinkovine nahaja v semenih. Ta aktivna učinkovina se imenuje silimarín in je mešanica različnih flavonolignanov [4, 5].

Silimarín je torej mešanica derivatov flavona, sestavljena iz: silidianina, ki predstavlja največji del mešanice in njegovih diastereoizomerov: silikristina ter silibina in izosilibina, ki obstajata v dveh oblikah – A in B. Poleg silimarína se v semenih nahajajo še maščobe (20–30 %), tokoferoli, steroli, beljakovine, sluz in flavonoidi. Ravno zaradi velike vsebnosti lipidov je ekstrakcija silimarína zahtevnejša in se običajno izvaja v dveh stopnjah. V prvi iz semen odstranimo maščobe oziroma olje, v drugi pa ekstrahiramo aktivno učinkovino [1, 6].

Olje pegastega badlja vsebuje esencialne maščobne kisline, sterole in nekaj tokoferolov ter je po sestavi in lastnostih zelo podobno sončničnemu ali bučnemu olju. Pri ekstrakciji silimarína je olje včasih predstavljalo samo stranski produkt, velikokrat pa so ga tudi zavrgli. Zaradi tokoferolov in sterolov, ki se nahajajo v njem, pa dobiva olje pegastega badlja vedno večji medicinski pomen. Precej cenjeni so namreč tokoferoli, ki so naravnega izvora in jih telo dobi z živili. Tokoferoli so namreč pomembni antioksidanti, ki imajo blagodejen vpliv na zdravje [7, 8].

Ekstrakcija olja iz semen se v industriji izvaja s pomočjo nepolarnih topil, najpogosteje s heksanom, ki pa je za zdravje precej škodljiv. Kar nekaj ga ostane v olju, zato ga nato odstranjujejo s pomočjo visokih temperatur, ki pa običajno razgradijo aktivne učinkovine v olju.

V tem magistrskem delu smo raziskali uporabo še nekaterih drugih topil za ekstrakcijo olj, ki so za zdravje manj nevarna kot heksan, poskusili pa smo olje ekstrahirati tudi z metodo hladnega stiskanja, ki je zdravju najbolj prijazen način, saj ohrani tudi aktivne učinkovine ter s tem zdravilne učinke olja. V različno pridobljenih oljih smo analizirali vsebnost tokoferolov in s tem ugotavljali, kateri način razmaščevanja je najboljši in kako temperaturna obdelava olj vpliva na vsebnost tokoferolov. V olju, pridobljenem s topili, smo preverjali tudi vsebnost topil in kako se ta zmanjšujejo z izpostavitvijo visokim temperaturam [9].

Po farmakopeji se lahko za ekstrakcijo silimarína iz razmaščenih semen uporabljajo kar tri različna topila: aceton, metanol in etanol. Poleg teh smo v naši raziskavi vključili tudi nekatera druga topila in določili tisto, ki je dalo največji odstotek silimarína v ekstrahiranih, nato pa smo postopek ekstrakcije optimirali s programom Design Expert 13 za to topilo. Uporabili smo Box-Behnkenov način načrtovanja.

S programom Design Expert 13 smo poskusili poiskati najbolj optimalno temperaturo, čas ekstrakcije in razmerje topilo : material, pri katerem dobimo največjo vsebnost silimarína v ekstraktu. Z optimalnim topilom in pri optimalnih pogojih smo nato izvedli ekstrakcijo

materiala, predhodno razmaščenega z različnimi topili oziroma s hladnim stiskanjem. Na končnih produktih smo preverili vsebnost silimarina, antioksidativno aktivnost, vsebnost fenolov in vsebnost ogljikovih hidratov. Ko smo združili rezultate teh analiz, smo dobili najboljšo kombinacijo ekstrakcije olja in ekstrakcije aktivne učinkovine.

Pri delu smo si veliko pomagali z metodami iz evropske farmakopeje in z internimi metodami podjetja Vitiva, d. o. o., kjer smo opravljali naš eksperimentalni del. Vsebnost silimarina in tokoferolov smo določali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, vsebnost topil s plinsko kromatografijo, vsebnost totalnih polifenolov, ogljikovih hidratov in antioksidativno aktivnost pa z UV/VIS spektrofotometrom.

2 Teoretični del

Pegasti badelj je precej priljubljena zdravilna rastlina. V nadaljevanju so opisane njegove značilnosti, uporaba in zgodovina, značilnosti aktivne komponente, ki jo iz pegastega badlja ekstrahiramo in sestava olja pegastega badlja. Opisani so tudi ogljikovi hidrati, fenoli in antioksidativna aktivnost, ki smo jih analizirali v končnih ekstraktih.

2.1 Pegasti badelj

Pegasti badelj (*Silybum Marianum*) je rastlina, ki jo uvrščamo v družino nebinovk in je zelo pomembna v farmacevtski industriji. Izvira iz Sredozemlja, vendar se je razširila že skoraj po vsem svetu. Sprva je rasla v južni Evropi, severni Afriki, južni Rusiji in Iranu, sedaj pa raste tudi v Indiji, na Kitajskem, v Afriki, Ameriki in Avstraliji. Raste tudi na jugu Slovenije [1, 4, 10].

Zaradi velikega povpraševanja po pegastem badlju v farmacevtski industriji ga veliko držav načrtno goji v velikem obsegu. Med njegove glavne pridelovalke spadajo Argentina, Kitajska, v Evropi pa Romunija, Nemčija, Slovaška in Madžarska. Ponekod ga zaradi njegove divje rasti uvrščajo med problematičen plevel, saj se hitro razraste po zapuščenih travnikih, njivah in ob cestah. Je zelo invazivna rastlina, ki raste v gostih nasadih in prevladuje nad drugimi rastlinami, jim odvzema vodo, sončno svetlobo in hranila ter tako uničuje ekosisteme. Čeprav mu najbolj ustreza topla in suha prst, lahko uspeva v veliko različnih tipih prsti, saj je zelo prilagodljiv [6, 11].

Na sliki 2-1 lahko vidimo razširjenost pegastega badlja po Evropi. S temno sivo barvo so označene države, kjer pegasti badelj naravno uspeva, s sivo države, kjer se je rastlina naselila načrtno, z belo pa so označene države, ki se ukvarjajo z gojenjem pegastega badlja v velikem obsegu za potrebe farmacevtske industrije [5].



Slika 2-1. Razširjenost pegastega badlja po Evropi [6].

Kot omenjeno, odlično uspeva v suhi zemlji in v toplem ozračju. Cveti od junija do septembra. Običajno zraste od 0,9 do 1,8 m visoko, odvisno od pogojev rasti. Zraste lahko tudi do 3 m v višino in 1 m široko, prepoznamo pa ga po značilnem vijoličnem cvetu in bodečih listih, ki imajo značilne bele madeže. Od tod izvira tudi njegovo angleško ime Milk Thistle (mlečni badelj), saj naj bi beli madeži v zgodbah predstavljali mleko. Njegovi listi so veliki med 50 in 60 cm v dolžino, izmenjujoče rastejo po pokončnem, znotraj votlem stebelu in se razlikujejo od tistih, ki rastejo neposredno okoli cveta. Listi okoli 5–8 cm velikega vijoličnega cveta so veliko manjši in bodeči. Njegova semena so sivkasto-rjava, velika med 6 in 8 mm. Vsak cvet

proizvede okoli 100 semen, ena rastlina pa ima okoli 10–50 cvetov, kar v povprečju pomeni, da iz ene rastline dobimo okoli 3000 semen [5, 12, 13, 14].

Kako je videti cvet in semena pegastega badlja, lahko vidimo na sliki 2-2.



Slika 2-2. Cvetovi in semena pegastega badlja [15].

V medicinske namene se uporablja že okoli 2000 let, vendar pred letom 1950 ni bil deležen večje pozornosti raziskovalcev. Leta 1952 so v plodovih pegastega badlja odkrili derivate flavona, kar je spodbudilo raziskave, katerih cilj je bil izolirati in identificirati njegove sestavine. Sklepali so, da so derivati flavona aktivne učinkovine, ki dajejo pegastemu badlju medicinski pomen. Derivati flavona se imenujejo flavonolignani in so bili prvič odkriti prav v semenih pegastega badlja ter predstavljajo spojine, kjer je flavonoidni del molekule spojen z lignanom – fenilpropanom. Mešanico flavonolignanov, ki je bila odkrita v semenih pegastega badlja, so poimenovali silimarin [1, 6].

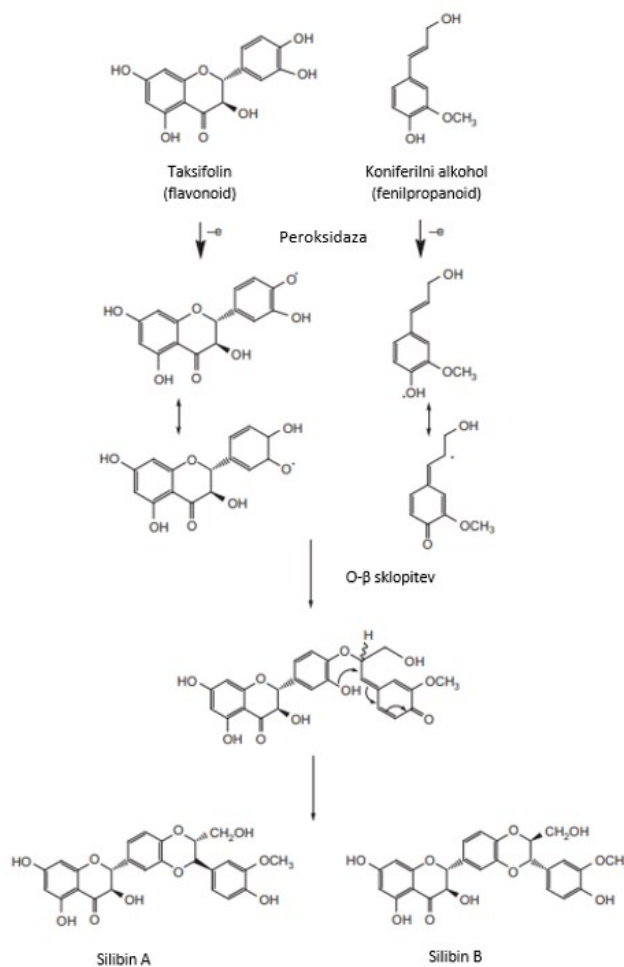
2.2 Silimarin

Leta 1968 je nemški kemik Hildebert Wagner iz plodov prvič uspešno izoliral spojino, ki so jo imenovali silimarin, kasneje pa je bila opisana kot mešanica različnih flavonolignanov. Ekstrakt, ki ga ekstrahiramo iz semen pegastega badlja, običajno vsebuje med 30 in 65 % silimarina, vsebnosti pa se razlikujejo zaradi različnih razmer, pri katerih rastlina raste, in zaradi različnih načinov obdelave. Njegove glavne sestavine so izomerne spojine: silidianin, silikristin ter silibin in izosilibin, slednji pa obstajata v obliki dveh diastereoizomerov – A in B. Molska masa vsake komponente znaša 482,4 g/mol in ima molekulska formulo $C_{25}H_{22}O_{10}$ [1, 2].

Poleg silimarina so v semenih še maščobe (20–30 %), od tega približno 60 % linolne kisline, 30 % oleinske kisline in 9 % palmitinske kisline, beljakovine (25–30 %), tokoferoli (okoli 0,038 %), steroli (okoli 0,63 %), nekaj sluzi in tudi nekateri flavonoidi – taksifolin, kvercetin in dihidrokempferol [1, 2, 6].

Sinteza flavonolignanov, ki sestavljajo silimarin, poteka z oksidativno sklopitvijo, ki jo katalizira encim peroksidaza med flavonoidom, v tem primeru taksifolinom in fenilpropanoidom – koniferil alkoholom. Oksidativna sklopitev v pegastem badlju ni ne regionalno, ne enantioselektivna [2, 16].

Potek sinteze silimarina je prikazan na sliki 2-3.



Slika 2-3. Nastajanje silimarina. Povzeto po [17].

Silibinin oziroma silibin je količinsko najbolj zastopan flavonolignan v mešanici, imenovani silimarin. Sestavlja približno od 50 do 60 % mešanice in obstaja v dveh oblikah: silibinin A in silibinin B, ki nastajata v približno ekvimolarnem razmerju. Kemijsko gre za (2R,3R)-3,5,7-trihidroksi-2-[(2R,3R)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-2-hidroksimetil-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il]-2,3-dihidrokromen-4-on.

Poleg silibina najdemo v plodovih okoli 5 % podobne diastereoizomerne mešanice – izosilibina A in izosilibina B, ki sta regioizomera silibina A in B. Silibin in izosilibin sta oba diastereoizomera, ki imata enako razporeditev na ogljikovih atomih številka 2 in 3, ampak zamenjani razporeditvi na ogljikovih atomih na mestih 2' in 3'. Kemijsko je izosilibin (2R,3R)-3,5,7-trihidroksi-2-[(2R,3R)-2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-3-hidroksimetil-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il]-2,3-dihidrokromen-4-on.

Poleg silibina in izosilibina med silimarin uvrščamo še tri flavonolignane, ki so strukturni izomeri prej omenjenih komponent.

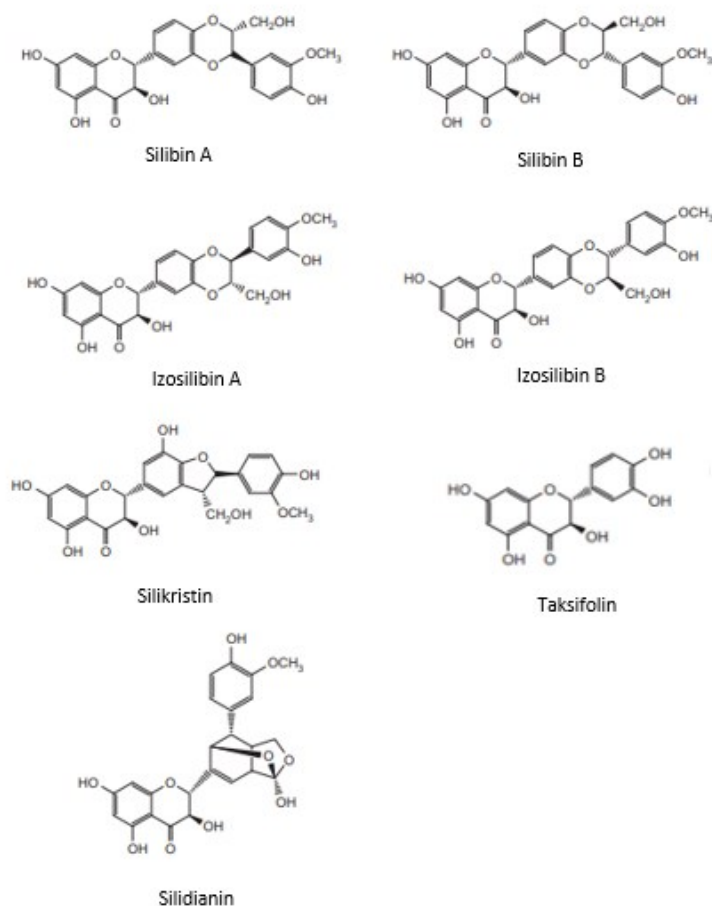
V mešanici se v okoli 10 % nahaja silidianin. Kemijsko je silidianin 2,3,3,7-tetrahidro-7-hidroksi-8-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-4-(3,5,7-trihidroksi-4-okso-2-kromanil)-3,6-metanobenzofuran-7-on. Od silibina se razlikuje v tem, da je stranska veriga koniferilnega alkohola nekoliko drugače pripojena na taksifolin.

Drugi količinsko najbolj zastopan flavonolignan v pegastem badlju je silikristin, ki ga je v mešanici okoli 20 %. Za silikristin je značilna kumaranska vez med fenilkromanonskim delom molekule in koniferilnim alkoholom. Gre za (2R,3R)-3,5,7-trihidroksi-2-[(2R,3S)-7-hidroksi-

2-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-3-(trihidroksimetil)-2,3-dihidro-1-benzofuran-5-il]-2,3-dihidro-kromen-4-on.

V mešanici silimarina najdemo še nekatere druge flavonolignane: silimonin, izosilikristin, izosilibinin C, izosilibin D, silandrin in podobne, vendar so njihove količine zanemarljive. Nekateri pod termin silimarin uvrščajo poleg flavonolignanov tudi flavonoid taksifolin [1, 2, 6, 18].

Na sliki 2-4 lahko vidimo vse komponente, ki jih s skupnim imenom imenujemo silimarin.



Slika 2-4. Komponente silimarina. Povzeto po [17].

Ekstrakcija silimarina iz semen pegastega badlja je zaradi visoke vsebnosti lipidov (20–30 %) zahtevnejša. Po farmakopeji je priporočena ekstrakcija v dveh delih: najprej je treba semena razmastiti, običajno z nepolarnimi topili, nato pa je treba silimarin ekstrahirati s pomočjo bolj polarnih topil. Za njegovo identifikacijo se uporabljata tankoslojna kromatografija – TLC in tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti – HPLC. Uporablja se lahko tudi spektrofotometrična metoda, ki pa ni tako natančna [5, 18].

2.3 Zgodovina in uporaba pegastega badlja

Pegasti badelj je zelo stara zdravilna rastlina. O njegovi moči je pisal rimski pisec Plinij, v stari Grčiji pa je bil pegasti badelj pogosto omenjen kot zdravilo pri pikih insektov in kač. V 16. stoletju ga omenjajo kot zdravilo proti depresiji in čustvenim stiskam. Nekateri so celo

verjeli, da lahko pozdravi kugo. Že takrat so ga uporabljali tudi za zdravljenje bolezni jeter in vranice. Takrat so ljudje zaužili vse dele rastline, tudi korenine, saj so sklepali, da vsebuje aktivne učinkovine celotna rastlina [3, 19].

Zaradi velikega zanimanja za njegov zdravilni učinek je bilo predvsem v zadnjih 30. letih izvedenih veliko študij glede njegove uporabe. Dandanes se v medicinske namene uporabljajo predvsem njegova semena oziroma standardizirani pripravki iz semen, ki v velikih količinah vsebujejo silimarin, ki naj bi bil nosilec zdravilnih lastnosti. Najbolj znan in uporabljen je za zdravljenje bolezni jeter. Prvič se je v te namene množično promoviral pred približno 45 leti, ko so ga v Nemčiji uporabljali za zdravljenje kroničnega hepatitisa. Znano je tudi, da ima silimarin antioksidativne, protivirusne in protivnetne lastnosti [2].

Njegovo hepaprotektivno delovanje izvira iz zmožnosti, da lahko ščiti pred zastrupitvami in vnetji jeter, stimulira njihovo obnovo ter inhibira vnetne procese, ki nastajajo zaradi infekcij, uporabe agresivnih zdravil ali pretiranega pitja alkohola. Preprečuje lahko tudi zastrupitve z nekaterimi vrstami gob, med drugim tudi z zeleno mušnico, saj ščiti jetra pred nekaterimi strupi, na primer amatoksinom. Velikokrat ga uporabljajo kot dodatno terapijo pri ljudeh, ki trpijo za okvarami jeter, hepatitisom in tudi rakom na jetrih. Veliko študij je ugotovilo, da se delovanje jeter izboljša ob zdravljenju s pegastim badljem. Študije navajajo tudi, da naj bi se življenjska doba ljudi, ki trpijo za cirozo jeter, podaljšala, če so jemali prehranske dodatke na osnovi pegastega badlja oziroma silimarina. Čeprav je potrebnih še veliko študij, ki bodo natančno opisale, kako silimarin vpliva na jetra, se sklepa, da zmanjšuje poškodbe jeter, ki nastajajo zaradi prostih radikalov, ki se proizvajajo, kadar jetra presnavljajo toksične substance. Pegasti badelj naj bi lovil ravno te proste radikale. Potrebne so še tudi študije, ki bodo določile točne odmerke in čas trajanja terapij.

Pegasti badelj se lahko uporablja tudi kot dodatna terapija pri ljudeh, ki imajo diabetes tipa 2. Zniževal naj bi krvni sladkor in povečeval učinke delovanja inzulina. Zaradi njegovih antioksidativnih in protivnetnih lastnosti naj bi tudi varoval pred pojavom zapletov zaradi diabetesa, kot so na primer bolezni jeter.

Njegova antioksidativna aktivnost naj bi pripomogla tudi k boju proti raku in naj bi blažila stranske učinke ljudem, ki prejemajo terapije za zdravljenje raka, kot so obsevanje, kemoterapija in tudi operacije. Pripomogel naj bi tudi k učinku kemoterapije pri nekaterih vrstah raka in omogočil, da se rakave celice hitreje uničijo. Za še boljše učinke bi ga bilo treba zaužiti v zelo velikih količinah, kar pa je težko, saj ga človeško telo težko absorbira. Pozitivne učinke njegovega delovanja so ugotovili pri bolnikih z rakom prostate, kožnem raku, levkemiji in raku materničnega vratu [20].

Dobro naj bi vplival tudi v boju proti nevrološkim boleznim, kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen. Sklepajo, da njegovi protivnetni in antioksidativni učinki ščitijo ljudi pred upadanjem delovanja možganov, ki se zgodi s staranjem. Deloval naj bi tako, da preprečuje oksidativni stres možganskih celic. Študije kažejo tudi, da preprečuje nastanek amiloidnih plakov v možganih, ki se začnejo kopičiti s starostjo in oslabijo njihovo delovanje. Veliko teh najdemo pri ljudeh z Alzheimerjevo boleznijo [15].

Zmanjševal naj bi tudi raven holesterola v krvi in posledično zmanjševal možnost kapi. Študije, izvedene na živalih, kažejo, da pegasti badelj učinkovito zniža raven holesterola in raven trigliceridov [20].

Izboljšal naj bi tudi zdravje kože in preprečeval kronična kožna vnetja, kot so na primer akne. Varoval naj bi tudi pred negativnimi učinki sončenja in upočasnil staranje kože.

V primeru, da ga zaužijemo preveč, lahko povzroči slabost ali glavobol. Paziti morajo tudi ljudje z diabetesom, saj bi lahko preveč zaužitega pegastega badlja povzročilo prevelik padeč krvnega sladkorja. Nekatere študije kažejo, da vpliva na raven estrogena, zato se odsvetuje

ljudem z boleznimi, kot so rak materničnega vratu, rak jajčnikov in endometrioza. Četudi redko, lahko povzroči alergijsko reakcijo in anafilaktični šok. Posebej previdni morajo biti ljudje z alergijami na rastline, ki so prav tako iz družine nebinovk, kot so ambrozija, marjetice, ognjič in krizanteme [13, 17, 21, 22, 23].

Silimarín je slabo topen v vodi in v polarnih topilih zaradi svoje visoko hidrofobne in neionizirajoče kemične strukture, od koder izhaja njegova nizka biološka uporabnost. Okoli 20–50 %, ki ga zaužijemo oralno, se absorbira. Okoli 80 % absorbiranega silimarína se izloči z žolčem, le približno 10 % pa ga vstopi v enterohepatsko cirkulacijo. Biološka uporabnost silimarína je torej majhna in je odvisna od več dejavnikov. Najpomembnejši so vsebina in količina spremljevalnih snovi, ki poleg silimarína vstopajo v telo, kot so ostali flavonoidi, fenolni derivati, aminokisliline, beljakovine in maščobe ter koncentracija samega pripravka.

Prav zaradi njegove slabe topnosti v vodi je kuhanje čaja iz pegastega badlja precej nesmiselno, saj se v vodo izloči zelo malo zdravilnih substanc. Običajno prehranske dodatke iz pegastega badlja zasledimo v obliki tablet in drugih oralnih pripravkov [6, 18].

Dve glavni kategoriji za trženje zeliščnih izdelkov sta: licencirana zdravila (zdravila rastlinskega izvora in tradicionalna zdravila rastlinskega izvora) in prehranska dopolnila. Prva imajo večje regulativne omejitve in tudi stroške. V primerih obeh kategorij je treba upoštevati dobro proizvodno prakso (DPP), razlika je v tem, da izdelki, ki spadajo pod prehranska dopolnila, niso podvrženi odobritvi nacionalnega organa.

Pegasti badelj je priznan kot tradicionalno zeliščno zdravilo v Evropski uniji, vendar pa se pogosteje prodaja kot prehransko dopolnilo [24].

S prehranskimi dodatki, ki vsebujejo pegasti badelj, je bilo leta 2020 ustvarjenih 103,15 milijona ameriških dolarjev prihodkov, kar uvršča pegasti badelj med eno izmed najbolj popularnih zdravilnih rastlin. Sklepajo, da se bo zaslužek do leta 2031 podvojil [25].

2.4 Olje pegastega badlja

Kot omenjeno zgoraj, vsebujejo semena pegastega badlja od 20 do 30 % lipidov oziroma maščob. Od esencialnih maščobnih kislin najdemo v olju pegastega badlja: linolno kislino (od 50 do 60 %), oleinsko kislino (od 20 do 30 %) in palmitinsko kislino (okoli 10 %), sterole (okoli 0,63 %) in tokoferole (okoli 0,038 %). Po sestavi je olje pegastega badlja zelo podobno bučnemu ali sončničnemu olju. Precejšnje razlike v njegovi strukturi opazimo pri oljih, ki so ekstrahirana z različnimi metodami.

Predvsem zaradi vsebnosti tokoferolov oziroma vitamina E ter sterolov ima tudi olje precejšnjo vrednost, čeprav ta spada pod stranski produkt, ki nastane pri pridobivanju silimarína iz pegastega badlja.

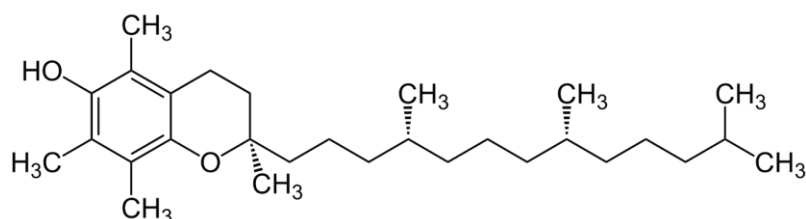
Zaradi visoke vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin je bilo tudi predlagano kot jedilno olje. Nenasičene maščobne kisline uvrščamo med dobre maščobne kisline, saj zmanjšujejo raven slabega holesterola in višajo raven dobrega, s čimer zmanjšajo možnost kapi in dovzetnost za srčne bolezni. Nenasičene maščobne kisline naj bi tudi blažile simptome skleroze, raznih vnetij, diabetesa in ščitile telo pred nekaterimi vrstami raka [7, 8, 26].

2.5 Vitamin E

Tokoferoli so ena najpomembnejših komponent v oljih. Glavna funkcija tokoferolov je, da delujejo kot antioksidanti, ki prekinjajo verige prostih radikalov v rastlinskih oljih in živilih ter tudi v človeškem telesu. Vitamin E lahko zmanjša tveganja za srčno-žilne bolezni in nekatere vrste raka zaradi svojih antioksidativnih lastnosti [7].

Vitamin E je pomemben antioksidant, topen v maščobah, ki ga najdemo v rastlinskih oljih, in je sestavljen iz štirih tokoferolov in štirih tokotrienolov: α , β , γ , δ – tokoferolov in α , β , γ , δ – tokotrienolov. Vseh osem vitamerov sestavlja kromanski obroč s hidroksilno skupino, ki lahko donira vodikov atom in s tem reducira proste radikale in hidrofobno stransko verigo, ki omogoča vitaminu E penetracijo v biološke membrane. Med seboj se osem molekul razlikuje po nasičenosti stranske verige in po metilaciji obroča. Položaj metilne skupine na kromanskem obroču določa ali gre za α , β , γ , δ obliko. Če je stranska veriga nasičena oziroma brez dvojnih vezi, gre za tokoferol, če pa je stranska veriga trikrat nasičena oziroma ima tri dvojne vezi, pa gre za tokotrienol.

Esencialni vitamin E je α -tokoferol, ki je hkrati tudi edina oblika, ki jo telo uporabi. Njegova molekula je predstavljena na sliki 2-5.



Slika 2-5. Molekula α tokoferola [27].

Vitamin E deluje kot lovilec prostih radikalov, ki lahko poškodujejo človeške celice. Veliko zanimanja je bil deležen predvsem od 80. let 20. stoletja dalje, ko so znanstveniki začeli odkrivati in razumevati vpliv prostih radikalov na telo. Ker deluje kot antioksidant, to pomeni, da celice ščiti pred oksidativnimi poškodbami, ki nastajajo zaradi vplivov okolja, staranja in načina življenja. S tem zmanjšuje možnost nastanka vnetnih procesov in zmanjša tveganja za nastanek kardiovaskularnih bolezni. Krepi naj bi tudi imunski sistem in ga dodatno varoval pred bakterijami in virusi. Pomaga tudi bolnikom s krčnimi žilami in preprečuje strjevanje krvi ter zmanjša možnost kapi. Pomagal naj bi pri ohranjanju dobrega vida in dobrega stanja kože ter pri zniževanju visokega krvnega tlaka in zmanjševanju slabega holesterola.

Inhibira tudi peroksidacijo lipidov in s tem pretvori lipidne radikale v bolj stabilne produkte, s tem pa poveča oksidativno stabilnost rastlinskih olj. Iz tega torej sledi, da imajo bolj kakovostna in stabilna olja večjo vsebnost vitamina E [8, 27, 28, 29, 31].

2.6 Fenolne spojine

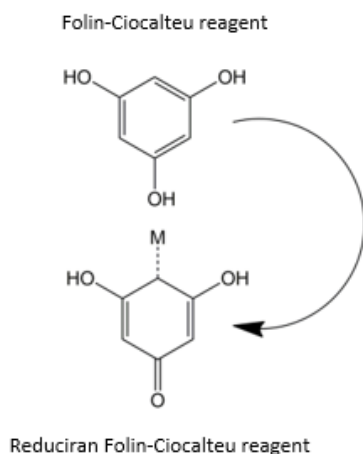
Fenolne spojine so sekundarni rastlinski metaboliti, ki imajo aromatski obroč z vsaj eno hidroksilno skupino. Razvrstimo jih v skupine glede na število fenolnih obročev in glede na strukturne elemente, ki te obroče povezujejo drug z drugim. Delimo jih na:

- preproste fenole,
- fenolne kisline (derivate hidroksibenzojske kisline in derivate hidroksicimetne kisline),
- flavonoide (flavan-3-ole, flavonole, flavone, izoflavone, flavanone, antocianidine),
- tanine (hidrolizirajoči tanini in kondenzirani tanini),
- kumarine,
- lignane,
- kinone,
- stilbene,

- kurkuminoide [32, 33].

So produkti sekundarne presnove pri rastlinah, ki zagotavljajo bistvene funkcije razmnoževanja in rasti. Delujejo kot obrambni mehanizmi proti patogenom, parazitom in plenilci ter prispevajo k barvi rastlin. Gre torej za pomembne rastlinske sestavine, ki nosijo redoks lastnosti in delujejo antioksidativno. Več kot rastlina vsebuje fenolnih snovi, boljši antioksidant je. So dobri zaviralci prostih radikalov, razgrajujejo peroksid, inaktivirajo kovine in posledično preprečujejo oksidativni stres ter s tem preprečijo poškodbe DNK. Preprečujejo bolezni srca, zmanjšajo vnetja, znižujejo možnost obolenja za rakom in posledice sladkorne bolezni. Zmanjšujejo tudi stopnjo mutageneze v človeških celicah. Najbolj zastopana skupina v človeški prehrani so fenolne kisline in flavonoidi, ki predstavljajo kar 90 % zaužitih fenolov [34, 35, 36].

Obstaja kar nekaj metod kvantifikacije fenolov in polifenolov v živilih s kolorimetričnim reagentom. Ena izmed njih je tudi Folin-Ciocalteu metoda, ki je tudi najpogosteje uporabljena. Folin-Ciocalteu reagent je mešanica fosfomolibdinske in fosfovolframove kisline, ki reagira s fenoli, polifenoli in tudi drugimi redukcijskimi substancami ter reducira do kromogenov. Slednje lahko zaznamo s sprektrofotometrom, saj v alkalnih pogojih oksovolframat in oksomolibdat, ki nastaneta pri tej redoks reakciji, tvorita modro obarvanje, ki je sorazmerno s koncentracijo polifenolov v vzorcu [37, 38]. Na sliki 2-6 je prikazana reakcija Folin-Ciocalteu reagenta.



Slika 2-6. Reakcija Folin-Ciocalteu reagenta pri določanju totalnih polifenolov. Povzeto po [38].

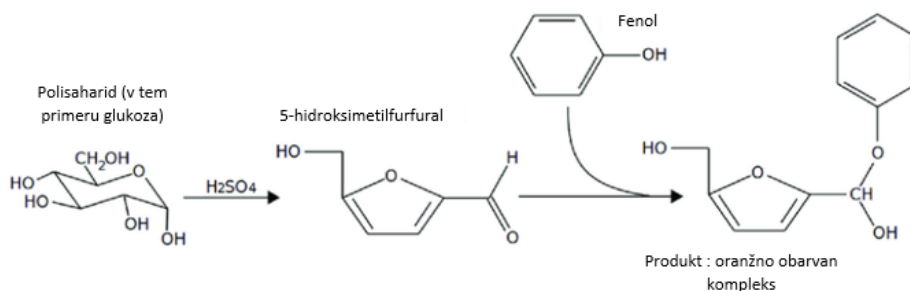
2.7 Ogljikovi hidrati

Ogljikovi hidrati so elementi, sestavljeni iz ogljika, vodika in kisika, in so opredeljeni kot polihidroksi aldehidi ali polihidroksi ketoni. Glede na njihovo kompleksnost jih delimo na:

- monosaharide: aldehidi ali ketoni z eno ali več hidroksilnimi skupinami,
- disaharide: sestavljeni iz dveh monosaharidov,
- oligosaharide: sestavljeni iz treh do devetih sladkorjev in
- polisaharide: sestavljeni iz več kot devetih sladkorjev [39].

So bistvena hranila, ki jih telo pretvori v glukozo in si s tem zagotovi energijo za delovanje. Telo ogljikove hidrate razgradi v enostavne sladkorje, ki se absorbirajo v krvni obtok. Ko raven sladkorja v telesu narašča, trebušna slinavka sprošča hormon, imenovan inzulin. Potreben je za prenos sladkorja iz krvi v celice, kjer se lahko uporabi kot vir energije. Pri preprostih sladkorjih ta proces poteka hitro, pri kompleksnejših sladkorjih pa poteka počasi in tako nam kompleksnejši ogljikovi hidrati dajejo energijo za daljše časovno obdobje. Nekateri dokazi kažejo, da polnozrnat žitarice in prehranske vlaknine iz polnovrednih živil pomagajo zmanjšati tveganja za bolezni srca in možgansko kap. Vlaknine lahko ščitijo tudi pred debelostjo, rakom debelega črevesja in danke ter pred sladkorno boleznijo tipa 2. So bistvenega pomena tudi za optimalno zdravje prebave [40, 41].

Metoda določanja ogljikovih hidratov s fenolom in žveplovo kislino je preprosta in hitra kolorimetrična metoda. Zazna praktično vse vrste ogljikovih hidratov. Žveplova kislina je dodana, da razgrajuje vse polisaharide, oligosaharide in disaharide v preproste monosaharide. Pentoze (strukture s petimi ogljikovimi atomi) se nato dehidrirajo v furfural, heksoze (strukture s šestimi ogljikovimi atomi) pa v hidroksi metil furfural. Te spojine nato reagirajo s fenolom in dajejo rumeno-oranžno obarvanje raztopin [42, 43]. Reakcija, ki poteče med fenol-žveplovo metodo, je prikazana na sliki 2-7.

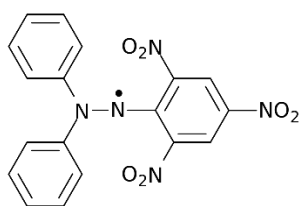


Slika 2-7. Fenol-žveplova metoda za analiziranje vsebnosti ogljikovih hidratov. Povzeto po [42].

2.8 DPPH radikalska metoda za določanje antioksidativne aktivnosti ekstraktov

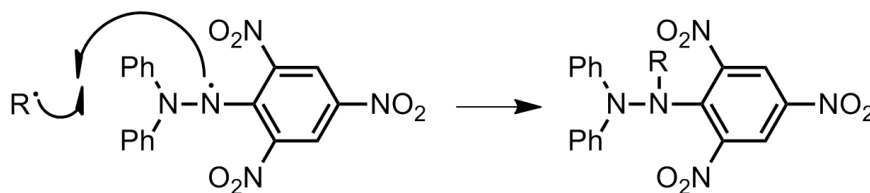
Prosti radikali neizogibno nastajajo v bioloških sistemih. Zanje je značilno, da povzročajo različne degenerativne motnje, kot so mutageneza, karcinogeneza, kardiovaskularne motnje in staranje. Antioksidanti pa so spojine, ki se borijo proti prostim radikalom tako, da posredujejo v katerem koli od treh glavnih korakov oksidativnega procesa, ki ga povzročajo prosti radikali – iniciacija, propagacija, terminacija. Antioksidante proizvaja tudi biološki sistem, pojavljajo se tudi naravno v različnih živilih.

Test DPPH je dobro znana metoda, ki se pogosto uporablja za določanje antioksidativne aktivnosti v hrani, rastlinskih ekstraktih in pijačah. Popularna je predvsem zaradi njene preproste uporabe, je cenovno ugodna in za pomerjanje potrebuje le spektrofotometer. Metodo je razvil Marsen Blois leta 1958. Temelji na uporabi stabilnega radikala DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ki deluje kot lovilec prostih radikalov [35]. Njegova molekula je prikazana na sliki 2-8.



Slika 2-8. Molekula DPPH [44].

Deluje tako, da se prosti elektron dušikovega atoma v DPPH poveže z vodikovim atomom antioksidanta in tako nastane reducirana oblika DPPH radikala. Delokalizacija elektronov oziroma lihi elektron v prostem radikalu DPPH povzroči močno vijolično obarvanje raztopine. Kadar pa se DPPH meša s snovjo, ki lahko odda vodikov atom, pa nastane njegova reducirana oblika, ki je manj intenzivno vijolične barve [35, 45, 46]. Reakcija DPPH radikala z antioksidantom je prikazana na sliki 2-9.



Slika 2-9. Reakcija DPPH z antioksidantom [47].

3 Metode dela

Uporabili smo različne metode dela. Izvedli smo dva sklopa separacij: ekstrakcijo olja iz semen pegastega badlja s topilom, kjer je šlo za klasično ekstrakcijo trdno-tekoče, nekaj olja pa smo separirali z metodo hladnega stiskanja. Drugi sklop ekstrakcij so bile ekstrakcije aktivne komponente iz predhodno razmaščenih semen, kjer je prav tako šlo za ekstrakcijo trdno-tekoče, ki jo drugače imenujemo tudi maceracija. Ekstrakcije smo optimirali s pomočjo programa Design Expert 13.

Vzorci smo nato vakuumsko filtrirali, vakuumsko uparjali, filtrirali po principu gravitacijske oziroma klasične filtracije in vakuumsko sušili. V vzorcih smo merili tudi vsebnost vlage z napravo, ki deluje po principu sušenja z infrardečim grelnikom. Uporabljali pa smo tudi centrifugiranje oljnatih vzorcev, da smo odstranili nečistoče.

Za analiziranje vzorcev smo uporabili metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti, plinsko kromatografijo in UV/VIS spektrofotometrijo.

Večina metod, ki smo jih uporabili, izhaja iz farmakopeje, s katero smo si veliko pomagali.

3.1 Laboratorijske metode

Kot smo že omenili zgoraj, smo uporabili naslednje laboratorijske metode:

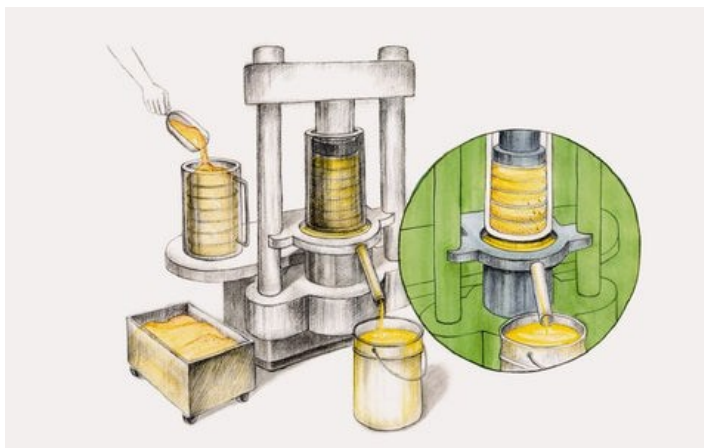
- separacijske metode (hladno stiskanje olja in ekstrakcija trdno-tekoče),
- filtracijo (vakuumska filtracija in gravitacijska filtracija),
- vakuumsko uparjanje,
- sušenje (vakuumsko sušenje in sušenje s halogenskim grelcem),
- centrifugiranje,
- tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti,
- plinsko kromatografijo,
- UV/VIS spektrofotometrijo.

3.1.1 Separacijske metode

Uporabljali smo dve različni metodi ekstrakcije: klasično ekstrakcijo trdno-tekoče in metodo hladnega stiskanja.

3.1.1.1 Hladno stiskanje

Hladno stiskanje je postopek mehanske ekstrakcije. V preteklosti so stiskana olja pridobivali ročno, danes pa je delo manj fizično zahtevno, saj nam pri tem pomagajo stroji. Stroji prebadajo ali meljejo rastlinski material, medtem ko se vrtijo. Centrifugalna sila jim pomaga pri ločevanju olja od preostale rastlinske kaše in tekočin. Melje se običajno mehko sadje ali manjša semena, prebada pa se sadje s trdno lupino, kot so na primer limone in limete. V zadnjem koraku procesa se olje še zadnjič filtrira, da se zagotovi, da so odstranjeni vsi ostanki skorje ali lupin [48, 49]. Na sliki 3-1 je prikazan stroj za hladno stiskanje olja.



Slika 3-1. Stroj za hladno stiskanje olja [50].

S hladnim stiskanjem se ohranja kvaliteta olj, ohrani pa se tudi več aktivne komponente. Kot pove izraz »hladno stiskanje«, to ne vključuje uporabe toplote. Vsa toplota, ki se pri procesu pojavi, je zgolj zaradi mehanskega delovanja in ne sme nikoli presežati 50 °C. To je predvsem pomembno pri nekaterih rastlinah, ki visokih temperatur ne prenašajo in vsebujejo občutljive in drobne molekule, ki se razgradijo pod vplivom toplote, posledično pa se zmanjša zdravilna korist olja. Čeprav bi z uporabo toplote pri takem procesu dobili večjo količino olja, pa bi bila kakovost tega olja zaradi toplote ogrožena, saj lahko povišana temperatura razgradi dragocene antioksidante, vitamine in minerale v olju [48, 51, 52].

Olje se večinoma sicer ekstrahira s pomočjo topil, običajno s heksanom, kar je stroškovno ugodna metoda, ki odstrani iz semen tudi več olja kot proces hladnega stiskanja. Vendar pa je v tem primeru potrebna še dodatna obdelava, da olje postane primerno za zaužitje. Ti dodatni procesi in prisotnost topil povzročijo zmanjšanje kakovosti olja, lahko pa olja vsebujejo tudi ostanke topil. Z ekstrakcijo se s topili ekstrahira tudi več prostih maščobnih kislin, ki vplivajo na stabilnost olja, saj so nagnjena k oksidaciji [53].

Pri hladnem stiskanju je zelo pomembna priprava in kvaliteta semen, saj ta vplivajo na okus in izgled olja. Semena morajo biti kvalitetna, vzgojena iz izbranih sort, ki so primerna za hladno stiskanje. Seme mora biti pravilno zrelo, očiščeno in ne sme biti plesnivo ali staro. Vsebnost glikozidov in organskih kislin, ki grenijo okus, mora biti čim nižja.

Preden začnemo stiskanje olja, je treba semena še enkrat dobro očistiti, odstraniti vse tujke in prašne delce. Ta proces se izvaja v posebnem čistilnem stroju, v katerem potekajo naslednje operacije: sejanje z vibracijskimi siti, uporaba magnetov za odstranjevanje magnetnih delcev, preprihovanje in pnevmatska separacija. Semena morajo biti tudi dobro osušena in, če je možno, segreta na sobno temperaturo.

Proizvodna linija je sestavljena iz nasipnice, transportnega polža do sprejemnega lijaka nad dvoglavo stiskalnico, sprejemnega rezervoarja, usedalnika za izstisnjeno olje in zbiralnika za tropine. Proces poteka avtomatsko z daljinskim nadzorom. Prešo nastavimo tako, da je temperatura olja, ki izteka iz preše, maksimalno 50 °C.

Olje, ki se izcedi iz preše, je motno, vsebuje drobne delce semen in njihovih ovojníc. Vse to lahko odstranimo s filtracijo, vendar pa lahko s filtracijo odstranimo tudi določene koristne snovi iz olja, zato se pogosto odločimo za bistrenje olja s pomočjo usedanja. Olje pustimo stati okoli 10 dni pri temperaturah od 10 do 20 °C. Olje nato dekantiramo od usedlin v skladiščno posodo [54].

3.1.1.2 Ekstrakcija trdno-tekoče

V tem magistrskem delu smo uporabljali ekstrakcijo trdno-tekoče, ki jo drugače imenujemo maceracija. Gre za eno izmed najpreprostejših tehnik, ki jo ločimo na dve fazi:

- v prvi fazi spravimo zmes v stik s topilom, ki smo ga izbrali,
- v drugi fazi pa obe nastali fazi ločimo.

V procesu najprej pride do fazne spremembe pri raztapljanju topljenca. Topilo prodre oziroma difundira v pore trdnega materiala in nato se zgodi difuzija topljenca na površino delca ter prenos topljenca skozi tekočinski film na površini delca v glavni tok topila.

Ta vrsta ekstrakcije se uporablja za pridobivanje olj iz plodov in semen ter za pridobivanje farmacevtskih učinkovin iz rastlinskih materialov.

Na ekstrakcijo vpliva več različnih parametrov:

- Izbira topila. Topila morajo imeti nizko viskoznost, da lahko enostavno prodrejo skozi pore in kapilare trdne snovi, ki pa med ekstrakcijo narašča, saj se koncentracija topljenca v topilu povečuje, s tem pa pada ekstrakcijska hitrost. Treba je dobro poznati sestavo in komponente, ki jih želimo ekstrahirati, da pravilno izberemo primerno topilo. Zaželeno je, da izberemo čim bolj nestrupeno, nereaktivno, neškodljivo topilo, ki je tudi kar se da poceni. Upoštevati pa je treba tudi zakonodajo na področju ekstrakcijskih topil, ki se uporabljajo za živila.
- Temperatura. Topnost komponent običajno narašča z višanjem temperature, hkrati pa narašča tudi difuzijski koeficient. Problem pa se pojavi, ker večina bioaktivnih komponent ni toplotno obstojnih, kar lahko povzroči, da se te komponente razgradijo pri višjih temperaturah. Temperatura mora biti torej primerna, da se zagotovi čim večja topnost topljenca, vendar ne sme biti tako visoka, da bi povzročila izgube topil, ekstrakcijo neželenih komponent ali razgradnjo termolabilnih komponent.
- Mešanje. Z mešanjem se poveča snovni prenos s površine materiala, preprečuje pa tudi sedimentacijo delcev.
- Velikost delcev. Čim manjša velikost delcev pomeni, da se s tem poveča medfazna površina med topilom in trdnim materialom, kar pospeši prenos snovi. Difuzijska pot topljenca iz notranjosti delca je takrat krajša. Delci pa ne smejo biti preveč fini, saj lahko ovirajo pretok fluida in samo separacijo, lahko pa se tudi začnejo sprijemati v skupke. Delci naj bi bili čim bolj enakomernih velikosti, da bi bil tudi čas ekstrakcije čim bolj enakomeren.
- Razmerje topilo : topljenec. Pomembna je tudi izbira ustreznega razmerja med topilom in topljencem. Običajno visoko razmerje trdne snovi in topila ugodno vpliva na ekstrakcijo spojin. Ti rezultati so skladni s prenosom mase [55, 56].

Tehnika maceracije je ena izmed bolj priljubljenih tehnik, predvsem zaradi svoje enostavnosti in cenovne dostopnosti. Ima pa tudi določene omejitve, kot so nižji izkoristek in nižja učinkovitost ter visoka poraba količine topil, ki so nevarna za zdravje [57].

3.1.2 Filtracija

Filtracija je postopek, ki se uporablja za ločevanje trdih delcev od tekočih ali plinskih mešanic. Filtrirni medij se uporablja, da omogoči prehod tekočine ali plina, hkrati pa zadrži trdne snovi. Filter je lahko fizičen, biološki ali mehanski. Tekočina, ki ostane po postopku filtracije, se imenuje filtrat.

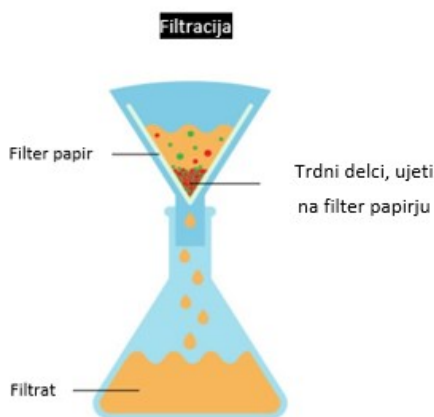
Filtracija ni 100-odstotno učinkovit postopek za odstranjevanje trdnih delcev iz tekočine. Nekateri drobni delci lahko prodrejo skozi filter in tekočina ostane v njem, zato bo vedno prišlo do izgube produktov.

Filtracija je pomembna tudi v končnih fazah priprave vzorcev pred vbrizgavanjem vzorcev na kromatografske kolone, ki imajo intoleranco na delce. Takšna je na primer tudi tekočinska kromatografija visoke ločljivosti [58].

Mi smo uporabili gravitacijsko filtracijo in vakuumsko filtracijo.

3.1.2.1 Gravitacijska filtracija

Gravitacijsko filtracijo drugače imenujemo tudi klasična filtracija. Zmes trdne in tekoče snovi vlijemo v lij s filter papirjem, gravitacija potegne tekočino navzdol skozi filter, trdna snov pa ostane na papirju. Večinoma se uporablja za ločevanje trdnih nečistoč od organskih tekočin [40]. Shemo gravitacijske filtracije lahko vidimo na sliki 3-2.



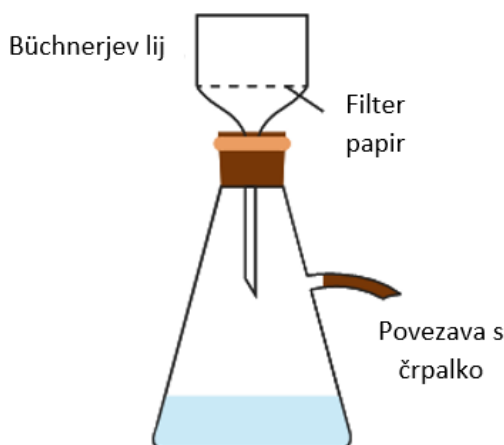
Slika 3-2. Gravitacijska filtracija. Povzeto po [59].

3.1.2.2 Vakuumska filtracija

Vakuumska filtracija je ena izmed najbolj uporabljenih podvrst filtracije. Deluje po principu ustvarjanja podtlaka v bučki, s čimer se pospeši prehod tekočine in s tem hitrost filtracije.

Pri vakuumski filtraciji so osnovni elementi: Büchnerjev lij, bučka s stranskim krakom, vakuumsko črpalka, ki ustvarja podtlak v bučki in omogoča hitro sesanje tekočine skozi filter, gumijast zamašek, ki preprečuje dovod zraka, in filter papir, katerega premer mora biti enak premeru Büchnerjevega lija. Trdna snov je pri tej vrsti filtracije običajno bolje posušena, filtrat pa je čistejši kot pri gravitacijski filtraciji [60, 61].

Glavne elemente vakuumske filtracije vidimo na sliki 3-3.



Slika 3-3. Vakuumska filtracija. Povzeto po [60].

3.1.3 Vakuumsko uparjanje

Pri vakuumskem uparjanju gre za ločevanje komponent oziroma odstranjevanje topil iz raztopine zaradi razlik v hlapnosti. Topilo, ki je bolj hlapna komponenta, hlapi iz raztopine, topljenec oziroma manj hlapna komponenta pa ostaja v raztopini, ki je posledično vedno bolj koncentrirana. To dosežemo tako, da znižujemo tlak v vakuumskem uparjalniku oziroma rotavaporju, kar zniža tudi vrelišče topila, ki ga želimo iz raztopine odstraniti. Med samim procesom se bučka z raztopino ves čas vrtili, saj to poveča površino tekočine in s tem hitrost izhlapevanja. Pri procesu dobimo dva produkta. Prvi je destilat oziroma čisto topilo, ki se zbira v posebni bučki in ga lahko ponovno uporabimo. Drugi produkt je koncentrat, ki je običajno ciljni produkt, saj vsebuje dragocene snovi [62, 63, 64].

Nekateri pomembni parametri, ki vplivajo na vakuumsko uparjanje, so:

- **Koncentracija.** Viskoznost tekočine, ki se uparja, je po navadi precej nizka in podobna viskoznosti vode, kar povzroča doseganje visokih koeficientov toplotne prehodnosti. Med samim izhlapevanjem topila se raztopina vedno bolj koncentrira in postaja tudi vedno bolj viskozna, kar zmanjšuje koeficient toplotnega prehoda.
- **Topnost.** Med segrevanjem koncentracija topljenca običajno narašča.
- **Temperatura.** Biološki materiali so večinoma temperaturno občutljivi in lahko pri višjih temperaturah razpadejo. Zaradi tega je pomembno, da temperaturo, pri kateri poteka uparjanje, ustrezno določimo.
- **Penjenje.** Nekateri materiali se lahko med uparjanjem močno penijo. Pena lahko hitro uide iz uparjalnika, kar vodi do izgub. V primeru penjenja se uporabljajo protipenilci.
- **Tlak.** Zaradi nižanja tlaka raztopine hitreje zavrejo. To moramo upoštevati pri določanju temperature uparjanja in paziti, da le-ta ni previsoka [65].

Vakuumsko uparjanje ima številne prednosti. Največja prednost so nizki stroški, saj zaradi znižanega tlaka potrebujemo manjše temperature za odstranjevanje topil, posledično moramo dovesti manj toplote, kot bi jo morali, če tlaka ne bi bilo. Omogoča tudi ponovno uporabo topila po uparjanju. Pozitivno je tudi to, da nam v raztopino ni treba dodati dodatnih kemikalij, da dosežemo želen rezultat [62].

Vakuumsko uparjanje izvajamo z rotacijskim uparjalnikom. Rotacijski uparjalniki so naprave, ki se uporabljajo za učinkovito odstranjevanje topil s postopkom izhlapevanja. Delujejo na principu, da imajo topila razpon vrelišč, ki se pod znižanim tlakom znižajo. Izparilna bučka se vrti z določeno hitrostjo, zaradi česar materiali tvorijo veliko površino tankega filma na notranji steni bučke. Bučka se enakomerno segreje in snovi z nižjim vreliščem hitro izhlapijo. Topila se tako hitreje in učinkovitejše odstranijo kot pri izhlapevanju z atmosferskim tlakom, s čimer se prihrani čas in poveča produktivnost. Pospešeno izhlapevanje je posledica tvorbe filma na notranji površini bučke, kar znatno poveča izhlapevanje [66].

3.1.4 Sušenje

Sušenje je postopek, kjer z izhlapevanjem odstranimo vodo iz raztopine, suspenzije ali druge trdno-tekoče mešanice.

Sušenje je pogosto zadnji korak v proizvodnem procesu pred prodajo, pakiranjem ali skladiščenjem materiala. Prilagoditev vlage v materialu je lahko ključni korak pri obdelavi in lahko pomaga znižati stroške transporta in skladiščenja z odstranitvijo nepotrebne mase v materialu. V farmacevtski industriji pa se sušenje uporablja predvsem za odstranjevanje strupenih ostankov topil, lažje rokovanje z materiali in stabilizacijo materialov, ki so občutljivi na vlago.

Sušenje se lahko uporablja tudi za zaščito in razkuževanje. Odstranjevanje vlage iz določenih materialov močno zmanjša možnost nastajanja plesni [67].

Uporabljali smo vakuumsko sušenje in sušenje, kjer material sušimo s pomočjo vira infardec svetlobe.

3.1.4.1 Vakuumsko sušenje

Vakuumsko sušenje je postopek, ki se izvaja v komori, v kateri s pomočjo vakuumskih črpalk znižamo tlak. Z znižanjem atmosferskega tlaka v komori dosežemo, da se materiali sušijo hitreje in pri nižjih temperaturah. Je ena izmed najpomembnejših industrijskih tehnik sušenja za toplotno občutljive, higroskopske in strupene snovi. Izogibanje prekomerni vročini med sušenjem določenih snovi je včasih nujno zaradi ohranjanja kakovosti izdelka in varnosti [68].

Je postopek prenosa mase, pri katerem se vlaga, prisotna v snovi, odstrani z ustvarjanjem vakuuma. S pomočjo vakuumskih črpalk znižamo tlak okoli snovi, ki jo sušimo. S tem znižamo vrelišče vode v izdelku in povečamo stopnjo izhlapevanja. Je postopek, ki se izvaja pri znižanih tlakih in nižji relativni vlažnosti v primerjavi s tlakom okolice, kar omogoča hitrejše sušenje [69].

Zaradi prisotnosti tlaka se temperatura vrelišča vode znatno zmanjša, kar povzroči, da vlaga iz produkta izpari precej prej, kot bi v primeru klasičnega sušenja brez vakuuma. Hkrati se tudi hidravlična prevodnost materiala pod vakuumom poveča, zato je odpornost prenosa mase na površino izdelka manjša [70].

Vakuumsko sušenje ima pred klasičnim sušenjem številne prednosti, kot so: višja hitrost sušenja, nižja temperatura sušenja in manjša možnost uničenja produkta. Je idealna metoda za sušenje materialov, ki so občutljivi na toploto in kisik, saj je zaradi odstranjevanja vlage pri nižjih temperaturah možnost za oksidacijske reakcije manjša [71].

3.1.4.2 Sušenje s halogenskim grelcem

Merilnik vlage v vzorcu uporablja halogenski grelec za sušenje vzorca. Sestavljen je iz dveh komponent, in sicer enote za tehtanje in enote za ogrevanje. Najprej si merilnik zabeleži začetno težo vzorca, nato pa halogenski grelec segreva vzorec v korakih po 1 °C in posuši

vzorec v zelo hitrem času do konstantne mase. Integrirana tehtnica ves čas beleži spremembo mase. Ko se le-ta ustali, se gretje izklopi, tehtnica pa izračuna vsebnost izhlapele vlage. Merilnik vlage je povezan z ekranom, kjer se izpisujejo mase [72].

Merilnike vlage s halogenskimi grelniki odlikujejo hitre meritve, enostavno rokovanje, kjer izračuni niso potrebni, prav tako ni potrebna predpriprava vzorca, inštrumenti pa so kompaktni in enostavni za uporabo. Zaradi enostavnosti uporabe je tudi možnost za napake manjša [73].

Največkrat se v laboratoriju uporabljajo merilniki vlage s halogenskim ali IR grelcem. Halogenski grelec je hitrejši in omogoča bolj ponovljive meritve kot IR grelec, je pa zaradi tega običajno dražji [74].

Nadzor vlage je najpomembnejši v prehrabeni industriji. Prevelika vsebnost vlage lahko povzroči hitro rast bakterij, premalo vlage pa lahko zmanjša število kalorij in naredi hrano preveč suho. Vlaga lahko vpliva tudi na okus, rok uporabnosti in videz živila, zato je zelo pomembno, da je količina vlage v materialu ustrezno prilagojena [75, 76].

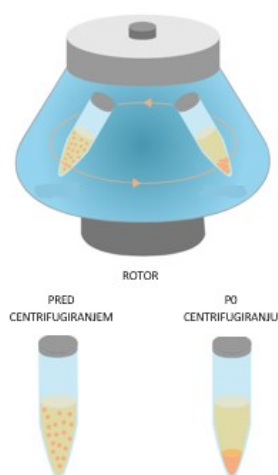
Na sliki 3-4 lahko vidimo merilnik vlage, ki smo ga uporabili za analiziranje vzorcev.



Slika 3-4. Merilnik vlage Mettler Toledo HX204.

3.1.5 Centrifugiranje

Centrifugiranje je metoda ločevanja molekul z različnimi gostotami z vrtenjem raztopine okoli osi pri visoki hitrosti [77]. Centrifugiranje je prikazano na sliki 3-5.



Slika 3-5. Centrifugiranje. Povzeto po [77].

Uporablja se za ločevanje delcev iz raztopine glede na njihovo gostoto, obliko, velikost, viskoznost medija in hitrost rotorja. Ločevanje s sedimentacijo bi lahko potekalo naravno z zemeljsko gravitacijo, vendar bi bil ta postopek zelo zamuden. S centrifugiranjem ta naravni proces pospešimo. Vrtenje rotorja okoli središčne osi ustvarja centrifugalno silo na delce v suspenziji. Ko se rotor vrti v centrifugi, deluje centrifugalna sila na vsak delec v vzorcu. Delec se nato usede s hitrostjo, ki je sorazmerna centrifugalni sili, ki deluje nanj. Pri stalni centrifugalni sili in viskoznosti tekočine je hitrost sedimentacije delca sorazmerna z njegovo velikostjo in razliko med gostoto delcev in gostoto raztopine. Delci, katerih gostota je višja od gostote topila, se potopijo, delci, ki so lažji, pa priplavajo na vrh. Večja kot je razlika v gostoti, hitreje se premikajo [78].

Na sliki 3-6 je prikazana centrifuga, ki smo jo uporabili v sklopu našega eksperimentanega dela.



Slika 3-6. Centrifuga NeoLab 3-1810.

3.1.6 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti oziroma po angleško high performance liquid chromatography ali na kratko HPLC je analitska tehnika, ki se uporablja za ločevanje, identifikacijo in kvantifikacijo vsake od komponent v vzorcu. Gre v bistvu za izboljšavo

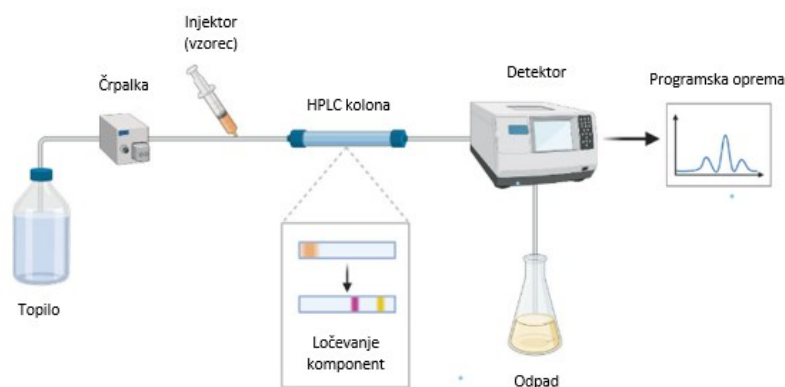
kolonske tekočinske kromatografije, le da v tem primeru topilo ne kaplja skozi kolono pod vplivom težnosti, ampak ga skozi potiska tlak.

Temelji na ločevanju spojin na podlagi razlik v hitrosti potovanja skozi kolono. Je najbolj vsestranska in pogosto uporabljena metoda kromatografije. Množično se uporablja za ločevanje in določevanje veliko različnih organskih, anorganskih in bioloških materialov [79, 80].

Vsak HPLC je sestavljen iz osnovnih elementov:

- posode z mobilno fazo oziroma topilom,
- črpalke,
- injektorja za vnos vzorca v sistem,
- kolone, kjer poteka ločba komponent,
- detektorja, ki ovrednoti ločene komponente.

Shema HPLC aparata je prikazana na sliki 3-7.



Slika 3-7. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti. Povzeto po [79].

Na začetku HPLC aparata je rezervoar oziroma steklenica s topilom ali zmesjo topil, ki jih imenujemo mobilna faza. Sestava mobilne faze je bistvenega pomena za separacijo in mora zadostovati naslednjim zahtevam:

- ne sme vplivati na lastnosti kolone,
- biti mora topilo za vzorce,
- biti mora čista in kompatibilna z detektorjem,
- imeti mora nizko viskoznost.

Sestavo mobilne faze lahko med potekom separacije spreminjamo. Ta način separacije se imenuje gradientno izpiranje. Kadar ostane sestava mobilne faze nespremenjena, pa se način separacije imenuje izokratsko izpiranje.

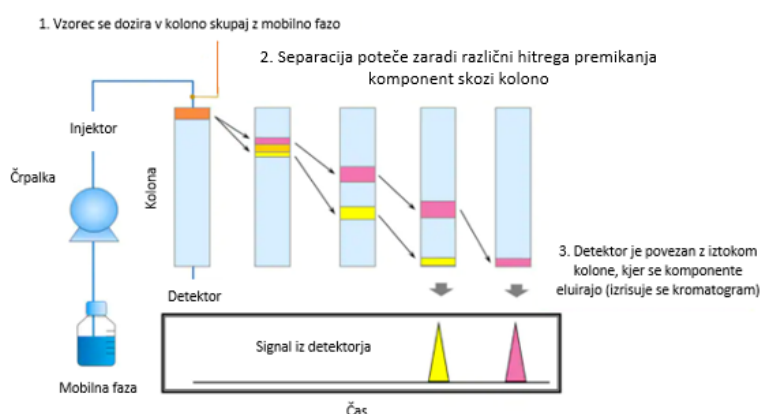
Mobilna faza lahko vsebuje pline, kot je na primer kisik, ki so našim očem nevidni in lahko povzročijo velike šume v detektorju. Mobilno fazo zato nekaj minut degaziramo na ultrazvočni kopeli, preden jo prestavimo v sistem, da se znebimo zračnih mehurčkov. Nekateri kromatografi pa imajo kar vključen razplinjevalec oziroma degazer, ki uporablja posebno polimerno membransko cev za odstranjevanje plinov. Številne majhne pore na površini polimerne cevi omogočijo pretok zraka, hkrati pa preprečujejo, da bi tekočina prehajala skozi.

Nato sledi črpalka. Črpalka je nameščena v najbolj zgornjem toku sistema in ustvarja pretok mobilne faze iz njenega rezervoarja v sistem. Glavna naloga črpalke je ustvarjanje visokega tlaka, poleg tega pa mora biti sposobna zagotoviti dosleden tlak v vseh pogojih ter nadzorovano stopnjo pretoka, ki mora biti čim bolj konstantna. Zaradi visokih tlakov v napravi je oprema za HPLC veliko bolj dovršena in posledično draga, kot so nekatere druge vrste kromatografije.

Za črpalko je nameščen injektor, ki mora biti blizu začetka separacijske kolone, da ne pride do širitve pikov. Najenostavnejša metoda injiciranja je z uporabo brizge preko ventila s priključeno vzorčno zanko. Uporablja pa se lahko tudi sistem samodejnega injiciranja, ki omogoča vbrizgavanje v določenem načrtovanem času.

Ločevanje komponent se izvede znotraj kolone. Kolone so običajno narejene iz nerjavečega jekla, saj je le-to odporno na visoke tlake in na veliko različnih topil. Material znotraj kolone je običajno silicijev dioksid ali polimerni gel. Znotraj kolone se nahaja stacionarna faza. Gre za zrnat material z zelo majhnimi poroznimi delci. Zaradi interakcij s stacionarno in mobilno fazo se komponente čez kolono različno hitro premikajo. Močnejša kot je afiniteta med komponento in mobilno fazo, hitreje se komponenta premika skozi kolono. Če pa je afiniteta močnejša s stacionarno fazo, se komponenta premika počasneje [80, 81].

Potek ločevanja komponent v HPLC koloni je prikazan na sliki 3-8.



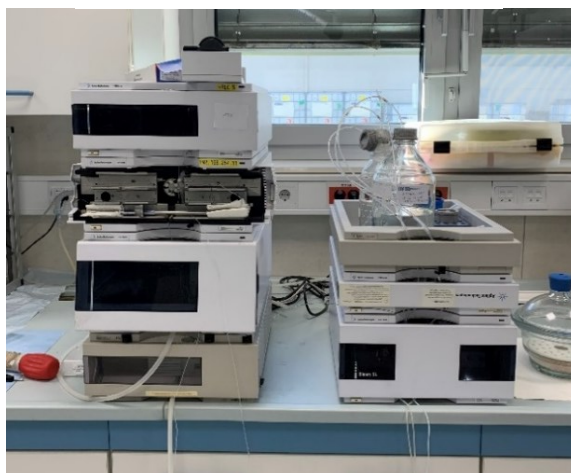
Slika 3-8. Ločevanje komponent v HPLC koloni. Povzeto po [81].

Za opazovanje dobljene separacije se uporablja detektor. Sestava mobilne faze je konstantna, kadar ni prisotnega analita, njegova prisotnost pa sestavo mobilne faze spremeni. Na te razlike je pozoren detektor, ki te spremembe spremlja kot obliko elektronskega signala. Detektor zaznani signal posreduje programski opremi na računalniku. Na voljo je veliko različnih detektorjev glede na strukturne značilnosti analita. Najpogostejši med njimi je UV/VIS spektrofotometer [80, 81].

V našem primeru bomo uporabljali HPLC in tudi UPLC. Tukaj gre za tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti, ki lahko za razliko od HPLC aparata prenese tlake do 15000 psi. UPLC je v bistvu samo nadgradnja HPLC-ja. Kot omenjeno prej, lahko obratuje pri višjih tlakih, izboljša resolucijo in občutljivost analize, poraba topil je manjša, krajši pa so tudi časi analiziranja [82]. Na slikah 3-9 in 3-10 lahko vidimo UPLC in HPLC, ki smo ju uporabljali za analiziranje vzorcev.



Slika 3-9. UPLC Waters Aquity.



Slika 3-10. HPLC Agilent 1200.

Tekočinsko kromatografijo ločimo na več različnih tipov glede na mehanizem ločevanja ali glede na vrsto stacionarne faze. Poznamo naslednje tipe:

- adsorpcijsko kromatografijo ali kromatografijo trdno-tekoče,
- porazdelitveno kromatografijo ali kromatografijo tekoče-tekoče,
- ionsko kromatografijo,
- izločitveno kromatografijo,
- afinitetno kromatografijo,
- kiralno kromatografijo.

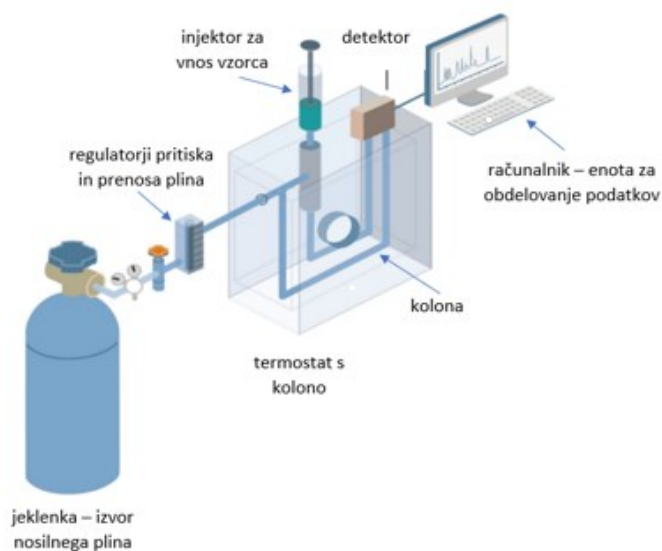
Najpogosteje se uporablja porazdelitvena kromatografija, ki smo jo za analiziranje vzorcev uporabili tudi mi. Stacionarna faza je tekoča in se ne meša s tekočo mobilno fazo. Porazdelitveno kromatografijo delimo dalje še na dve vrsti glede na relativno polarnost mobilne faze in stacionarne faze. Kadar je stacionarna faza močno polarna in mobilna faza relativno nepolarna, gre za normalno porazdelitveno kromatografijo. Pri reverzno fazni kromatografiji pa je stacionarna faza nepolarna, mobilna faza pa relativno polarna, kot je na primer voda, metanol in acetonitril. Pri normalno fazni kromatografiji se najprej izloči najmanj

polarna komponenta, ki zvišuje polarnost mobilne faze in tako skrajša elucijski čas. Obratno je pri reverzno fazni kromatografiji, ki smo jo uporabili tudi mi. Reverzno fazna kromatografija je zelo razširjena in se uporablja kar trikrat pogosteje kot normalno fazna kromatografija [80].

3.1.7 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je analitska tehnika, ki se uporablja za plinske, tekoče in trdne vzorce. S plinsko kromatografijo je mogoče spojine ločiti, identificirati, predvsem pa kvantificirati. Prvič so jo odkrili okoli leta 1900. Pri plinski kromatografiji se komponente vzorca, ki se upari, ločijo na podlagi razporeditve med plinasto mobilno fazo in tekočo ali trdno snovjo, ki predstavlja stacionarno fazo in se nahaja v koloni. Za razliko od večine drugih tipov kromatografije mobilna faza ne reagira z molekulami analita [80, 83, 84, 85].

Od tekočinske kromatografije se razlikuje v tem, da mobilna faza ni tekoča, temveč je ta plinasta in jo drugače imenujemo tudi nosilni plin. Njegova edina funkcija je prenos vzorca skozi kolono. Pomembno je, da je plin kemično inerten. Najpogosteje se kot nosilni plin uporablja helij, ker je varnejši od vodika, vendar pa primerljiv z njegovo učinkovitostjo in je tudi združljiv z večino detektorjev. Oba zagotavljata krajši čas analiz in nižje temperature za uspešno ločitev vzorcev, saj lahko delujeta pri višjih pretokih kot ostali plini. Odvisno od želene zmogljivosti in od uporabljenega detektorja se lahko uporabljajo tudi dušik, argon in vodik. Vsi nosilni plini se nahajajo v rezervoarjih pod tlakom, na aparat pa so pritrjeni regulatorji tlaka in merilniki pretoka, ki nadzorujejo pretok plina. Pomembno je tudi, da so plini čisti. Običajno so te čistosti med 99,995 in 99,9995 % [83, 86]. Sestava GC aparata je prikazana na sliki 3-11.



Slika 3-11. Sestava plinskega kromatografa. Povzeto po [86].

Plinski kromatograf je sestavljen iz treh glavnih komponent: enote za vbrizgavanje vzorca, ki vzorec segreje in upari, kolone, ki se uporablja za ločevanje spojin, in detektorja, ki spojine zaznava in odda njihove koncentracije kot električne signale.

Vzorec torej najprej doziramo v plinski kromatograf z brizgo ali pa preko avtomatskega vzorčevalnika. Vzorec se nato segreje na visoko temperaturo in upari v enoti za doziranje vzorca. Tam se komponente vzorca pomešajo z nosilnim plinom, ki se nahaja v jeklenki, ki je priklopljena na aparat. Kot omenjeno prej, so priklopljeni tudi regulatorji, ki regulirajo pritisk

in sam prenos nosilnega plina skozi kolono. Nosilni plin se nato pomeša s komponentami vzorca in jih prenaša skozi kolono. Pomembno je, da so vsi materiali v plinskem kromatografu temperaturno obstojni, saj se v njem dosegajo visoke temperature [84, 85].

Komponente vzorca se v koloni porazdelijo med dve fazi, ena je nosilni plin, druga pa stacionarna faza. Komponente v mobilni fazi reagirajo s stacionarno fazo, ko čez njo prehajajo. Zaradi razlik v strukturah in lastnostih vsake komponente, kot sta velikost molekule ali afiniteta, je vsaka interakcija različnih komponent s stacionarno fazo različna. Zadrževalni časi komponent v koloni se zato razlikujejo in komponente se skozi kolono premikajo različno hitro. Snovi, ki s stacionarno fazo bolj reagirajo, se iz kolone izločijo kasneje. Tiste, ki pa imajo s stacionarno fazo manj interakcij, pa so iz kolone izločene prej. Mešanica komponent se torej v koloni loči [85].

Količino ločenih komponent izmeri detektor. Detektor pretvori količino vsake spojine v električni signal in ta signal pošlje v enoto za obdelovanje podatkov. Pomembno je, da so detektorji zanesljivi, ponovljivi ter stabilni in neobčutljivi na visoke temperature, ki lahko znašajo tudi do 400 °C. Odzivni časi morajo biti kratki in tudi neodvisni od pretoka. Najpogosteje se uporablja plamensko ionizacijski detektor oziroma po angleško flame ionization detector ali na kratko FID. Delovanje FID detektorja temelji na detekciji ionov, ki nastanejo pri izgorevanju organskih spojin v vodikovem plamenu. Nastajanje teh ionov je sorazmerno s koncentracijo organskih spojin v plinskem toku vzorca.

Kolone, ki se uporabljajo, so običajno narejene iz jekla, stekla, teflona ali silicijevega dioksida in so dolge med 2 in 5 m. Kolone so lahko zaprte oziroma polnjene ali pa kapilarne. Polnjene so za uporabo cenejše, vendar pa kapilarne kolone boljše ločujejo komponente in so zato vse bolj popularne, ne glede na njihovo višjo ceno.

Plinska kromatografija je zelo učinkovita in omogoči separacijo komponent kompleksnih mešanic v dokaj majhnem času. Omogoča tudi zelo natančno kvantifikacijo in kvalifikacijo. Slaba lastnost pa je, da je analiza omejena samo na komponente, ki so termično stabilne, imajo vrelišče do 400 °C in se pri višjih temperaturah ne razgradijo ter da je vzorec po analizi uničen in ga ne moremo ponovno uporabiti [83].

Ločimo dva tipa plinske kromatografije: plinsko-tekočo kromatografijo in plinsko-trdno kromatografijo. Najpogosteje je uporabljena plinsko-tekoča kromatografija, ki jo zaradi njene večinske uporabe imenujemo kar plinska kromatografija. Plinsko-trdna kromatografija temelji na trdni stacionarni fazi, ki zadržuje analite zaradi adsorbcije. Ima omejeno uporabo ravno zaradi zadrževanja molekul in močnega zaostajanja elucijskih vrhov. Zaostanek je posledica nelinearnega značaja adsorpcijskega procesa. Uporablja se samo za ločevanje nekaterih plinov z nizkimi molekulskimi masami. V našem primeru smo uporabili plinsko-tekočo kromatografijo [80].

Plinski kromatograf, ki smo ga uporabili pri eksperimentalnem delu, je prikazan na sliki 3-12.



Slika 3-12. Plinski kromatograf Agilent 7890A.

3.1.7.1 Topila

Kot omenjeno v poglavju 2.3, se pegasti badelj prodaja kot zdravilo ali kot prehranski dodatek. V primeru, da se v Evropi uporablja kot zdravilo, mora upoštevati zakonodajo, ki jo je predpisala Evropska agencija za živila, če pa se prodaja kot prehransko dopolnilo, pa mora ustrezati zakonodaji za živila in morajo topila ustrezati direktivi 2009/32/EU.

Evropska agencija za zdravila je zadolžena za potrjevanje in nadzor zdravil v Evropski uniji. Njena naloga je, da določi zahteve, ki se morajo pri izdelavi zdravil upoštevati, in nadzoruje, da so te zahteve res upoštevane.

Topila, ki se uporabljajo pri izdelovanju zdravil in živil, je razdelila v tri razrede. Cilj tega je bil določevanje sprejemljivih količin ostankov topil, ki ne vplivajo na zdravje pacienta.

Ostanki topil v izdelkih so opredeljeni kot organske hlapne kemikalije, ki se uporabljajo ali proizvajajo pri izdelavi zdravilnih učinkovin, pomožnih snovi ali pri pripravi zdravilnih izdelkov. S proizvodnimi tehnikami se topila nikoli ne odstranijo popolnoma. Zelo pomembna je ustrezna izbira topila za sintezo določene zdravilne snovi, saj lahko le-ta poveča izkoristek ali določi značilnosti produkta, kot so topnost, čistost in kristalna struktura.

Ker ostanki topil nimajo terapevtskih koristi, jih je treba čim več odstraniti. Količina topila v zdravilu ne sme presegati določenih mej. V ta namen je EMA razdelila topila v tri razrede.

V razred 1 spadajo topila, ki so zelo toksična in se jim je pri proizvodnji treba izogibati, razen če je njihova uporaba neizogibna. Sem spadajo topila, ki so znana kot rakotvorna, ki so domnevno rakotvorna, in tista, ki so zelo nevarna za okolje. V primeru, da so ta topila uporabljena, je treba njihove količine močno omejiti. Sem uvrščamo naslednja topila: benzen, 1,2-dikloroetan, 1,1-dikloroetan, 1,1,1-trikloroetan in druga.

V razred 2 spadajo topila, ki so manj toksična in spadajo med rakotvorne snovi za živali, ki niso genotoksične, možni povzročitelji drugih ireverzibilnih toksičnosti, ter ostala topila, za katere obstaja sum toksičnosti, ki pa je reverzibilna. Sem uvrščamo acetonitril, kloroform, cikloheksan, diklorometan, heksan, metanol, piridin, toluen in druga.

V razred 3 spadajo topila, ki so za uporabo najbolj zaželena, saj so tudi manj toksična in človeku niso nevarna, kadar jih ne zaužije več, kot so predpisane meje. Premalo pa je narejenih študij, ki preučujejo dolgotrajni vpliv teh topil na zdravje. Sem spadajo: aceton, etanol, etil acetat, etil eter, 2-propanol, pentan in druga.

Pri ekstrakciji olj smo poskusili tri topila: heksan, cikloheksan in etil acetat. Kar se tiče toksičnosti, je najboljši za uporabo etil acetat, ki ga Evropska agencija za zdravila uvršča v tretji razred. Njegova dovoljena vsebnost v zdravilih je 5000 ppm. Heksan in cikloheksan pa sta za zdravje bolj nevarna in ju uvrščamo v drugi razred. Heksana je v zdravilih lahko 290 ppm, cikloheksana pa 3880 ppm.

Pri ekstrakciji silimarina iz razmaščenega ekstrakta smo uporabili naslednja topila: aceton, etanol, metanol, acetonitril, 2-propanol in vodo. Od tega sta acetonitril in metanol uvrščena v drugi razred. Meja za količino acetonitrila je 410 ppm, metanola pa 3000 ppm. Aceton, etanol in 2-propanol pa spadajo v tretji razred in je meja za vse tri 5000 ppm [87].

Kadar pa pegasti badelj nastopa kot prehranski dodatek, mora ustrezati direktivi 2009/32/EU o ekstrakcijskih topilih, ki se uporabljajo v proizvodnji živil. Direktiva dovoljuje uporabo naslednjih topil: propana, butana, etil acetata, etanola, ogljikovega dioksida in acetona.

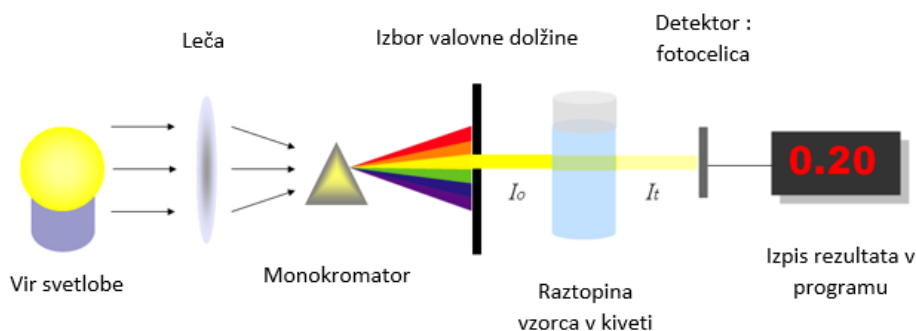
Heksan, metanol, 2-propanol in cikloheksan pa spadajo v skupino topil, za katere so pogoji uporabe točno določeni. Mejne vrednosti ostankov topil v ekstrahiranem živilu so za ta topila zelo nizke. Heksana in cikloheksana je v živilu lahko samo 1 ppm, metanola in propanola pa 10 ppm [88].

3.1.8 Spektrofotometrija

UV/VIS spektrofotometrija je tehnika, ki se uporablja za merjenje absorbance svetlobe v ultravijoličnem in vidnem območju elektromagnetnega spektra. Uporablja se za kvantifikacijo in kvalifikacijo vzorcev s pomočjo UV in vidne svetlobe (med 200 in 900 nm). Absorpcija svetlobe temelji na interakciji svetlobe z elektronskim in vibracijskim stanjem molekule. Vsaka molekula ima individualen nabor energetskih ravni, povezanih z njenimi kemičnimi vezmi, in bo zato absorbirala svetlobo določenih valovnih dolžin.

Njene prednosti so hitra in enostavna uporaba ter majhni stroški, zaradi česar je najbolj uporabljena eksperimentalna metoda za biokemijske eksperimente. Tudi fizikalni principi, na katerih temelji metoda, so enostavni. S primerjavo vpadnega sevanja in prepuščenega sevanja je količino svetlobe, ki jo vzorec absorbira, enostavno izračunati. Z uporabo Beer-Lambertovega zakona lahko absorpcijo uporabimo za merjenje koncentracij znanih topljencev. Beer-Lambertov zakon opisuje absorpcijo svetlobe pri prehodu skozi obarvano raztopino ali ne povsem prozorno snov.

Spektrofotometer je sestavljen iz vira svetlobe, monokromatorja, komore za vzorec in detektorja [89]. Princip delovanja spektrofometra lahko vidimo na sliki 3-13.



Slika 3-13. UV/VIS spektrofotometrija. Povzeto po [89].

UV/VIS spektrofotometer uporablja dva vira svetlobe. Za UV območje se uporablja devterijeva žarnica, za vidno območje pa volframova žarnica, za obe območji hkrati pa se običajno uporablja ksenonska žarnica. Pomemben je stabilen vir svetlobe, ki oddaja svetlobo v širokem razponu valovnih dolžin. UV izvor svetlobe je pogosto hlajen, da se prepreči pregrevanje.

V naslednjem koraku je treba izbrati določene valovne dolžine svetlobe, ki ustrezajo vrsti vzorca in analitu za detekcijo. Monokromator je naprava, ki s pomočjo leč ali ogledal usmeri žarek, s pomočjo izhodne rešetke pa preprečujejo nezaželenemu spektru svetlobe, da preide skozi merilno območje oziroma izberejo želeno valovno dolžino svetlobe. Namesto izhodne rešetke se lahko uporabijo tudi optični filtri, ki delujejo na principu absorpcije določenega spektra svetlobe zaradi posebnih kemikalij, ki so nanešene na stekleno ploščo.

Kiveta je posebna transparentna celica, ki je največkrat steklena. V primeru, da merimo v UV območju, pa mora biti kiveta izdelana iz kvarčnega stekla, saj navadne steklene kivete UV svetlobe ne prepuščajo. Uporabljajo pa se lahko tudi plastične kivete za enkratno uporabo. Po navadi je širine 1 cm, tako da je pot svetlobe skozi kiveto vedno enaka 1 cm. Pomembno je, da sestava kivete ne reagira z raztopinami, ki jih merimo.

Detektor pretvori svetlobo v sorazmeren električni signal, ki nato zagotovi odziv spektrofotometra.

Najpomembnejši del detektorja je fotocelica, ki vsebuje katodo in anodo, med katerima je velika napetost. Najpogostejši detektor je fotopomnoževalna celica. Sestavljena je iz fotoemisivne katode, ki emitira elektrone, ko jo zadenejo fotoni, več dinod, ki oddajo po več elektronov za vsak elektron, ki jih zadene, in anode, ki zbere vse emitirane elektrone. Nastali tok se na tak način močno ojača in posledično izmeri. Detektor je neposredno povezan s programskim paketom za analizo podatkov na računalniku [90]. Na sliki 3-14 je prikazan spektrofotometer, ki smo ga uporabljali za pomerjanje vzorcev.



Slika 3-14. Spektrofotometer Perkin Elmer Lambda 25.

3.2 Design Expert

Design Expert je zasnovalo podjetje Stat Ease. Je programska oprema, ki je bila zasnovana za pomoč pri oblikovanju in razlagi večfaktorskih eksperimentov. Gre za statistični programski

paket in ponuja široko paleto modelov, vključno s faktoriali, frakcijskimi fraktoriali in kompozitnimi modeli. Ponuja torej zmogljiva orodja za postavitev idealnega poskusa [91].

V našem magistrskem delu smo uporabili Box-Behnkenov način načrtovanja.

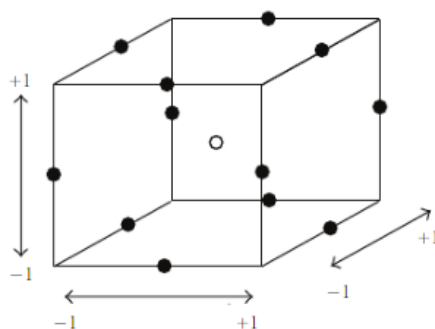
3.2.1 Box-Behnkenovo načrtovanje

Box-Behnkenovo načrtovanje je v statistiki eksperimentalno načrtovanje za metodologijo odzivnih površin. Leta 1960 sta ga zasnovala George E. P. Box in Donald Behnken. Z njim pa naj bi dosegli naslednje cilje:

- Vsak faktor ali neodvisna spremenljivka je pomaknjena na eno od treh enakomerno odmaknjenih vrednosti, ki so običajno kodirane kot -1 , 0 in 1 . Za izvajanje poskusov je treba izbrati vsaj tri vrednosti oziroma spremenljivke.
- Zasnova je lahko zadostna za prileganje kvadratnemu modelu, ki vključuje kvadratne učinke in interakcijske učinke med dejavniki. Vsebovati mora kvadratne člene, produkte dveh faktorjev, linearne člene in presek.
- Razmerje med številom eksperimentalnih točk in številom koeficientov v kvadratnem modelu mora biti razumno.

Poskusi se izvajajo na različnih vrednostih faktorjev, ki jih imenujemo nivoji. Box-Behnkenova metoda je zasnova metodologije odzivne površine, ki za izvajanje eksperimenta potrebuje le tri ravni. To je posebna 3-nivojska zasnova, ki ne vsebuje nobenih točk na ogliščih eksperimentalne regije, drugače povedano, izogiba se vsem vogalnim in zvezdastim točkam. Kombinacije obdelav so na sredinah robov procesnega prostora in v središču. To je koristno, če točke na vogalih predstavljajo kombinacije ravni, ki so pregrešno drage ali jih je nemogoče preizkusiti zaradi fizičnih omejitev postopka.

V primeru, da bomo imeli tri faktorje oziroma tri spremenljivke, bo načrt zasnovan takole: najprej določimo, katere tri spremenljivke nas bodo zanimale in določimo njihovo maksimalno ter minimalno vrednost. Minimalna vrednost je kodirana kot -1 , maksimalna pa kot 1 . Sistem bo nato določil še sredinsko točko, ki bo kodirana z 0 . V vseh možnih kombinacijah opazimo, da je vedno ena od spremenljivk kodirana z vrednostjo 0 , medtem ko sta ostali dve kodirani z različnimi kombinacijami -1 in 1 . Takšnih ponovitev je vseh skupaj 12, zadnja ponovitev pa predstavlja centralno točko. V centralni točki so vse tri spremenljivke kodirane z 0 . Običajno izvedemo več kot eno ponovitev centralne točke, saj s tem določimo napako vsote kvadrantov [92, 93, 94, 95]. Box-Behnkenov načrt za tri neznanke oziroma spremenljivke je prikazan na sliki 3-15.



Slika 3-15. Box-Behnkenov načrt za tri neznanke [92].

3.3 Farmakopeja

Farmakopeja je uradni farmacevtski priročnik, ki ga izda organ oblasti. Vsebuje osnovne podatke o zdravilnih učinkovinah, njihovem pridelovanju in navodila za kontrolo zdravil. V njej najdemo tudi predpise, kako zdravila shranjujemo in odmerjamo. Farmacija namreč spada pod eno od zakonsko najbolj urejenih in nadzorovanih področij. Veljajo strogi predpisi, ki se jih je treba držati, da se zagotovi kakovost, učinkovitost in predvsem varnost zdravil. Ti predpisi so zbrani v farmakopeji. Vsak članek se navezuje na eno farmacevtsko snov in se imenuje monografija [96, 97].

V Sloveniji velja, da morajo biti vsa zdravila in prehranski dodatki pridelani pri nas, po standardih evropske farmakopeje, ki v naši državi velja od leta 1997. Leta 1998 pa smo dobili tudi nacionalni dodatek k Evropski farmakopeji *Formularium slovenicum*.

V primeru, da nacionalni dodatek ali Evropska farmakopeja ne vsebujeta monografije za izdelavo določenega zdravila, se uporabi farmakopeja, ki velja v eni od držav, ki ima organiziran inšpekcijski nadzor izdelave zdravil v skladu z mednarodnimi pogodbami [98].

V magistrskem delu smo uporabili metode iz Evropske farmakopeje, izdaje 10.8.

4 Eksperimentalni del

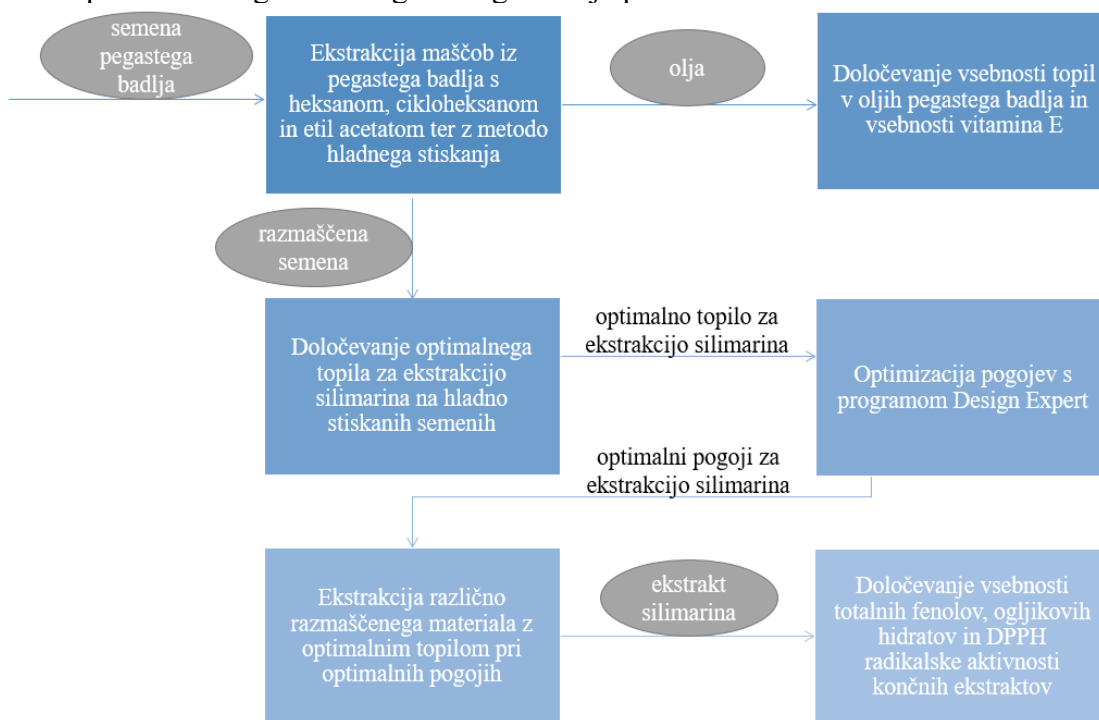
Eksperimentalni del smo začeli z razmaščevanjem semen. Iz nekaj semen smo olje iztisnili z metodo hladnega stiskanja, iz drugih pa smo olje odstranjevali s pomočjo različnih topil. Nato smo se lotili določevanja najbolj optimalnega topila za ekstrakcijo silimarina, kjer smo pri enakih pogojih izvedli ekstrakcije razmaščene materiala z različnimi topili. Vsebnost silimarina smo preverili s pomočjo tekočinske kromatografije. Ko smo določili najboljše topilo, smo začeli načrtovati eksperiment v računalniškem programu Design Expert 13. V sklopu načrtovanja ekstrakcij s programom smo izvedli 15 ekstrakcij, s pomočjo katerih smo določili optimalne pogoje ekstrakcije.

Ko smo imeli določene optimalne pogoje in optimalno topilo, smo s semeni, ki so bila razmaščena na različne načine, izvedli optimalno ekstrakcijo, ki nam jo je določil računalniški program. V dobljenih ekstraktih smo preverili vsebnost silimarina in tako dobili najboljšo možno kombinacijo razmaščevanja in ekstrakcije silimarina.

Vse dobljene ekstrakte smo analizirali še na skupne polifenole, ogljikove hidrate in antioksidativno aktivnost.

Olja, pridobljena na različne načine, smo analizirali na vsebnost vitamina E s pomočjo tekočinske kromatografije, hkrati pa smo preverili njihovo antioksidativno aktivnost.

Načrt eksperimentalnega dela magistrskega dela je prikazan na sliki 4-1.



Slika 4-1. Načrt eksperimentalnega dela.

4.1 Ekstrakcije

V sklopu ekstrakcij smo izvedli ekstrakcije maščobe iz semen pegastega badlja, ekstrakcije za določevanje optimalnega topila, ekstrakcije, s pomočjo katerih smo s programom Design Expert 13 določili optimalne pogoje in preveritev najbolj optimalnih pogojev na različno razmaščenenem materialu.

4.1.1 Ekstrakcija olj iz semen pegastega badlja

Ekstrakcija silimarina iz pegastega badlja se začne z razmaščevanjem semen. Kot omenjeno zgoraj, ta vsebujejo namreč okoli 20–30 % maščobe. Uporabljajo se topila z nizko polarnostjo, ki uspešno ekstrahirajo lipide. Po farmakopeji se za to ekstrakcijo uporablja heksan, ki je tudi najpogosteje uporabljeno topilo za ekstrakcijo olj. Omogoča enostavno ločitev produkta, prednost pa je tudi v tem, da ima nizko vrelišče. Ima pa tudi slabe lastnosti – je nevaren, toksičen in močno onesnažuje okolje. Zaradi tega smo se odločili, da ekstrakcijo izvedemo še z dvema topiloma, ki imata (tako kot heksan) nizko polarnost. Ti dve topili sta bili cikloheksan in etil acetat. Predvsem etil acetat velja za manj toksično topilo kot cikloheksan in je po direktivi 2009/32/EU in Evropski agenciji za zdravila bolj zaželeno topilo. Osnovne podatke o treh uporabljenih topilih lahko vidimo v tabeli 4-1.

Tabela 4-1. Osnovni fizikalni podatki uporabljenih topil za ekstrakcijo olja [99].

Topilo	Molekulska formula	$T_{vrel.}$ (°C)	ρ (g/cm ³ , 25 °C)	ϵ (As/Vm)	Relativna polarnost
heksan	C ₆ H ₁₄	56,1	0,655	1,88	0,009
cikloheksan	C ₆ H ₁₂	80,7	0,948	2,02	0,006
etil acetat	C ₄ H ₈ O ₂	77,0	0,894	6,02	0,228

Poleg ekstrakcije s pomočjo topil pa smo olje iztisnili tudi z metodo hladnega stiskanja, ki predstavlja najbolj ekološki in okolju prijazen način ekstrakcije. V magistrskem delu smo želeli dokazati, da stisnjena semena pegastega badlja vsebujejo največ silimarina, zato smo vse nadaljnje ekstrakcije izvajali iz stisnjenega materiala. Želeli smo preveriti tudi, kateri način razmaščevanja semen pridelava olje z največjo vsebnostjo vitamina E in katero ima največjo antioksidativno aktivnost.

4.1.1.1 Kemikalije in aparature

Kemikalije in material:

- heksan (Honeywell),
- cikloheksan (čistost $\geq 99,8$ %, Carlo Erba),
- etil acetat (čistost $\geq 99,9$ %, Carlo Erba),
- semena pegastega badlja.

Aparature:

- mlinček IKA Tube Mill 100 control,
- magnetno mešalo IKA RW 20 digital,
- tehtnica A&D GX-6100,
- rotavapor Büchi R-124.

4.1.1.2 Potek dela

Najprej smo semena pegastega badlja fino zamleli z mlinčkom in presejali čez sito z velikostjo odprtin 0,8 mm. Semena pegastega badlja, ki smo jih uporabili za ekstrakcijo, so prikazana na sliki 4-2.



Slika 4-2. Semena pegastega badlja.

Okoli 200 g zmletih semen pegastega badlja smo zatehtali v večje čaše. Razmerje topilo : material je znašalo 4 mL/g, kar pomeni, da smo materialu dodali 800 mL izbranega topila. Vsebinsko čaše smo mešali z mehanskim mešalom IKA RW 20 digital osem ur pri sobni temperaturi.

Po pretečenem času smo vsebinsko čašo nučirali, zbrano raztopino v nuči pa uparjali na rotavaporju na približno 40 °C. Uparjali smo tako dolgo, dokler v bučki ni ostalo samo olje oziroma se topilo ni več izločalo. Olje smo nato prelili v vialo in ga shranili v hladilniku za nadaljnje analiziranje. Razmaščena semena pa smo shranili, saj smo iz njih ekstrahirali silimarin.

Olje, ekstrahirano s topili, kljub uparjanju običajno vsebuje previsok delež topil, zato se ta v industriji odstranjuje s procesom rafinacije. Pri rafinaciji so olja za več ur izpostavljena temperaturam nad 200 °C. V laboratoriju smo poskusili ta proces vsaj približno imitirati, zato smo olje tri ure izpostavljali temperaturam okoli 220 °C.

Izkoristke ekstrakcij olja iz semen pegastega badlja smo izračunali s pomočjo enačb 4.1 in 4.2.

$$m_o = m_{b+o} - m_b \quad (4.1)$$

$$\eta = \frac{m_o \cdot 100}{m_{semen}} \quad (4.2)$$

kjer je:

m_{b+o}	masa bučke in olja po uparjanju (g)
m_b	masa bučke (g)
m_o	masa ekstrahiranega olja (g)
m_{semen}	masa zatehtanih semen za ekstrakcijo olja (g)
η	izkoristek ekstrakcije (%)

4.1.2 Določevanje optimalnega topila za ekstrakcijo silimarina

Preden smo ekstraksijske pogoje optimirali z računalniškim programom Design Expert 13, smo morali izbrati ustrezno topilo za ekstrakcijo silimarina. Po farmakopeji so kot uporabljena topila za ekstrakcijo silimarina iz pegastega badlja naštet tri možna, in sicer: aceton, metanol in etanol. Poleg teh treh smo se odločili preveriti še acetonitril, 2-propanol, etil acetat in vodo. Evropska agencija za zdravila dovoljuje vsa topila, ki smo jih uporabili, medtem ko po

direktivi 2009/32/EU acetonitril ni primeren za proizvodnjo prehranskih dopolnil. Značilnosti uporabljenih topil so zbrane v tabeli 4-2.

Tabela 4-2. Osnovni fizikalni podatki uporabljenih topil za ekstrakcijo silimarina [99].

Topilo	Molekulska formula	$T_{vrel.}$ (°C)	ρ (g/cm ³ , 25 °C)	ε (As/Vm)	Relativna polarnost
aceton	C ₃ H ₆ O	56,1	0,786	21,00	0,355
etanol	C ₂ H ₅ OH	78,2	0,789	24,55	0,654
metanol	CH ₃ OH	64,7	0,791	33,00	0,762
2-propanol	C ₃ H ₈ O	82,6	0,785	18,00	0,546
acetonitril	C ₂ H ₃ N	82,0	0,786	37,50	0,460
etil acetat	C ₄ H ₈ O ₂	77,0	0,894	6,02	0,228
voda	H ₂ O	100,0	0,997	80,1	1,000

Vse ekstrakcije smo izvedli pri enakih pogojih (razmerje topilo : razmaščen material = 3 mL/g, sobna temperatura, osem ur) in nato s pomočjo HPLC aparata določili tisto topilo, ki je dalo produkt z največjo vsebnostjo silimarina. To topilo smo nadalje uporabljali in optimirali pogoje ekstrakcije s programom Design Expert 13 za to topilo.

4.1.2.1 Kemikalije in aparature

Kemikalije in material:

- aceton (čistost $\geq 99,5$ %, Honeywell),
- etanol (čistost $\geq 99,8$ %, Honeywell),
- 2-propanol (čistost $\geq 99,8$ %, Honeywell),
- acetonitril (J. T. Baker),
- metanol (J. T. Baker),
- voda Milli Q (iz sistema),
- heksan (Honeywell),
- razmaščena semena pegastega badlja z metodo hladnega stiskanja.

Aparature:

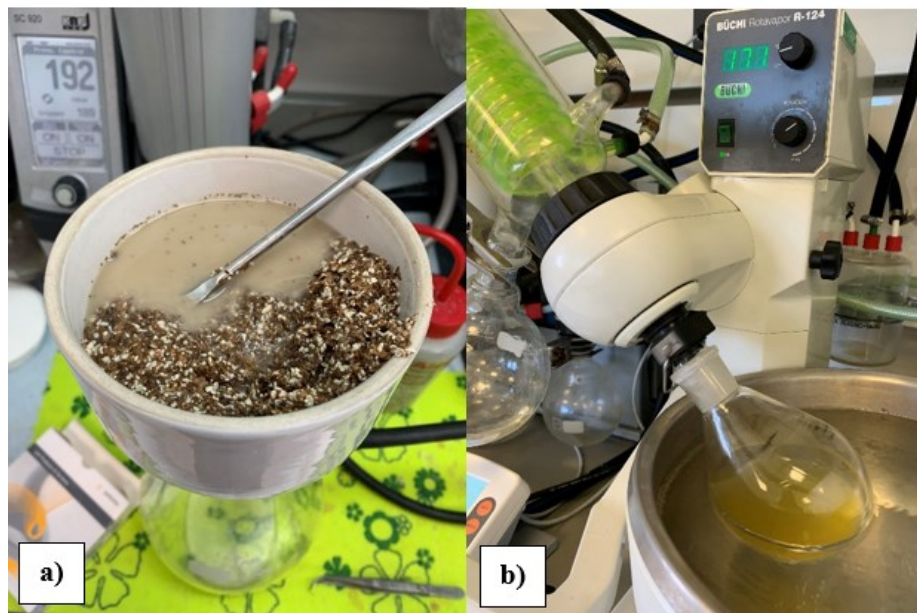
- mlinček IKA Tube Mill 100 control,
- tehtnica A&D GX-6100,
- magnetno mešalo z grelnikom IKA RCT basic,
- rotavapor Büchi R-124,
- vakuumski sušilnik Kambič VS-25 SC,
- analizator vlage Mettler Toledo HX204.

4.1.2.2 Potek dela

Ker je hladno stiskanje semen ekološko prijaznejše in daje običajno bolj zdrave in manj kontaminirane produkte, smo se odločili, da idealne pogoje in izbiro topila določamo samo na semenih, ki so bila hladno stiskana. Najprej smo hladno stiskana semena zamleli z mlinčkom.

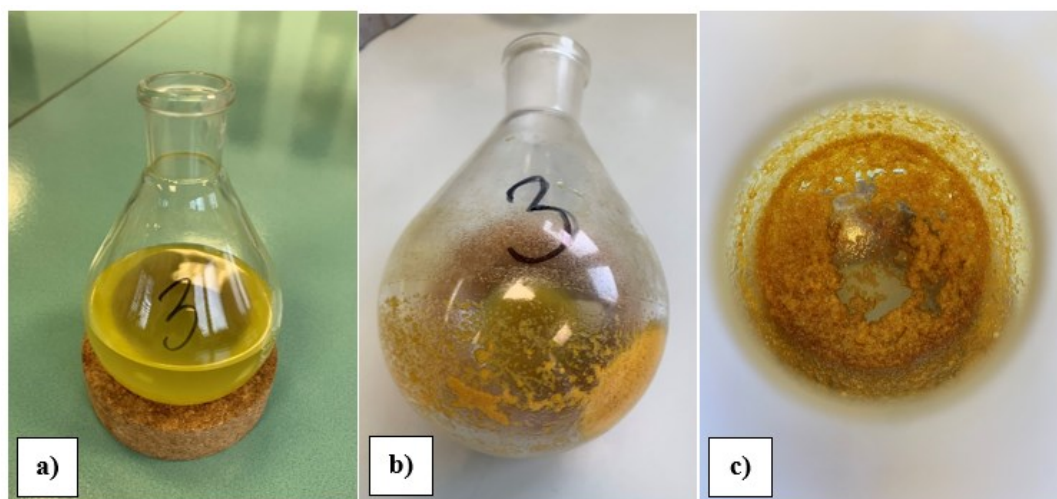
Za izbiro ustreznega topila smo v večje erlenmajerice zatehtali okoli 50 g vzorca ter dodali 150 mL ustreznega topila. Odločili smo se, da ekstrakcijo izvajamo pri razmerju topilo : material = 3 mL/g, osem ur in pri sobni temperaturi.

Čaše z vsebino smo mešali z magnetnim mešalom, po pretečenem času smo vsebino čaše nučirali, raztopino, ki se je ujela v nučo, pa z rotavaporjem uparjali do suhega. Na sliki 4-3 je prikazano vakuumsko uparjanje in vakuumsko filtriranje vzorcev.



Slika 4-3. Potek ekstrakcije: a) vakuumsko filtriranje razmaščenih semen, b) vakuumsko uparjanje vzorcev.

Kljub temu da so bila semena predhodno stisnjena, se je med ekstrakcijo ekstrahiralo tudi še nekaj preostalega olja. Kako je bil videti vzorec pred in po uparjanju, lahko vidimo na sliki 4-4.



Slika 4-4. Izgled vzorca: a) pred uparjanjem, b) po vakuumskem uparjanju, c) kristali v bučki po vakuumskem uparjanju.

Ker se je ekstrahiralo tudi nekaj olja, smo vsebino, ki se je ujela v bučki za uparjanje, izpirali s heksanom, da smo odstranili maščobe. Postopek izpiranja smo ponovili od 2- do 3-krat, ekstrakt pa smo s pomočjo spatul in žličk postrgali s sten bučk. Vsebinsko smo filtrirali čez filter papir, tako da je na filter papirju ostal trden ekstrakt.

Dobljeni ekstrakti so bili še malo lepljivi, zato smo vse skupaj sušili v vakuumskem sušilniku pri znižanem tlaku in na približno 40 °C okoli dve uri. Ko so se filter papirji z vsebino ohladili, smo ekstrakt s filter papirja postrgali v vialo.

Zanimala nas je vsebnost silimarina in s katerim topilom dobimo le-tega v ekstraktu največ. Ekstrakte smo analizirali s pomočjo tekočinske kromatografije ultra visoke ločljivosti. Ekstraktom smo izmerili tudi suho snov z analizatorjem vlage in preračunali vsebnost silimarina glede na odstotek suhe snovi.

Zanimal pa nas je tudi izkoristek posamezne ekstrakcije. Produkt, ki smo ga dobili po uparjanju, je vseboval trdni ekstrakt in tudi olje. Najprej smo izkoristek ekstrakcije preračunali glede na dobljeno maso olja in trdnega ekstrakta, preden smo olje s pomočjo heksana odstranili iz vzorcev. Uporabili smo enačbi 4.3 in 4.4:

$$m_{o+ekstr} = m_{b+o+ekstr} - m_b \quad (4.3)$$

$$\eta_{o+ekstr} = \frac{m_{o+ekstr} \cdot 100}{m_{razmaščenih\ semen}} \quad (4.4)$$

kjer je:

$m_{o+ekstr}$	masa ekstrahiranega olja in trdnega ekstrakta (g)
$m_{b+o+ekstr}$	masa bučke, ekstrahiranega olja in trdnega ekstrakta (g)
m_b	masa bučke (g)
$\eta_{o+ekstr}$	izkoristek ekstrakcije glede na količino ekstrahiranega olja in trdnega ekstrakta (%)

Izkoristek ekstrakcije pa smo izračunali še po izpiranju s heksanom, ko se je iz vzorca izpralo olje in je ostal samo še trden ekstrakt, ki smo ga postrgali v vialo. Tako smo lahko ocenili, katero topilo je ekstrahiralo več trdnega ekstrakta in katero več olja. Uporabili smo naslednje enačbe (4.5 in 4.6):

$$m_{ekstr} = m_{v+ekstr} - m_v \quad (4.5)$$

$$\eta_{ekstr} = \frac{m_{ekstr} \cdot 100}{m_{razmaščenih\ semen}} \quad (4.6)$$

kjer je:

$m_{v+ekstr}$	masa vialo in trdnega ekstrakta (g)
m_{ekstr}	masa trdnega ekstrakta (g)
m_v	masa vialo (g)
$m_{razmaščenih\ semen}$	masa zatehtanih razmaščenih semen pegastega badlja za ekstrakcijo silimarina (g)
η_{ekstr}	izkoristek ekstrakcije glede na količino ekstrahiranega trdnega ekstrakta (%)

4.1.3 Optimizacija pogojev ekstrakcije silimarina iz hladno stiskanih semen s programom Design Expert

Za optimalno topilo smo določili aceton. Nato smo začeli načrtovati eksperiment v programu Design Expert 13. Uporabili smo Box-Behnkenovo metodo. Odločili smo se, da bomo spreminjali naslednje pogoje ekstrakcije: temperaturo, razmerje topilo : material in čas ekstrakcije.

Za minimalno temperaturo ekstrakcije smo določili sobno temperaturo, maksimalna pa je znašala 50 °C. Tako smo se odločili zaradi vrelišča optimalnega topila – acetona. Določili smo tudi razpon razmerja topilo : material, in sicer od razmerja 2 mL/g do razmerja 4 mL/g in razpon časa ekstrakcije, kjer je maksimalni čas znašal 12 ur, minimalni pa štiri ure. Ko smo vnesli zelene intervale spremenljivk, nam je program ustvaril eksperimentalni načrt, ki je obsegal 15 ekstraktij. Ekstrakcije so zajemale 13 različnih kombinacij spremenljivk in še dve ponovitvi centralne točke. Ekstrakcijski načrt, ki nam ga je določil program Design Expert 13, lahko vidimo v tabeli 4-3.

Tabela 4-3. Ekstrakcijski načrt ekstraktij silimarina z acetonom, iz predhodno stiskanih semen, programa Design Expert 13.

Ekstrakcija	Faktor 1 A: Temperatura [°C]	Faktor 2 B: Čas [h]	Faktor 3 C: Razmerje topilo/material [mL/g]
1	25	4	3
2	50	4	3
3	25	12	3
4	50	12	3
5	25	8	2
6	50	8	2
7	25	8	4
8	50	8	4
9	37,5	4	2
10	37,5	12	2
11	37,5	4	4
12	37,5	12	4
13	37,5	8	3
14	37,5	8	3
15	37,5	8	3

Program sam kodira spremenljivke glede na maksimalne in minimalne vrednosti, ki mu jih določimo. Maksimalne vrednosti so kodirane z 1, minimalne z -1, vmesna vrednost pa je kodirana z 0. Tako je minimalna temperatura 25 °C kodirana z -1, maksimalna, ki znaša 50 °C, je kodirana z 1, kot vmesna pa je bila izračunana temperatura 37,5 °C, ki je kodirana z 0. Enako je pri času, kjer je za vmesni čas izračunano povprečje osem ur, za razmerje topilo : material pa je povprečje razmerje 3 mL/g.

V tabeli 4-4 so zbrane spremenljivke in kako so le-te bile kodirane.

Tabela 4-4. Kodirane spremenljivke ekstrakcijskega načrta ekstrakcij silimarina z acetonom, iz predhodno stiskanih semen, ki nam jih je določil program Design Expert 13.

Spremenljivke	Vrednosti		
	-1	0	1
temperatura	25	37,5	50
čas	4	8	12
razmerje topilo : material	2	3	4

4.1.3.1 Kemikalije in aparature

Kemikalije in material:

- aceton (čistost $\geq 99,5$ %, Honeywell),
- heksan (Honeywell),
- razmaščena semena pegastega badlja z metodo hladnega stiskanja.

Aparature:

- tehtnica A&D GX-6100,
- magnetno mešalo z grelnikom IKA RCT basic,
- rotavapor Büchi R-124,
- vakuumski sušilnik Kambič VS-25 SC.

4.1.3.2 Potek dela

Ekstrakcije smo tokrat izvajali iz stisnjene materiala, samo s topilom, ki se je predhodno izkazalo za najboljše – acetonom.

Zatehtali smo okoli 100 g zmletega razmaščenega materiala in dodali ustrezno količino topila. Nato smo vzorce mešali različno dolgo časa z magnetnim mešalom pri konstantni temperaturi, ki smo jo vzdrževali z grelniki, tako kot nam je določil program Design Expert 13.

Zmesi smo po pretečenem času nučirali, vsebino v nuči uparili do suhega na rotavaporju in jo s pomočjo heksana izprali iz bučke ter prefiltrirali. Filter papirje z ekstraktom smo za dve uri postavili v vakuumski sušilnik, da se je ekstrakt povsem posušil, produkt pa na koncu iz filter papirja postrgali v vialo. Dobili smo 13 vzorcev.

Vse vzorce smo ponovno analizirali na vsebnost silimarina na UPLC aparatu. Rezultate smo nato analizirali s pomočjo programa Design Expert 13, ki nam je določil najbolj optimalne pogoje ekstrakcije.

4.1.4 Ekstrakcija silimarina iz različno razmaščenega materiala pri optimalnih pogojih

Po vnosu dobljenih rezultatov v program Design Expert 13 smo lahko določili najbolj optimalne pogoje ekstrakcije. Za konec smo pri točno teh pogojih izvedli ekstrakcije materiala, ki je bil razmaščen na različne načine: s heksanom, s cikloheksanom, z etil acetatom in s hladno stiskanim materialom. Ekstrakcijo smo izvedli tudi na materialu, ki še ni bil predhodno razmaščen, da smo lahko ugotovili, ali je predhodno razmaščevanje semen res potrebno.

4.1.4.1 Kemikalije in aparature

Kemikalije in material:

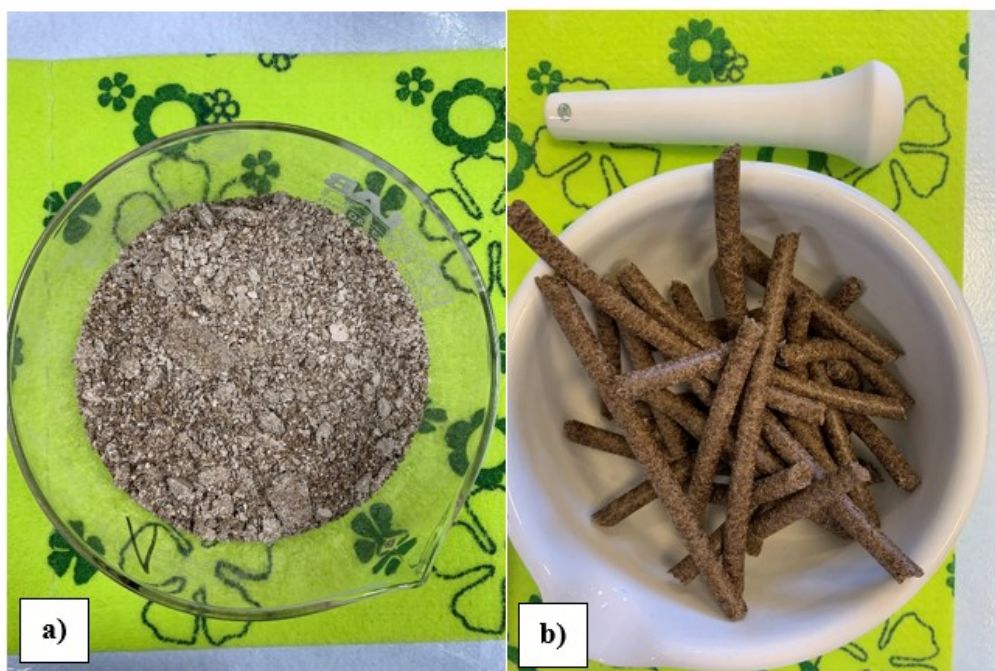
- razmaščena semena pegastega badlja na različne načine,
- nerazmaščena semena pegastega badlja,
- aceton (čistost $\geq 99,5\%$, Honeywell),
- heksan (Honeywell).

Aparature:

- tehtnica A&D GX-6100,
- mlinček IKA Tube Mill 100 control,
- magnetno mešalo z grelnikom IKA RCT basic,
- rotavapor Büchi R-124,
- vakuumski sušilnik Kambič VS-25 SC.

4.1.4.2 Potek dela

Za ekstrakcijo smo uporabili material, razmaščen s topli ali pa s hladnim stiskanjem. Kako je bil videti ta material, lahko vidimo na sliki 4-5.



Slika 4-5. Material, uporabljen za ekstrakcijo silimarina z acetonom pri optimalnih pogojih: a) semena, razmaščena s heksanom, b) semena razmaščena s hladnim stiskanjem.

Hladno stiskan material smo morali pred ekstrakcijo zmlati z mlinčkom. Imeli smo določeno optimalno temperaturo, razmerje topilo : material in čas ekstrakcij, ki smo jih predhodno določili s programom Design Expert 13. Pri optimalni temperaturi, času in razmerju topilo : material smo izvedli vseh pet ekstrakcij po enakem postopku kot prej. Vse dobljene ekstrakte smo nato analizirali na vsebnost silimarina s pomočjo UPLC aparata, na vsebnost fenolov, ogljikovih hidratov ter antioksidativno aktivnost.

4.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

S tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti (UPLC) smo analizirali vsebnosti silimarina v ekstraktih, s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) pa vsebnosti vitamina E v različno pridobljenih oljih.

4.2.1 Določanje vsebnosti silimarina v ekstraktih

Za določanje silimarina v ekstraktih smo uporabljali metodo iz Evropske farmakopeje, izdaja 10.8.

4.2.1.1 Kemikalije in aparature

Kemikalije in material:

- Milli Q voda (iz sistema),
- metanol (J. T. Baker),
- fosforna kislina (čistost 96 %, Carlo Erba),
- silimarin standard (EDQM),
- ekstrakti pegastega badlja.

Aparature:

- UPLC Waters Aquity,
- ultrazvočna kopel Haver & Boecker, Haver USC 200 MULTI.

4.2.1.2 Potek dela

Najprej smo si pripravili mobilni fazi A in B. Za mobilno fazo A smo morali zmešati 650 mL vode, 350 mL metanola in dodati 0,5 mL fosforne kisline, za mobilno fazo B pa 500 mL vode, 500 mL metanola in 0,5 mL fosforne kisline. Obe smo nekaj minut degazirali na ultrazvočni kopeli.

Pred pripravo vzorcev smo pripravili še standardno raztopino. V 100 mL bučko smo zatehtali 35 mg standarda silimarina in bučko do oznake napolnili z metanolom. Bučko smo za nekaj minut postavili na ultrazvočno kopel, nato počakali, da se je ohladila in vsebino filtrirali skozi HPLC filter v malo vialo.

Vzorci smo pripravili tako, da smo zatehtali okoli 60 mg vzorca v 100 mL bučko in jo do oznake napolnili z metanolom. Vzorce smo postavili na ultrazvočno kopel, tako da se je vsebina popolnoma raztopila. Pri nekaterih vzorcih je bilo raztapljanje hitrejše, pri drugih pa je trajalo kar precej časa. Bučke smo nato ohladili in vsebino filtrirali skozi HPLC filter v vialo. Vzorce smo zložili v avtomatski vzorčevalnik HPLC aparature, se na računalniku povezali s programsko opremo Empower in vpisali ustrezno sekvenco. Po končani analizi smo naše rezultate preučili.

Vsebnost silimarina in posameznih mešanic nam preračuna sam program za tekočinski kromatograf, uporablja pa naslednje enačbe :

$$\% \text{ totalnega silimarina} = \frac{(A_1 + A_2 + A_3 + A_4 + A_5 + A_6) \cdot m_1 \cdot p}{(A_7 + A_8) \cdot m_2} \quad (4.7)$$

$$\% \text{ silikristina + silidianina} = \frac{(A_1 + A_2) \cdot m_1 \cdot p}{(A_7 + A_8) \cdot m_2} \quad (4.8)$$

$$\% \text{ silibinina A + silibinina B} = \frac{(A_3 + A_4) \cdot m_1 \cdot p}{(A_7 + A_8) \cdot m_2} \quad (4.9)$$

$$\% \text{ izosilibinina A + izosilibinina B} = \frac{(A_5 + A_6) \cdot m_1 \cdot p}{(A_7 + A_8) \cdot m_2} \quad (4.10)$$

kjer je:

% totalnega silimarina	vsebnost totalnega silimarina (%)
% silikristina + silidianina	vsebnost silikristina in silidianina (%)
% silibinina A + silibinina B	vsebnost silibinina A in silibinina B (%)
% izosilibinina A + izosilibinina B	vsebnost izosilibinina A in izosilibinina B (%)
A ₁	območje pika silikristina testne raztopine
A ₂	območje pika silidianina testne raztopine
A ₃	območje pika silibinina A testne raztopine
A ₄	območje pika silibinina B testne raztopine
A ₅	območje pika isosilibinina A testne raztopine
A ₆	območje pika isosilibinina B testne raztopine
A ₇	območje pika silibinina A standardne raztopine
A ₈	območje pika silibinina B standardne raztopine
m ₁	masa zatehtanega standarda v g
m ₂	masa zatehtanega ekstrakta v g
p	odstotek standarda

Dobljene vsebnosti smo preračunali glede na suho snov. To smo storili s pomočjo enačbe 4.11.

$$\% \text{ totalni silimarini SS} \cdot \% \text{ SS} = \% \text{ totalnega silimarina} \cdot 100 \% \quad (4.11)$$

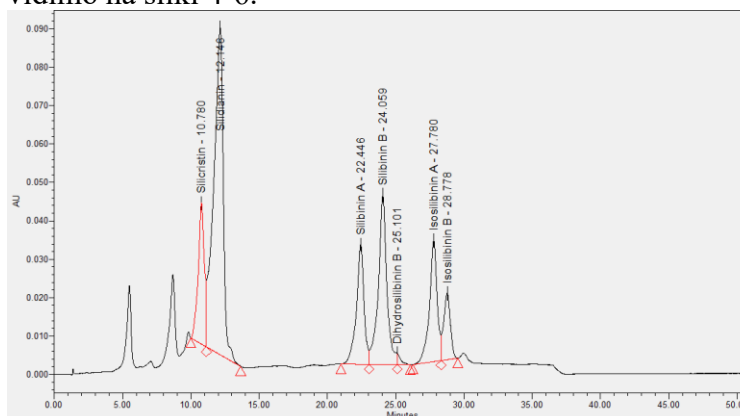
Enačbo smo preoblikovali:

$$\% \text{ totalni silimarini SS} = \frac{\% \text{ totalnega silimarina} \cdot 100 \%}{\% \text{ SS}} \quad (4.12)$$

Kjer je:

% totalni silimarini SS	vsebnost skupnega silimarina, preračunana na suho snov (%)
% SS	odstotek suhe snovi v vzorcu
% totalnega silimarina	vsebnost aktivne učinkovine

Skupni oziroma totalni silimarini je seštevek silikristina in silidianina, silibinina A in silibinina B ter izosilibinina A in izosilibinina B. Kako izgleda HPLC kromatogram standarda silimarina, lahko vidimo na sliki 4-6.



Slika 4-6. HPLC kromatogram silimarina.

4.2.2 Določevanje vsebnosti vitamina E v olju

Vitamin E oziroma tokoferole smo določali z interno metodo podjetja Vitiva, d. o. o., za analizo tokoferolov. Zanimal nas je predvsem α -tokoferol. Analizo smo izvedli s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti.

4.2.2.1 Kemikalije in aparature

Kemikalije in material:

- metanol (J. T. Baker),
- heksan (Honeywell),
- Milli Q voda (iz sistema),
- standardna mešanica tokoferolov: 23,8 % δ tokoferolov, 52,43 % γ tokoferolov, 12,59 % α tokoferola,
- olja pridobljena na različne načine.

Aparature:

- HPLC Agilent 1200,
- tehtnica Sartorius CPA224S,
- centrifuga Neolab 3-1810,
- ultrazvočna kopel Haver & Boecker, Haver USC 200 MULTI.

4.2.2.2 Potek dela

Pred začetkom priprave smo vse oljnate vzorce centrifugirali in tako odstranili nečistoče.

Najprej smo pripravili mobilno fazo, in sicer tako, da smo zmešali 950 mL metanola in 50 mL destilirane vode, vsebino pa smo za nekaj minut degazirali na ultrazvočni kopeli.

Standardno raztopino smo pripravili tako, da smo v 50 mL bučko zatehtali okoli 150 mg interne standardne mešanice in bučko napolnili do oznake v metanolu. Vsebinsko smo raztopili z uporabo ultrazvočne kopeli in jo po ohladitvi filtrirali skozi HPLC filter v male viale.

Nato je sledila priprava vzorcev. V 50 mL merilno bučko smo zatehtali okoli 500 mg vzorca in bučko dopolnili do oznake s heksanom. Vzorce smo raztopili na ultrazvočni kopeli, jih ohladili in filtrirali skozi HPLC filter v majhne viale. Vzorce smo nato analizirali s pomočjo HPLC aparata.

Vsebnosti nam preračuna HPLC aparat sam. Uporablja pa naslednjo enačbo:

$$\%_{\text{tokoferola}} = \frac{A_{\text{vzorca}} \cdot \%_{\text{std}} \cdot m_{\text{std}}}{A_{\text{std}} \cdot m_{\text{zatehte}}} \quad (4.13)$$

kjer je:

$\%_{\text{tokoferola}}$	vsebnost posameznega tokoferola (%)
A_{vzorca}	površina pika vzorca
$\%_{\text{std}}$	čistost standarda (%)
m_{std}	masa standarda (mg)
A_{std}	površina standarda posameznega tokoferola
m_{zatehte}	masa zatehtanega vzorca (mg)

4.3 Plinska kromatografija

S plinsko kromatografijo smo analizirali vsebnost topil v oljih, ki so bila pridobljena na različne načine.

4.3.1 Določevanje topil v oljih

Kot že omenjeno, smo za ekstrakcijo olja iz pegastega badlja uporabili tri topila: heksan, cikloheksan in etil acetat. Mešanico smo potem uparjali, da bi odstranili topila, vendar jih na tak način ne moremo odstraniti v celoti, zato topila v manjših količinah še vedno ostanejo prisotna v olju.

V industriji se ta olja za okoli pet ur izpostavijo visokim temperaturam, ki običajno znašajo okoli 250 °C, da iz olja izhlapijo vsa topila, ostane pa samo olje, ki je pri tako visokih temperaturah še stabilno. Na tako visokih temperaturah pa niso stabilni vitamini in steroli, ki se v olju nahajajo in mu dajejo medicinski pomen. Rezultat takšnega postopka so olja, ki nimajo veliko prehranske vrednosti in imajo tudi zelo malo pozitivnih vplivov na zdravje človeka.

Olje smo torej analizirali na vsebnost topil po uparjanju, nato pa smo v laboratoriju olje za tri ure izpostavili temperaturi 220 °C in s tem imitirali pogoje v industriji. Po treh urah smo olja ponovno analizirali na vsebnost topil in preverili, ali so se s tem postopkom le-ta res izločila iz olja.

4.3.1.1 Kemikalije in aparature

Kemikalije in material:

- dimetil formamid (čistost 99,8 %, Sigma Aldrich),
- olja pegastega badlja, pridobljena na različne načine.

Aparature:

- ultrazvočna kopel Haver & Boecker, Haver USC 200 MULTI,
- plinski kromatograf Agilent 7890A,
- tehtnica Sartorius CPA224S.

4.3.1.2 Potek dela

V posebne vialne, ki so namenjene uporabi za plinske kromatografe, smo zatehtali okoli 100 mg vzorca olja. Vzorcju smo dodali 1 mL dimetil formamida in vialo zamašili s posebnim neprepustnim pokrovčkom. Vse vialne smo za nekaj minut postavili na ultrazvočno kopel. Po ohladitvi smo jih prenesli v plinski kromatograf, vklopili aparat in napisali ustrezno sekvenco na računalniškem programu Empower, ki je povezan s plinskim kromatografom.

Vsebnost posameznega topila nam preračuna kar sam program za GC aparat. Najprej je treba posneti standarde za vsa topila, ki jih želimo kvantificirati, v našem primeru pa so bili standardi že posneti.

Za vsako posamezno topilo dobimo umeritveno krivuljo, katere enačba je zapisana pod enačbo številka 4.14 in predstavlja površino pika v odvisnosti od koncentracije topila.

$$A = a \cdot c + b \quad (4.14)$$

kjer je:

A	površina posameznega pika
a	naklon umeritvene premice za izbrano topilo
b	koncentracija, pri kateri umeritvena premica seka ordinatno os
c	koncentracija določenega topila (ppm)

S to enačbo si aparat pomaga preračunati vsebnost določenega topila. Za izračun koncentracije posameznega topila v vzorcu pa uporabi enačbo 4.15.

$$C_{topila} = \frac{(\frac{A_{vzorca} - b}{a} \cdot \%_{std} \cdot 1000000)}{m_{zatehte}} \quad (4.15)$$

kjer je:

C_{topila}	koncentracija posameznega topila (ppm)
A_{vzorca}	površina pika vzorca
$\%_{std}$	čistost standarda (%)
$m_{zatehte}$	masa zatehtanega vzorca (mg)

4.4 Spektrofotometrične metode

S spektrofotometrom smo določali vsebnost fenolov, vsebnost ogljikovih hidratov in antioksidativno aktivnost ekstraktov silimarina.

4.4.1 Določevanje vsebnosti totalnih fenolov

Vsebnost totalnih fenolov smo določili s Folin-Ciocalteujevo metodo s pomočjo UV/VIS spektrofotometra. Najprej smo morali pripraviti umeritveno krivuljo, kjer smo kot standard uporabili galno kislino (GA).

4.4.1.1 Kemikalije in aparature

Kemikalije in material:

- Milli Q voda (iz sistema),
- Folin-Ciocalteu reagent (Carlo Erba),
- natrijev karbonat (čistost $\geq 99,5\%$, Honeywell),
- galna kislina (čistost 97,5–100,5 %, Sigma Aldrich).

Aparature:

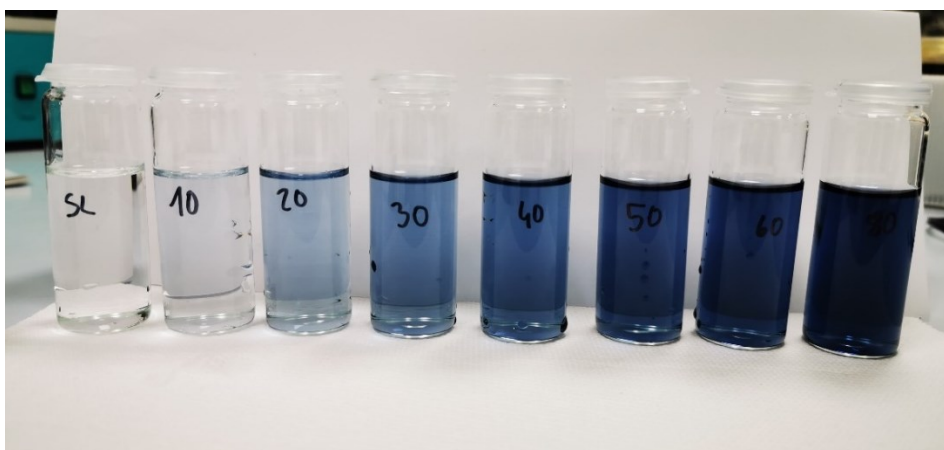
- analitska tehtnica Sartorius CPA224S,
- tehtnica Mettler Toledo XPR226DR,
- UV/VIS spektrofotometer PerkinElmer Lambda 25,
- ultrazvočna kopel Haver & Boecker, Haver USC 200 MULTI.

4.4.1.2 Potek dela

20 % vodno raztopino natrijevega karbonata smo pripravili tako, da smo zatehtali 20 g Na_2CO_3 v 100 mL bučko in jo do oznake napolnili z Milli Q vodo. Vsebino bučke smo mešali z magnetnim mešalom in jo rahlo segrevali, tako da se je vsebina popolnoma raztopila in postala bistra.

Folinov reagent smo pripravili tako, da smo v 100 mL bučko odpipetirali 10 mL Folin-Ciocalteu reagenta in bučko do oznake napolnili z vodo.

Za pripravo umeritvene krivulje smo najprej pripravili standardno raztopino galne kisline (400 mg/L), tako da smo zatehtali 40 mg galne kisline v 100 mL bučko in jo do oznake napolnili z Milli Q vodo. Bučko smo postavili za nekaj minut na ultrazvočno kopel, da se je vsebina bučke popolnoma raztopila. S pomočjo standardne raztopine galne kisline smo pripravili raztopine naslednjih koncentracij: 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L, 60 mg/L in 80 mg/L. V manjšo vialo smo odpipetirali 2 mL vzorca in dodali 10 mL raztopine Folin reagenta. Po natanko eni minuti smo dodali še 8 mL 20 % vodne raztopine Na₂CO₃. Tako pripravljeno raztopino smo termostatirali pet minut na 60 °C in jo nato ohlajali dve minuti v vodni kopeli s temperaturo 10 °C. Pripravili smo tudi slepo raztopino, ki smo jo pripravili tako, da smo namesto 2 mL vzorca odpipetirali 2 mL Milli Q vode. Vzorcem smo izmerili absorbance pri valovni dolžini 760 nm. Z dobljenimi podatki smo narisali umeritveno krivuljo v programu Excel. Na sliki 4-7 lahko vidimo vzorce standardnih raztopin različnih koncentracij, ki smo jih uporabili za risanje umeritvene krivulje.



Slika 4-7. Vzorca standardnih raztopin galne kisline za pripravo za umeritvene krivulje za analizo totalnih fenolov.

Narisali smo graf absorbance v odvisnosti od koncentracije galne kisline $A = f(\gamma_{GA})$ in določili enačbo premice (enačba 4.16):

$$A_{760} = k \cdot \gamma_{GA} + n \quad (4.16)$$

kjer je:

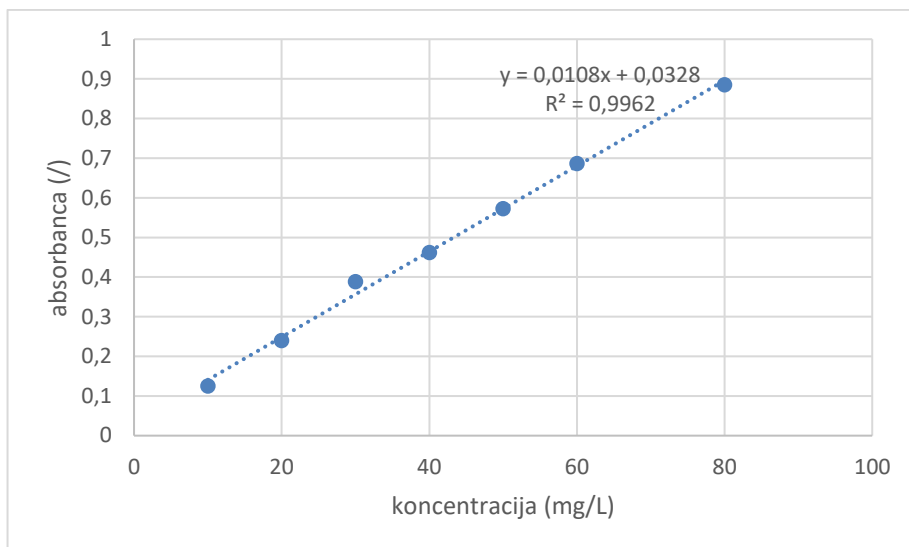
A_{760} absorbanca raztopine vzorca pri valovni dolžini 760 nm (l)

n odsek premice umeritvene krivulje na y osi (l)

k naklon umeritvene krivulje (mL/mg)

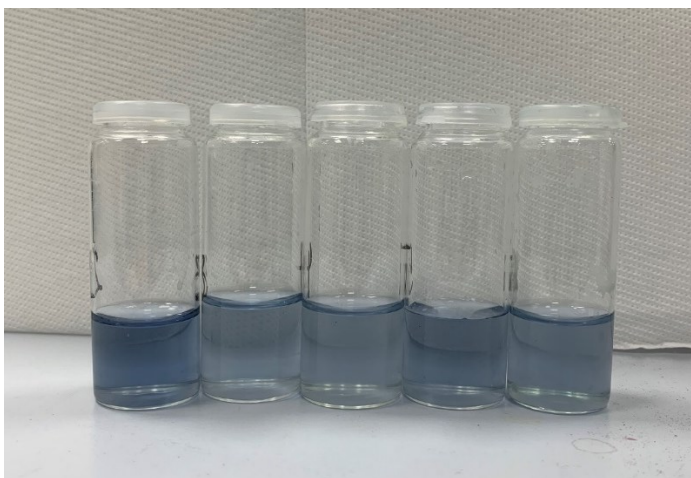
γ_{GA} koncentracija galne kisline v raztopini vzorca (mg/mL)

Dobljeno umeritveno krivuljo lahko vidimo na sliki 4-8.



Slika 4-8. Umeritvena krivulja za totalne polifenole.

Po pripravi umeritvene krivulje smo pripravili vzorce na enak način, kot smo pripravili tiste za umeritveno krivuljo. Pripravljeni vzorci so prikazani na sliki 4-9.



Slika 4-9. Vzorcei ekstraktov silimarina, v katerih smo določili vsebnost totalnih fenolov.

Iz izmerjenih absorbanca vzorcev smo s pomočjo enačbe 4.16 izračunali koncentracije galne kisline v vzorcih. Koncentracijo ekstrakta (γ_{vzorec}) v raztopini vzorca smo izračunali z enačbo:

$$\gamma_{vzorec} = \frac{m_{ekstrakt}}{V_{raztopine}} \quad (4.17)$$

kjer je:

γ_{vzorec} koncentracija ekstrakta v raztopini vzorca (mg/mL)

m_{vzorca} masa zatehte ekstrakta (mg)

$V_{raztopine}$ volumen raztopine vzorca = 100 mL

Vsebnost totalnih fenolov v ekstraktih smo izrazili v mg GA na g ekstrakta ($\omega_{GA \text{ ekstrakt}}$) ali v mg GA na g materiala ($\omega_{GA \text{ material}}$). Pomagali smo si z enačbami:

$$\omega_{GA \text{ ekstrakt}} = \frac{\gamma_{GA \text{ vzorec}}}{\gamma_{vzorec}} \quad (4.18)$$

$$\omega_{GA\ material} = \omega_{GA\ ekstrakt} \cdot \frac{\eta_{ekstr}}{100} \quad (4.19)$$

kjer je:

η_{ekstr}	izkoristek ekstrakcije glede na količino ekstrahiranega trdnega ekstrakta (%)
$\omega_{GA\ ekstrakt}$	vsebnost totalnih fenolov v ekstraktu (mg GA/g ekstrakta)
$\omega_{GA\ material}$	količina izoliranih totalnih fenolov na enoto mase materiala (mg GA/g materiala)
$\gamma_{GA\ vzorec}$	koncentracija galne kisline v vzorcu (mg/mL)

4.4.2 Določevanje vsebnosti totalnih ogljikovih hidratov

V vzorcih smo določili tudi vsebnost ogljikovih hidratov s pomočjo UV/VIS spektrofotometra. Tudi tukaj smo najprej pripravili umeritveno krivuljo. Za standard smo uporabili glukozo (GL).

4.4.2.1 Kemikalije in aparature

Kemikalije in material:

- fenol (čistost 99–100,5 %, Sigma Aldrich),
- Milli Q voda (iz sistema),
- glukoza ($\geq 99,5$ %, Sigma Aldrich),
- fosforna kislina ($\geq 99,0$ %, Sigma Aldrich).

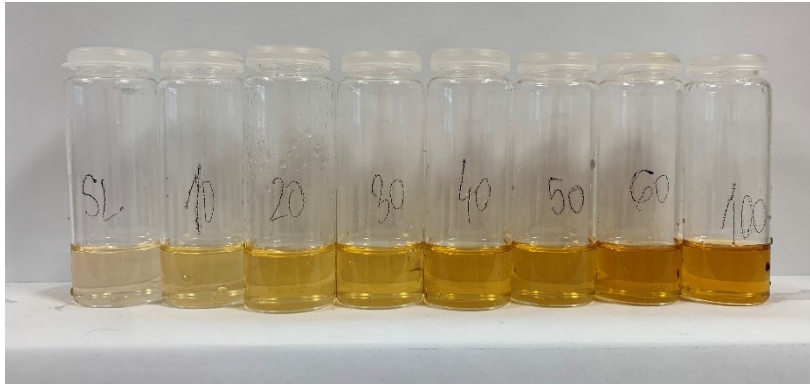
Aparature:

- tehtnica Mettler Toledo XPR226DR,
- ultrazvočna kopel Haver & Boecker, Haver USC 200 MULTI,
- UV-VIS spektrofotometer PerkinElmer Lambda 25.

4.4.2.2 Potek dela

Najprej smo pripravili 5 % vodno raztopino fenola tako, da smo v 100 mL bučko zatehtali 5 mg fenola in dopolnili bučko do oznake z Milli Q vodo. Bučko smo postavili na ultrazvočno kopel tako dolgo, da se je vsebina popolnoma raztopila.

Nato smo si pripravili umeritveno krivuljo odvisnosti absorbance od koncentracije ogljikovih hidratov. Pripravili smo vodne raztopine glukoze naslednjih koncentracij: 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L, 60 mg/L in 100 mg/L. To smo storili tako, da smo v 100 mL bučko zatehtali 10 mg glukoze in jo redčili z Milli-Q vodo do oznake – tako smo dobili raztopino s koncentracijo 100 mg/L, ki pa smo jo naprej redčili. V vialo smo odpipetirali po 2 mL vzorca, dodali 1 mL 5 % vodne raztopine fenola in 5 mL H₂SO₄. Pripravili smo tudi slepo probo, kjer smo namesto 2 mL vzorca dolili 2 mL Milli Q vode. Vialo smo pustili stati približno pol ure, vmes pa smo vsebino večkrat močno razmešali. Vzorcem, ki so se obarvali oranžno, smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 490 nm. Ko smo imeli umeritveno krivuljo uspešno narisano, smo pričeli s pripravo vzorcev. Na sliki 4-10 vidimo vzorce za umeritveno krivuljo za določevanje totalnih ogljikovih hidratov.



Slika 4-10. Vzorci standardnih raztopin glukoze za pripravo umeritvene krivulje za določevanje vsebnosti totalnih ogljikovih hidratov.

Narisali smo graf absorbance v odvisnosti od koncentracije $A = f(\gamma_{GL})$ in določili enačbo premice :

$$A_{490} = k \cdot \gamma_{GL} + n \quad (4.20)$$

kjer je:

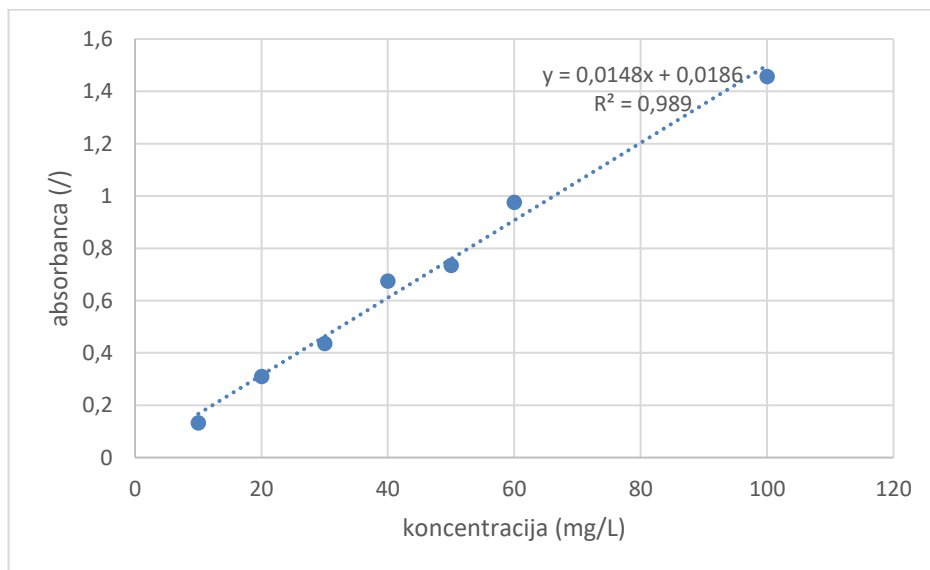
A_{490} absorbanca raztopine vzorca pri valovni dolžini 490 nm (l)

n odsek premice umeritvene krivulje na y osi (l)

k naklon umeritvene krivulje (mL/mg)

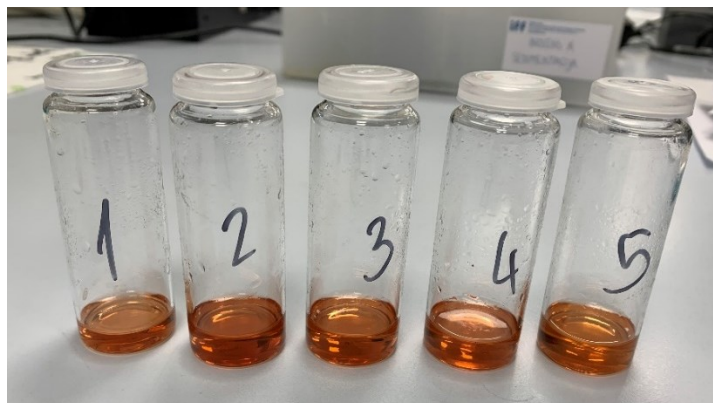
γ_{GL} koncentracija glukoze v raztopini vzorca (mg/mL)

Dobljeno umeritveno krivuljo za ogljikove hidrate lahko vidimo na sliki 4-11.



Slika 4-11. Umeritvena krivulja za totalne ogljikove hidrate.

Vzorci smo si pripravili tako, da smo v vialje zatehtali okoli 4 mg vzorca in dodali 8 mL Milli-Q vode. Vialje smo za nekaj minut postavili na ultrazvočno kopel. V drugih vialah smo, enako kot pri vzorcih za umeritveno krivuljo, pripravili zmes 2 mL vzorca, 1 mL 5 % vodne raztopine fenola in 5 mL H_2SO_4 . Pripravili smo tudi slepo probo. Po 30 minutah smo vzorcem izmerili absorbance pri valovni dolžini 490 nm. Vzorci so prikazani na sliki 4-12.



Slika 4-12. Vzorci ekstraktov silimarina, v katerih smo določili vsebnost totalnih ogljikovih hidratov.

Enačbo 4.20 smo preoblikovali enako kot za polifenole, le da smo tukaj računali vsebnost glukoze oziroma ogljikovih hidratov. Vsebnost ogljikovih hidratov v ekstraktih smo izrazili v mg GL na g ekstrakta ($\omega_{GL\ ekstrakt}$) in v materialu v mg GL na g materiala ($\omega_{GL\ material}$). Pomagali smo si z enačbami :

$$\gamma_{vzorec} = \frac{m_{ekstrakt}}{V_{raztopine}} \quad (4.21)$$

$$\omega_{GL\ ekstrakt} = \frac{\gamma_{GL\ vzorec}}{\gamma_{vzorec}} \quad (4.22)$$

$$\%_{GL\ v\ ekstraktu} = \frac{\omega_{GL\ ekstrakt}}{10} \quad (4.23)$$

$$\omega_{GL\ material} = \omega_{GL\ ekstrakt} \cdot \frac{\eta_{ekstrakcije}}{100} \quad (4.24)$$

kjer je:

$\gamma_{GL\ vzorec}$	koncentracija glukoze v vzorcu (mg/mL)
γ_{vzorec}	koncentracija ekstrakta v raztopini vzorca (mg/mL)
$m_{ekstrakt}$	masa zatehte ekstrakta (mg)
$V_{raztopine}$	volumen raztopine vzorca = 4 mL
η_{ekstr}	izkoristek ekstrakcije glede na količino ekstrahiranega trdnega ekstrakta (%)
$\omega_{GL\ ekstrakt}$	vsebnost ogljikovih hidratov v ekstraktu (mg GL/g ekstrakta)
$\omega_{GL\ material}$	količina izoliranih ogljikovih hidratov na enoto mase materiala (mg GL/g materiala)

4.4.3 DPPH radikalska aktivnost ekstraktov

Določevali smo tudi antioksidativno aktivnost ekstraktov, in sicer z DPPH radikalsko metodo.

4.4.3.1 Kemikalije in aparature

Kemikalije in material:

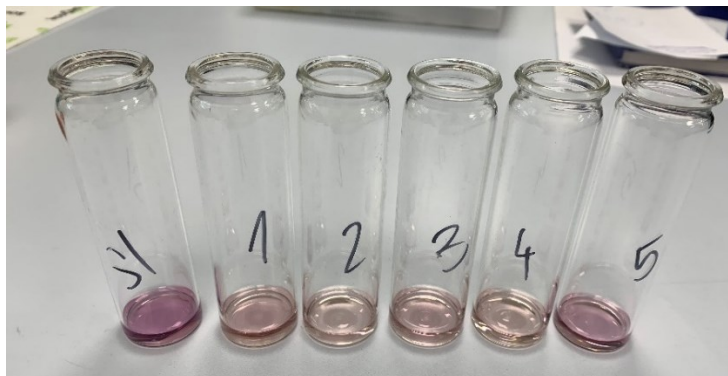
- DPPH prosti radikal (Merck),
- metanol (J. T. Baker).

Aparature:

- tehtnica Mettler Toledo XPR226DR,
- ultrazvočna kopel Haver & Boecker, Haver USC 200 MULTI,
- UV/VIS spektrofotometer PerkinElmer Lambda 25.

4.4.3.2 Potek dela

Najprej smo pripravili referenčno raztopino, in sicer $6 \cdot 10^{-5} M$ raztopino DPPH radikala v metanolu. To smo storili tako, da smo v 100 mL merilno bučko zatehtali 2,36 mg DPPH prostega radikala. Vsebino bučke smo do oznake razredčili z metanolom. Bučko smo za nekaj minut postavili na ultrazvočno kopel, da se je DPPH radikal popolnoma raztopil. Ker je metanolna raztopina DPPH radikala občutljiva na svetlobo, smo bučko zavili v aluminijasto folijo in jo shranili v temen prostor. Vzorce smo si pripravili tako, da smo v 10 mL bučko zatehtali po 10 mg vzorca ter vsebino redčili do oznake z metanolom. Vzorce smo za nekaj minut postavili na ultrazvočno kopel, da se je celotna vsebina raztopila. Ko so se bučke z ekstraktom ohladile, smo v majhne viale odpipetirali 6 mL metanolne raztopine DPPH radikala in dodali 154 μL raztopine ekstrakta. Vialo smo postavili v temen prostor za 15 minut. Po pretečenem času smo vzorcem izmerili absorbanco pri valovni dolžini 515 nm. Za slepo probo smo uporabili metanol. Referenčno raztopino smo pripravili tako, da smo v vialo odpipetirali 6 mL metanolne raztopine DPPH radikala in dodali 154 μL čistega metanola. Temu vzorcu smo absorbanco izmerili takoj. Vzorci so prikazani na sliki 4-13.



Slika 4-13. Vzorcei ekstraktov silimarina za določitev radikalske aktivnosti z DPPH metodo.

Antioksidativna aktivnost se podaja kot %inhibicije. Izračun temelji na primerjavi vzorcev z referenčno raztopino DPPH radikala in se izračuna po enačbi 4.25:

$$\% \text{ inhibicije} = \left(\frac{A_{ref}^0 - A_{vz}^{15}}{A_{ref}^0} \right) \cdot 100 \quad (4.25)$$

kjer je:

A_{ref}^0 = absorbanca referenčne raztopine v času 0 minut

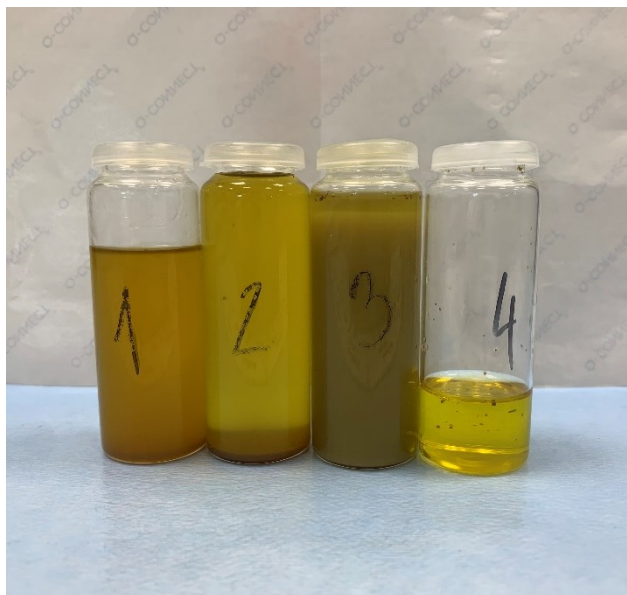
A_{vz}^{15} = absorbanca vzorca v času 15 minut

5 Rezultati in diskusija

5.1 Olje pegastega badlja

5.1.1 Ekstrakcija olja

Olja, ki smo jih ekstrahirali z različnimi topili oziroma pridobili s hladnim stiskanjem, lahko vidimo na sliki 5-1.

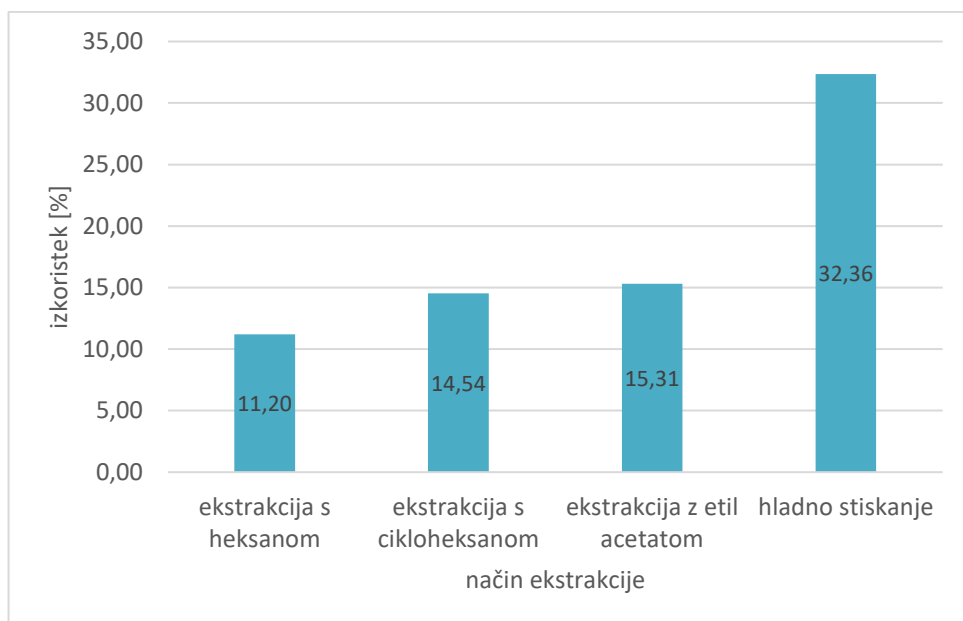


Slika 5-1. Olje pegastega badlja ekstrahirano z: 1 – heksanom, 2 – cikloheksanom, 3 – etil acetatom, 4 – hladnim stiskanjem.

Vzorec številka 1 vsebuje olje, ekstrahirano s heksanom, vzorec številka 2 olje, ekstrahirano s cikloheksanom, vzorec številka 3 olje, ekstrahirano z etil acetatom, vzorec številka 4 pa olje, ki smo ga pridobili z metodo hladnega stiskanja. Na sliki lahko vidimo, da so tri olja, pridobljena s pomočjo topil, precej motna, saj je bila slika posneta takoj po končanih ekstrahiranjih in se zato nečistoče še niso uspele posesti. Material, ki je bil hladno stiskan, je bil najbolj bister, vsebuje pa nekaj delčkov semen, ki se med filtriranjem oziroma usedanjem niso odstranila. Ravno zaradi teh nečistoč in delčkov semen smo olje pred analiziranjem centrifugirali.

Opazne so tudi razlike v barvi. Olje, ekstrahirano z etil acetatom, je bolj zelenkasto, tisto, ekstrahirano s heksanom, je bolj rjavkasto, olje, ekstrahirano s cikloheksanom, in hladno stiskano olje pa sta rumeni.

Ekstrakcijo s topili smo izvedli v laboratorijskem merilu, zato so bile zatehte materiala majhne. Proces hladnega stiskanja pa ni bilo mogoče izvesti v tako majhnem merilu, saj aparatura tako majhnih količin ne more procesirati in je zato zatehta posledično precej večja. Vse zatehte in izkoristki posameznih ekstrahiranj so zbrani v tabeli v prilogi 8.1. Grafični prikaz izkoristkov ekstrahiranj je prikazan na sliki 5-2.



Slika 5-2. Izkoristki ekstrakcije olja iz semen pegastega badlja v odvisnosti od načina razmaščevanja.

Od vseh različnih načinov ekstrakcije je bil izkoristek največji prav pri procesu hladnega stiskanja materiala in sicer je ta znašal 32,36 %. Izkoristki ekstrakcij z različnimi topili so bili za približno 2-krat manjši. Izmed treh topil, ki smo jih preizkusili, je najvišji izkoristek dala ekstrakcija z etil acetatom (15,31 %), zelo podoben je bil izkoristek pri ekstrakciji s cikloheksanom (14,54 %), najmanjši pa je bil s heksanom (11,20 %).

V praksi sicer velja, da naj bi ekstrakcije s topili dajale višje izkoristke kot pa proces hladnega stiskanja, vendar moramo upoštevati, da so bile ekstrakcije s topili izvedene v laboratorijskem merilu in niso bile optimirane.

5.1.2 Vsebnost topil

Olje, ki smo ga ekstrahirali s tremi različnimi topili, smo s pomočjo plinske kromatografije analizirali na vsebnost topil. Zanimalo nas je, koliko topila je ostalo v določenem olju. V industriji po končanem uparjanju ostane v olju okoli 1–2 % topila. To olje nato rafinirajo pri visokih temperaturah, da topilo izhlapi iz olja in to ostane prisotno samo v dovoljenih količinah.

Po klasifikaciji EMA se cikloheksan in heksan klasificirata v 2. skupino topil. To pomeni, da gre za topili, ki sta sicer toksični, vendar človeškemu telesu ne povzročata velike škode, kadar sta omejeni na predpisane količine. Cikloheksana je lahko v produktu maksimalno 3880 ppm oziroma 0,388 %, heksana pa 290 ppm oziroma 0,029 %.

Etil acetat spada v 3. skupino topil, ki predstavlja najmanj toksična topila, ki imajo na človeško zdravje najmanjši vpliv. Etil acetata je v produktu lahko 5000 ppm oziroma 0,5 %.

Po direktivi 2009/32/EU za prehranske dodatke pa je lahko cikloheksana in heksana v produktu maksimalno 1 ppm, oziroma 0,0001 %, etil acetata pa 5000 ppm, enako kot po klasifikaciji EMA.

V laboratoriju smo tudi naše vzorce olj, pridobljene s topili, izpostavili temperaturam, višjim od 200 °C za tri ure, in ugotavljali, ali so topila res izhlapela iz vzorcev. Analizirali smo torej topila pred in po izpostavitvi visokim temperaturam. Rezultati so predstavljeni v tabeli 5-1.

Tabela 5-1. Vsebnosti topil v oljih pegastega badlja, pridobljenih s tremi različnimi topili, pred in po termični obdelavi.

Uporabljeno topilo	Vsebnost topila pred termično obdelavo (%)	Vsebnost topila po termični obdelavi (%)
heksan	2,43	0,00002
cikloheksan	3,17	0,00005
etil acetat	9,01	0,00012

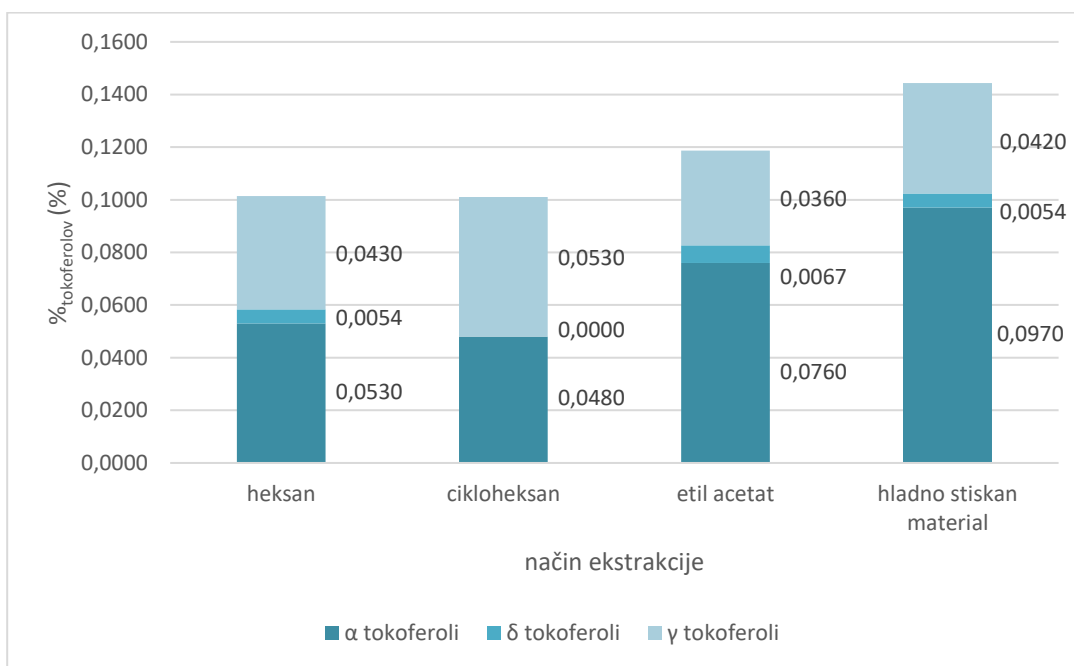
Vsebnost topil je pred termično obdelavo precej presegala dovoljene vrednosti. Izstopal je predvsem vzorec z etil acetatom, ki je vseboval kar 9,01 % topila. Po izpostavitvi visokim temperaturam pa so topila res izhlapela in je vsebnost topil pri vseh treh produktih zadoščala dovoljenim vrednostim klasifikacije EMA in tudi zahtevam direktive 2009/32/EU.

Razlog, da topila izhlapijo, je, da so vsa tri topila zelo hlapna. Hkrati smo jih segrevali na visoke temperature, ki so veliko višje od njihovih vrelišč, kar je povzročilo, da so topila še hitreje hlapela iz vzorca. Zaradi toksičnosti teh topil smo te eksperimente izvajali v zaprtem digestoriju. Topila se lahko na tak način odstranjujejo samo takrat, kadar imamo raztopino dveh komponent, kjer ima ena nizko, druga pa visoko vrelišče in je razlika med njunima vreliščema več kot 100 °C. Po podatkih ima olje pegastega badlja vrelišče 350 °C. V našem primeru je bil pogoj izpolnjen in smo lahko topila odstranjevali s pomočjo visokih temperatur [100, 101].

5.1.3 Vsebnost vitamina E v oljih

Vsebnost tokoferolov smo analizirali v različno pridobljenih oljih, preden smo olja izpostavili visokim temperaturam in preostanek topil uparili iz vzorcev. Zanimalo nas je, kje se nahaja največ tokoferolov in ali se ti med izpostavitvijo visokim temperaturam uničijo.

Rezultati vsebnosti tokoferolov pred izpostavitvijo olja visokim temperaturam so predstavljeni na sliki 5-3.



Slika 5-3. Vsebnosti tokoferolov v oljih pegastega badlja, pridobljenih na različne načine, pred termično obdelavo.

Vidimo, da je olje, ki je bilo hladno stiskano, imelo največji seštevek α , δ in γ tokoferolov (0,1444 %). Sledil mu je vzorec, ekstrahiran z etil acetatom (0,1187 %), približno enako tokoferolov pa sta vsebovala vzorca, ki sta bila ekstrahirana s heksanom (0,1014 %) in cikloheksanom (0,1010 %).

Vzorci so vsebovali najmanj δ tokoferola, ekstrakt, pridobljen s cikloheksanom, pa ga sploh ni vseboval. V vseh vzorcih, razen pri tistem, ekstrahiranem s cikloheksanom, je bilo prisotnega največ α tokoferola, ki je za človeško zdravje tudi najpomembnejši.

Nato smo olja, pridobljena s topili, izpostavili visokim temperaturam, da bi odstranili topila. Običajno velja, da aktivne učinkovine pri visokih temperaturah razpadejo. To smo preverili tako, da smo po termični obdelavi vzorce ponovno analizirali na vsebnost tokoferolov. Primerjavo vsebnosti tokoferolov v vzorcih pred in po termični obdelavi lahko vidimo v tabeli 5-2.

Tabela 5-2. Vsebnosti tokoferolov v oljih pegastega badlja, pridobljenih na različne načine, pred in po termični obdelavi.

Način razmaščevanja	% α tokoferolov (%)	% δ tokoferolov (%)	% γ tokoferolov (%)	%tokoferolov (%)
hladno stiskan material	0,0970	0,0054	0,0420	0,1444
ekstrakcija s heksanom	0,0530	0,0054	0,0430	0,1014
ekstrakcija s heksanom – po izhlapevanju topila	0,00038	0,00022	0,00003	0,00063
ekstrakcija s cikloheksanom	0,0480	0,0000	0,0530	0,1010
ekstrakcija s cikloheksanom – po izhlapevanju topila	0,00018	0,00000	0,00001	0,00019
ekstrakcija z etil acetatom	0,0760	0,0067	0,0360	0,1187
ekstrakcija z etil acetatom – po izhlapevanju topila	0,00032	0,00032	0,00002	0,00066

Po tem, ko smo produkt izpostavili visokim temperaturam, je sicer iz produkta izhlapela večina topil, vendar je visoka temperatura razgradila tokoferole. S tem smo dokazali, da z izpostavitvijo visokim temperaturam uničimo tokoferole v vzorcih.

Večina industrijsko pridobljenih olj se pridobiva s pomočjo topil, saj je izkoristek večji, postopek je hitrejši, cena postopka pa manjša. Problem industrijsko pridelanih olj s topili je ravno razgradnja aktivnih učinkovin, ki so v veliki meri občutljiva na tako visoke temperature. Tako je tudi s tokoferoli. Vsi antioksidanti so namreč zelo občutljivi na visoke temperature [102].

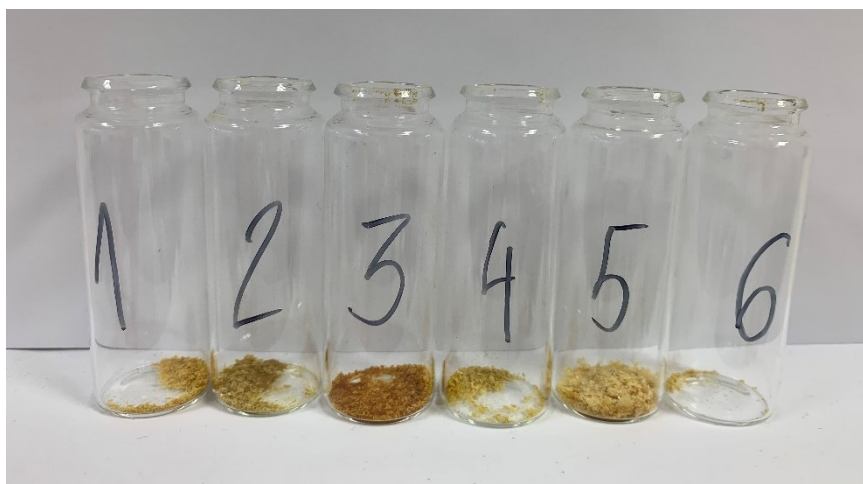
Kot pričakovano, je največ vitamina E vsebovalo olje, ki je bilo razmaščeno s hladnim stiskanjem. To je namreč tudi najbolj naravna možnost odstranjevanja olja iz semen, ki ohrani kvaliteto olja in vsebnost aktivnih komponent.

Med tremi topili, ki smo jih preizkusili, je največ tokoferolov pred toplotno obdelavo vsebovalo olje, ekstrahirano z etil acetatom, čeprav razlike niso bile velike. Etil acetat je v primerjavi s heksanom, ki se za tovrstne ekstrakcije največ uporablja, manj nevaren za uporabo, saj ima višje vrelišče in je zato težje vnetljiv. Je tudi okoli 30 % cenejši kot heksan [103].

5.2 Ekstrakt silimarina iz predhodno razmaščenih semen pegastega badlja

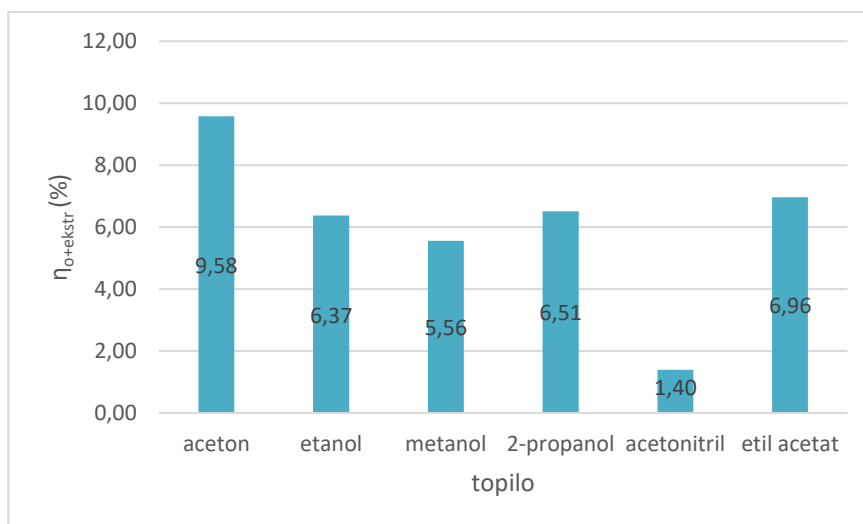
5.2.1 Izbira topila

Kot že omenjeno, smo ekstrakcijo predhodno razmaščenih semen pegastega badlja s hladnim stiskanjem izvedli z naslednjimi topili: aceton, metanol, etanol, 2-propanol, acetonitril in etil acetat. Poskusili smo tudi ekstrakcijo z vodo, ki bi bila, kar se tiče varnosti za zdravje, najugodnejše topilo, vendar je raztopina po ekstrakciji bila tako lepljiva, da je nismo mogli vakuumsko filtrirati, saj je zamašila filter papir, zato pa smo raztopino zavrgli. Ekstrakte silimarina, ekstrahirane z različnimi topili, lahko vidimo na sliki 5-4.



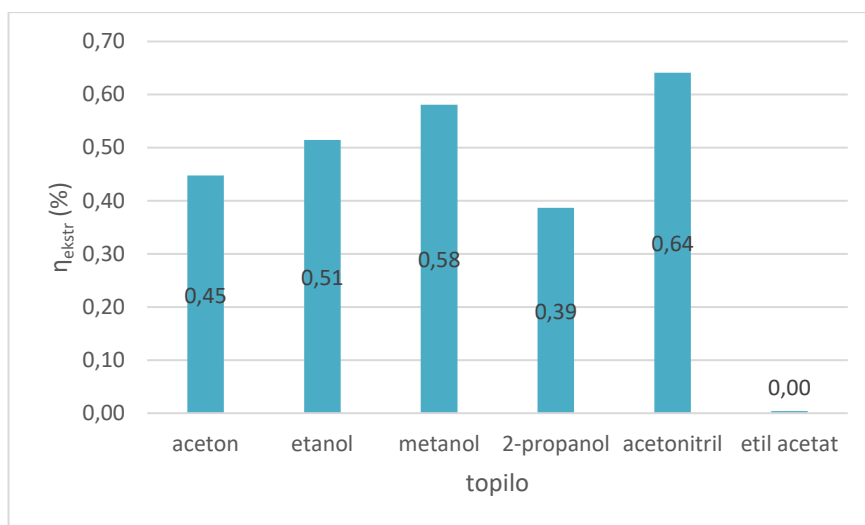
Slika 5-4. Posušeni ekstrakti silimarina, ekstrahirani z različnimi topili: 1 – acetonom, 2 – etanolom, 3 – metanolom, 4 – 2-propanolom, 5 – acetonitrilom in 6 – etil acetatom.

Izkoristki ekstrakcij so bili precej nizki. Najprej smo izkoristek preračunali glede na količino ekstrahiranega olja in trdnega ekstrakta, preden smo zmes izprali s heksanom, tako da smo se znebili maščob (slika 5-5).



Slika 5-5. Izkoristki ekstrakcij predhodno razmaščenih semen pegastega badlja s hladnim stiskanjem, v odvisnosti od uporabljenega topila, preračunani glede na dobljeno količino olja in trdnega ekstrakta.

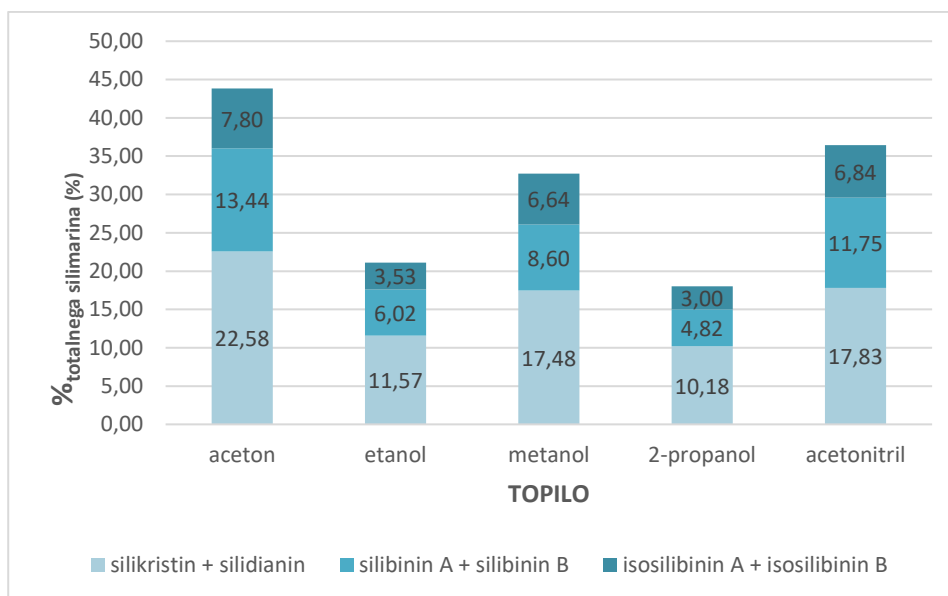
Izkoristek je bil najvišji pri ekstrakciji z acetonom (9,58 %), najmanjši pa pri ekstrakciji z acetonitrilom (1,40 %). Nato smo izkoristek ekstrakcij preračunali še samo glede na trden ekstrakt, ko smo ekstrahirano olje izprali iz vzorcev. Rezultate lahko vidimo na sliki 5-6.



Slika 5-6. Izkoristki ekstrakcij predhodno razmaščenih semen pegastega badlja s hladnim stiskanjem, v odvisnosti od uporabljenega topila, preračunani glede na količino trdnega ekstrakta

Izkoristek je bil v tem primeru največji pri ekstrakciji z acetonitrilom (0,64 %), najmanjši pa pri ekstrakciji z etil acetatom (0,00 %). Iz tega lahko ugotovimo, da je acetonitril ekstrahiralo malo olja in je bil njegov produkt v večini sestavljen iz trdnega ekstrakta. Etil acetat ni ekstrahiralo praktično nič trdnega ekstrakta, ekstrahiralo pa je veliko olja. To je bilo pričakovano, saj je etil acetat izmed vseh teh topil najbolj polaren, zanj pa je značilno, da bo najbolje ekstrahiralo maščobe. Podrobne podatke o izkoristkih navajamo v prilogi 8.2.

Na vsebnost silimarina smo analizirali naslednje vzorce: vzorec, ekstrahirano z acetonom, etanolom, metanolom, 2-propanolom in acetonitrilom. Pri ekstrakciji z etil acetatom smo dobili praktično samo olje, trdnega ekstrakta pa je bilo tako malo, da ga nismo imeli dovolj za analiziranje. Primeri izračunov in vsi dobljeni podatki so zbrani v prilogi 8.2. Grafični prikaz rezultatov pa lahko vidimo na sliki 5-7.



Slika 5-7. Vsebnosti silimarina v ekstraktih, dobljenimi z različnimi topili, iz razmaščenih semen pegastega badlja s hladnim stiskanjem pri pogojih: razmerje topilo : material = 3 mL/g, T = sobna temperatura, t = 8h.

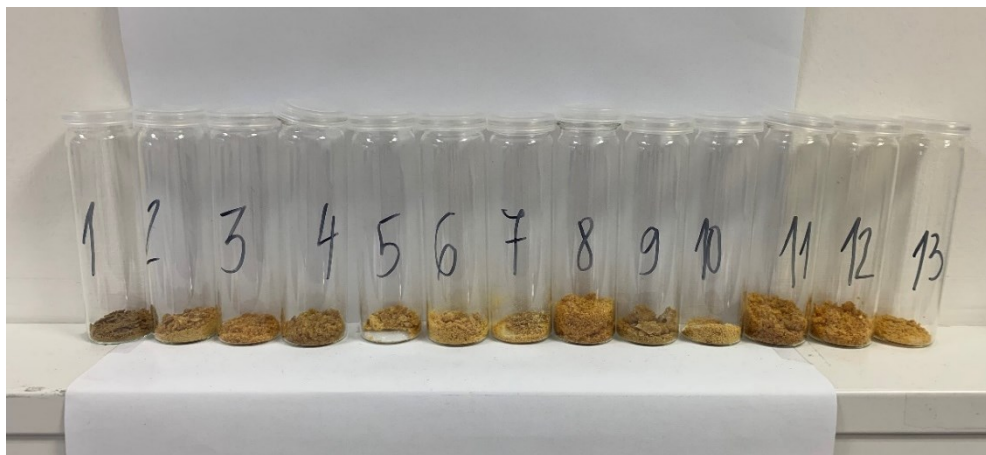
Kot najboljšo topilo se je izkazal aceton, ki je dal ekstrakt s 43,82 % skupnega silimarina. Sledil mu je acetonitril s 36,42 % vsebnostjo silimarina, tretji najboljši pa je bil metanol z 32,72 % vsebnostjo. Najslabši izmed vseh uporabljenih topil je bil 2-propanol. Rezultati so bili ugodni, saj aceton spada v tretji razred, kar se tiče toksičnosti in dovoljene vsebnosti topil po klasifikaciji EMA, in je po direktivi 2009/32/EU med odobrenimi topili za ekstrakcijo, zato je njegova uporaba precej bolj zaželena. V primeru, da bi želeli uporabiti acetonitril, pa moramo upoštevati, da se ta lahko uporablja samo za proizvodnjo zdravil in se ne sme uporabljati za proizvodnjo prehranskih dopolnil.

V vseh dobljenih ekstraktih je bila vsebnost silikristina in silidianina največja, sledila je vsebnost silibinina A in silibinin B, najmanj pa je bilo mešanice izosilibinina A in izosilibinina B.

Za silimarin velja, da se slabo topi v polarnih protičnih topilih in dobro v polarno aprotičnih topilih. V nepolarnih topilih je zelo slabo topen. Med polarno aprotična topila spadata acetonitril in aceton, ki sta dala produkta z najvišjo vsebnostjo silimarina, kar je v skladu s to trditvijo [104].

5.2.2 Optimizacija pogojev ekstrakcije razmaščenih semen pegastega badlja z acetonom

Program Design Expert 13 je oblikoval ekstrakcijski načrt, ki je obsegal 13 ekstrakcij in dve ponovitvi okoli centralne točke. Dobljeni ekstrakti so prikazani na sliki 5-8.



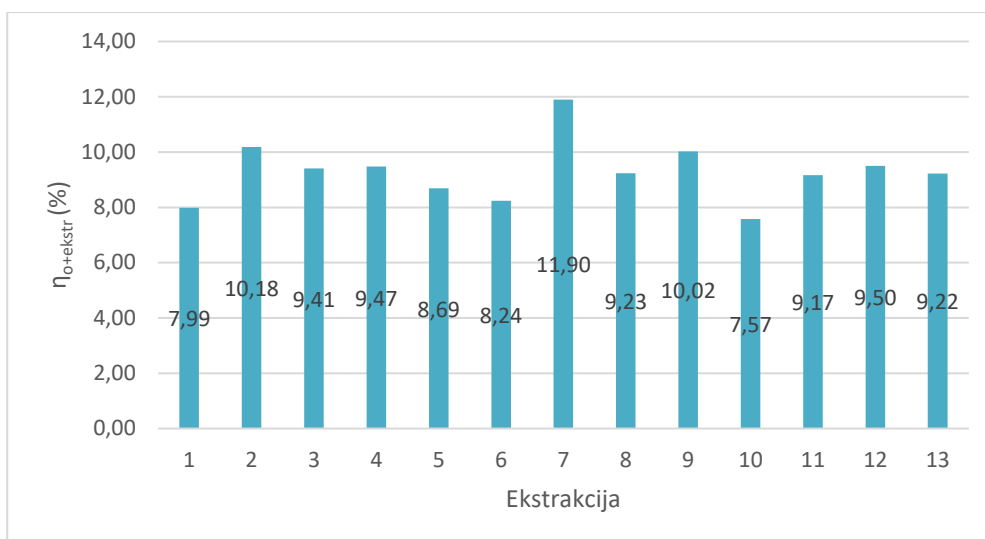
Slika 5-8. Ekstrakti silimarina iz hladno stiskanih semen, pridobljeni z acetonom, ekstrahirani po določenem ekstrakcijskem načrtu programa Design Expert 13 (tabela 5-3).

Pogoji, pri katerih je bil ekstrahiran posamezen vzorec, so predstavljeni v tabeli 5-3.

Tabela 5-3. Pogoji ekstrakcij za ekstrakcije silimarina iz predhodno razmaščenih semen s hladnim stiskanjem, z acetonom, pri pogojih, ki jih je določil program Design Expert 13.

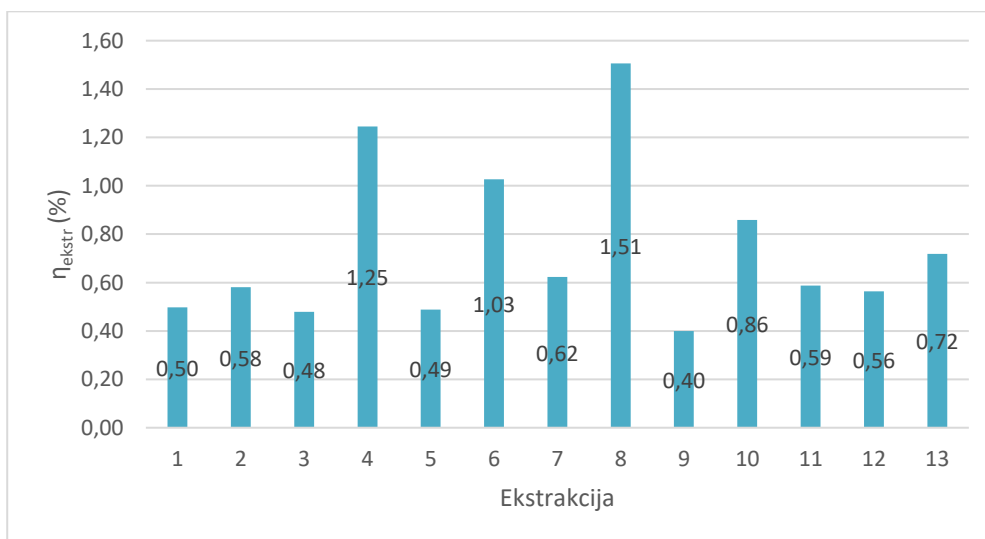
Vzorec	Temperatura (°C)	Čas ekstrakcije (h)	Razmerje topilo : material (mL/g)
1	25	4	3
2	50	4	3
3	25	12	3
4	50	12	3
5	25	8	2
6	50	8	2
7	25	8	4
8	50	8	4
9	38	4	2
10	38	12	2
11	38	4	4
12	38	12	4
13	38	8	3

Tudi tokrat so bili izkoristki precej nizki. Najprej smo jih preračunali glede na količino dobljenega ekstrahiranega olja in trdnega ekstrakta. Rezultati izkoristkov so zbrani na sliki 5-9. Natančnejše rezultate navajamo v prilogi 8.3.



Slika 5-9. Izkoristki ekstrakcij silimarina, iz predhodno razmaščenih semen pegastega badlja s hladnim stiskanjem, izvedenih z acetonom, v odvisnosti od pogojev ekstrakcije (razmerje topilo : material, temperatura, čas ekstrakcije), podani na dobljeno količino olja in trdnega ekstrakta.

Izkoristek ekstrakcije je presegal 10 % samo pri treh ekstrakcijah: ekstrakciji 2, 7 in 9. Zaradi prisotnosti olja smo le-tega izprali in nato izkoristek preračunali še samo glede na trden ekstrakt, ki je ostal po izpiranju. Rezultate lahko vidimo na sliki 5-10.

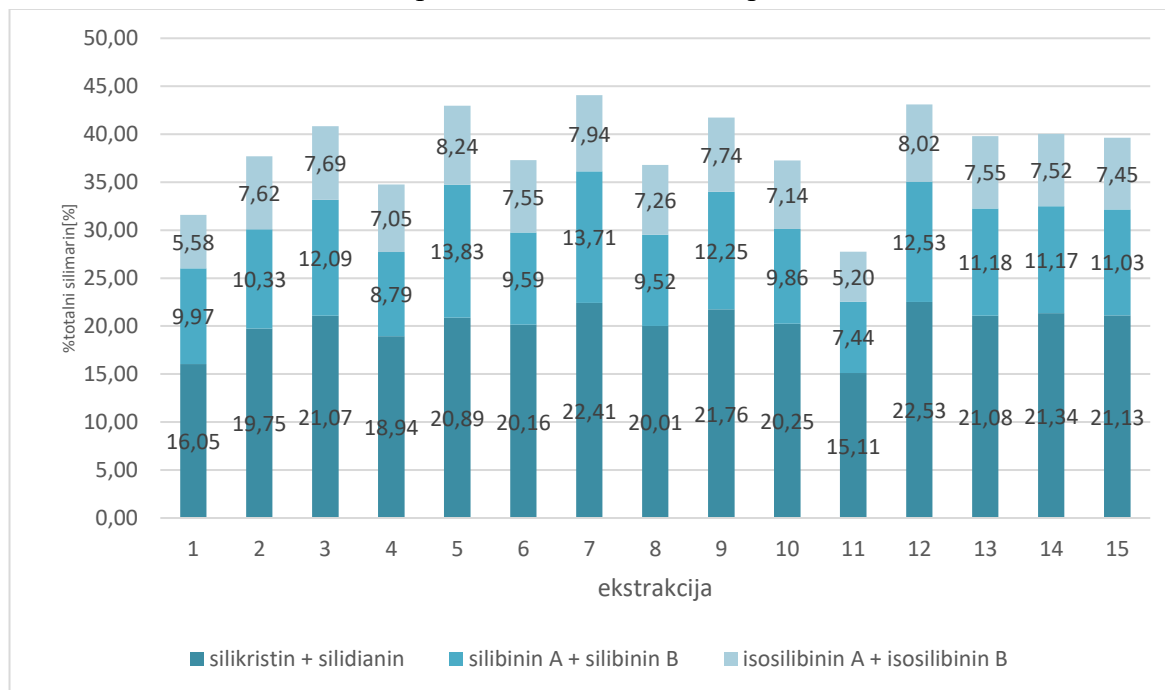


Slika 5-10. Izkoristki ekstrakcij silimarina, iz predhodno razmaščenih semen pegastega badlja s hladnim stiskanjem, izvedenih z acetonom, v odvisnosti od pogojev ekstrakcije (razmerje topilo : material, temperatura, čas ekstrakcije), podani na dobljeno količino trdnega ekstrakta.

1 % izkoristka je bil presežen samo pri ekstrakciji številka 4, 6 in 8. Vse te ekstrakcije so bile izvedene pri temperaturi 50 °C. S tem sklepamo, da se večina komponent intenzivnejše ekstrahira pri višjih temperaturah. Največ olja pa se je ekstrahiralo pri ekstrakciji številka 9,

ki je potekala najkrajši možni čas (štiri ure), s čimer sklepamo, da se takrat trdni ekstrakt še ni začel intenzivnejše ekstrahirati.

Z ekstrakcijami smo dobili produkte, katerih vsebnost silimarina se je gibala med 27,75 % in 44,06 %. Vsebnosti silimarina v posameznih ekstraktih so prikazane na sliki 5-11.



Slika 5-11. Vsebnosti komponent silimarina v ekstraktih, pridobljenih z acetonom, iz predhodno razmaščenih semen pri različnih ekstrakcijskih pogojih (razmerje topilo : material, temperatura, čas ekstrakcije).

Največ silimarina se je ekstrahiralo z ekstrakcijo številka 7, ki je bila izvedena na sobni temperaturi, z razmerjem topilo : material = 4 mL/g in je trajala osem ur. Najmanj silimarina se je ekstrahiralo z ekstrakcijo številka 11, ki je potekala na 38 °C, štiri ure, z razmerjem topilo : material = 4 mL/g. To je tudi edina ekstrakcija, kjer je bila vsebnost silimarina nižja od 30 %. Opazili smo tudi, da vsebnost silimarina v ekstraktih, ki so bili ekstrahirani pri 50 °C, nikoli ni presegla 40 %. Iz tega sklepamo, da pri višjih temperaturah silimarin razpade ali pa se bolj intenzivno ekstrahirajo ostale komponente in nečistoče ter s tem nižajo odstotek silimarina v ekstraktu. S slike lahko razberemo, da se ekstrahira največ mešanice silikristina in silidianina, sledi mešanica silibina A in silibina B, najmanj pa se ekstrahira mešanica isosilibina A in isosilibina B.

Program Design Expert 13 je na podlagi izvedenih eksperimentov predlagal polinom tretje stopnje, s katerim smo lahko izračunali vsebnost silimarina v ekstraktih pri katerih koli pogojih.

Program nam predlaga, kateri členi v enačbi imajo pomemben vpliv in kateri ne. Naš cilj je, da najdemo kombinacijo takšnih členov, ki bo dala največji možni koeficient določevanja R^2 . Za izračun vsebnosti totalnega silimarina Y je program predlagal enačbo:

$$Y = 39,82 - 3,24 \cdot X_1 + 2,71 \cdot X_2 - 2,04 \cdot X_3 - 3,04 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,405 \cdot X_1 \cdot X_3 + 4,96 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,385 \cdot X_1^2 - 3,20 \cdot X_2^2 + 0,84 \cdot X_3^2 - 1,13 \cdot X_1^2 \cdot X_2 + 2,18 \cdot X_1^2 \cdot X_3 + 3,24 \cdot X_1 \cdot X_2^2 \quad (5.15)$$

kjer je:

- X_1 temperatura (-1, 0 ali 1)
 X_2 čas ekstrakcije (-1, 0 ali 1)
 X_3 razmerje topilo : material (-1, 0 ali 1)
 Y izkoristek ekstrakcije (%)

Enačba 5.15 se uporablja, kadar so spremenljivke kodirane kot nivoji posameznih faktorjev. Najvišji nivoji so kodirani z +1, najnižji z -1, vmesni pa z 0. Ta enačba je uporabna predvsem, kadar se identificira relativni vpliv faktorjev s primerjavo koeficientov med seboj.

Enačbo 5.16 pa uporabimo, kadar želimo napovedati, kakšna bo vsebnost silimarina pri določenih pogojih, če jih ne kodiramo s kodami, ampak vpisujemo dejanske vrednosti z ustreznimi enotami.

$$Y = -28,14 + 3,608 \cdot A + 9,6125 \cdot B + 3,88 \cdot C - 0,1844 \cdot A \cdot B - 1,0812 \cdot A \cdot C + 1,24 \cdot B \cdot C - 0,029952 \cdot A^2 - 0,8075 \cdot B^2 + 0,84 \cdot C^2 - 0,001808 \cdot A^2 \cdot B + 0,013984 \cdot A^2 \cdot C + 0,0162 \cdot A \cdot B^2 \quad (5.16)$$

kjer je:

- A temperatura (°C)
 B čas (h)
 C razmerje topilo : topljenec (mL/g)
 Y vsebnost totalnega silimarina (%)

V tabeli 5-4 so prikazane eksperimentalno določene vrednosti in vrednosti, ki smo jih izračunali s pomočjo enačb. Vidimo lahko, da se model dobro prilega in da se vrednosti skoraj ne razlikujejo.

Tabela 5-4. Predlagan eksperimentalni načrt po Box-Behnken metodi in vsebnosti silimarina v ekstraktih: primerjava eksperimentalnih in izračunanih vrednosti s polinomom tretje stopnje.

Številka ekstrakcije	T (°C)	t (h)	Razmerje topilo : topljenec (mL/g)	%totalni silimarin eksp.	%totalni silimarin izr.
1	25	4	3	31,61	31,61
2	50	4	3	37,7	37,70
3	25	12	3	40,85	40,85
4	50	12	3	34,78	34,78
5	25	8	2	42,96	42,96
6	50	8	2	37,3	37,30
7	25	8	4	44,06	44,06
8	50	8	4	36,78	36,78
9	38	4	2	41,75	41,89
10	38	12	2	37,25	37,14
11	38	4	4	27,75	27,86
12	38	12	4	43,09	42,95
13	38	8	3	39,82	39,69
14	38	8	3	40,02	39,69
15	38	8	3	39,62	39,69

Ustreznost modela se določa s F in p vrednostmi. Vsak člen, ki ima p vrednost nižjo od 0,05, je za enačbo pomemben in vpliva na vsebnost silimarina v ekstraktu. Vidimo, da so za to enačbo pomembni vsi členi razen AC in A^2 . V primeru, da bi kakšen člen imel p vrednost več kot 0,1, bi to pomenilo, da je ta člen za enačbo povsem nepomemben in ga lahko izpustimo. Za celoten model je bila vrednost F enaka 575,73, vrednost p pa 0,0017, kar oboje nakazuje na to, da je izbrani model ustrezen.

»Adequate precision« je koeficient natančnosti meritev. Zaželeno je, da ta znaša več kot 4, naš pa je znašal kar 87,599, kar nakazuje, da se model dobro ujema z dobljenimi rezultati ekstrakcije.

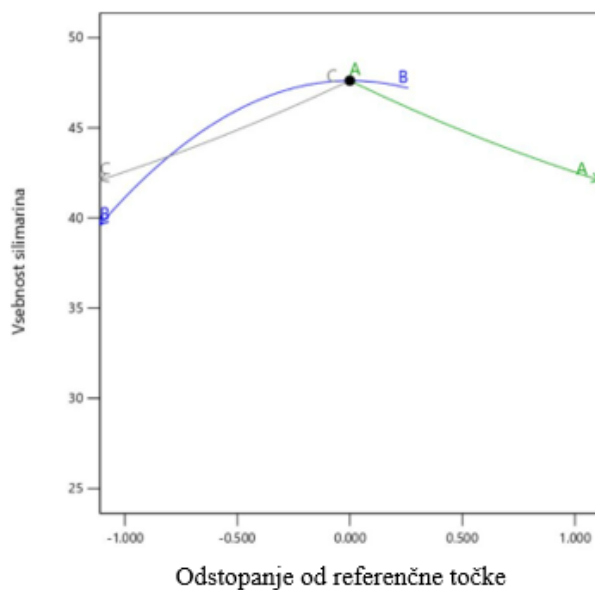
Koeficient R^2 nam pove, kakšno je ujemanje med eksperimentalnimi in med izračunanimi vrednostmi. Bolj kot se R^2 približa vrednosti 1, tem večje je to ujemanje in tem natančnejši je model. R^2 je v našem primeru znašal 0,9997, kar pomeni, da je model dobro zastavljen in da je tudi ujemanje skoraj popolno. Vrednosti regresijskih koeficientov in analiza variance in ustreznosti modela so prikazane v tabeli 5-5.

Tabela 5-5. Vrednosti regresijskih koeficientov in analiza variance modela za vsebnost silimarina.

Parameter	Koeficient regresije	Standardna napaka	Vsota kvadratov	Stopnje prostosti	Povprečje kvadratov	F vrednost	p-vrednost
Model			276,35		23,03	575,73	0,0017
Intercept	39,82	0,1155		1			
X₁	-3,24	0,1	41,86	1	41,86	1046,52	0,001
X₂	2,71	0,1	29,38	1	29,38	734,41	0,0014
X₃	-2,04	0,1	16,65	1	16,65	416,16	0,0024
X₁ X₂	-3,04	0,1	36,97	1	36,97	924,16	0,0011
X₁ X₃	-0,405	0,1	0,6561	1	0,6561	16,4	0,0559
X₂ X₃	4,96	0,1	98,41	1	98,41	2460,16	0,0004
X₁²	-0,385	0,1041	0,5473	1	0,5473	13,68	0,0659
X₂²	-3,2	0,1041	37,81	1	37,81	945,23	0,0011
X₃²	0,84	0,1041	2,61	1	2,61	65,13	0,015
X₁² X₂	-1,13	0,1414	2,55	1	2,55	63,85	0,0153
X₁² X₃	2,18	0,1414	9,55	1	9,55	238,71	0,0042
X₁ X₂²	3,24	0,1414	21	1	21	524,88	0,0019
Residual			0,08	2	0,04		
Lack of fit			N/A	N/A	N/A		
Pure error			0,08		0,04		
R²	0,9997						
C.V. %	0,5214						
PRESS	N/A						
adjusted R²	0,998						
predicted R²	N/A						
adequate precision	87,5988						

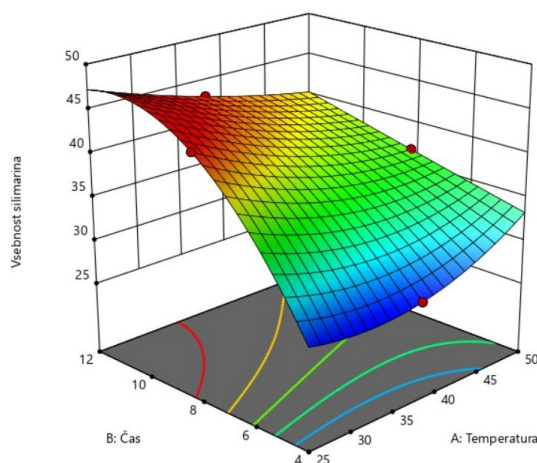
Na sliki 5-12 lahko vidimo, kako se vsebnost silimarina spreminja s spreminjanjem vrednosti katere od treh spremenljivk. Z zeleno barvo je označena temperatura, kjer vidimo, da vsebnost z višanjem temperature pada, kar potrjuje naše domneve, da se pri višjih temperaturah silimarin razgradi ali pa se ekstrahirajo druge komponente. Z naraščanjem razmerja topilo : material, ki je označeno s sivo, vsebnost silimarina narašča. Vsebnost silimarina s časom, ki je označen z modro barvo, sicer narašča, vendar vidimo, da po 11 urah ekstrakcije doseže maksimum in začne padati.

A = temperatura (°C)
 B = čas ekstrakcije (h)
 C = razmerje topilo : material
 (mL/g)



Slika 5-12. Vpliv temperature, razmerja topilo : material in časa ekstrakcije na vsebnost silimarina.

Slika 5-13 prikazuje tridimenzionalno odzivno površino modela za določanje vsebnosti silimarina pri razmerju topilo : material = 4 mL/g.

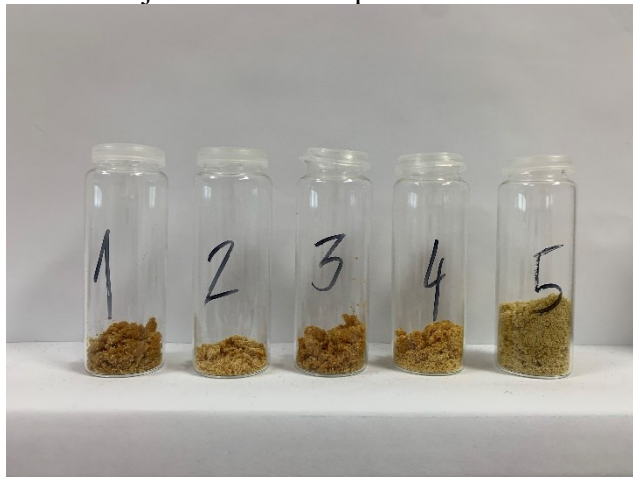


Slika 5-13. Tridimenzionalna odzivna površina modela za določanje vsebnosti silimarina v ekstraktih pri razmerju topilo : material = 4 mL/g.

5.2.3 Ekstrakcije različno razmaščene materiala pri optimalnih pogojih

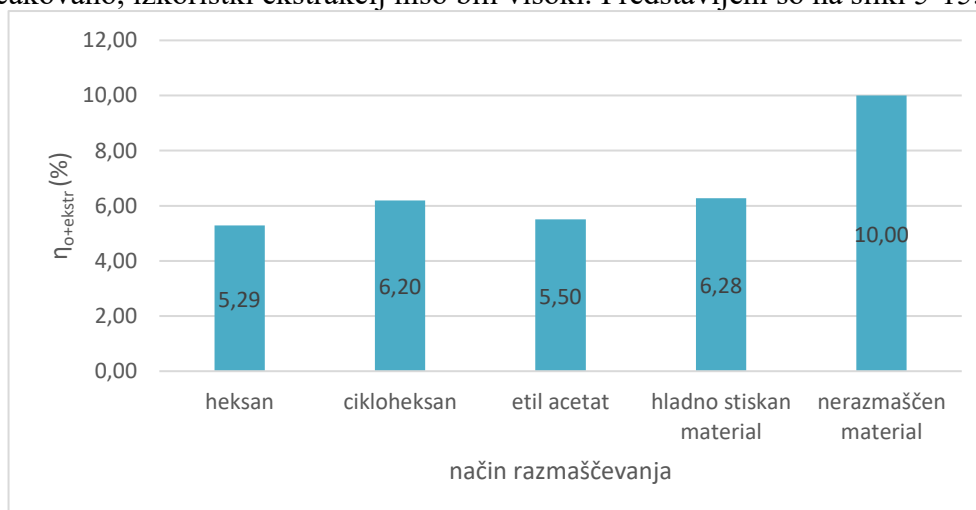
S pomočjo modela, ki nam ga je predlagal program Design Expert 13, smo ugotovili, da so optimalni pogoji ekstrakcije naslednji: temperatura 25 °C, razmerje topilo : topljenec = 4 mL/g in potek ekstrakcije 11 ur. Ko smo te podatke vstavili v dobljeno enačbo, smo dobili rezultat, da naj bi vsebnost silimarina v ekstraktu takrat znašala okoli 47,62 %. Izračun je prikazan v prilogi 8.4.

Izvedli smo pet ekstrakcij pri določenih optimalnih pogojih iz različnega materiala: materiala, razmaščene s heksanom, cikloheksanom, etil acetatom, hladno stiskanega materiala in nerazmaščene materiala. Dobljeni ekstrakti so prikazani na sliki 5-14.



Slika 5-14. Ekstrakti silimarina po optimirani ekstrakciji z acetonom iz semen pegastega badlja, ki so bila razmaščena na različne načine: 1 – s heksanom, 2 – s cikloheksanom, 3 – z etil acetatom, 4 – s hladnim stiskanjem in 5 – semena, ki predhodno niso bila razmaščena.

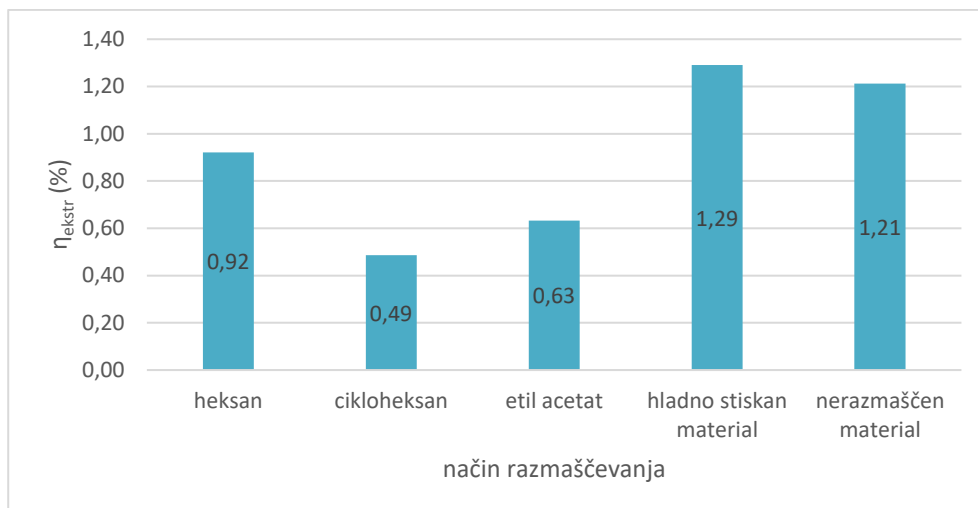
Kot pričakovano, izkoristki ekstrakcij niso bili visoki. Predstavljeni so na sliki 5-15.



Slika 5-15. Izkoristki ekstrakcij predhodno razmaščenih semen pegastega badlja (s hladnim stiskanjem in s tremi različnimi topili) in nerazmaščenih semen, izvedenih z acetonom, pri optimalnih pogojih, podani na dobljeno količino olja in trdnega ekstrakta.

Najvišji izkoristek je imela ekstrakcija, kjer smo ekstrahirali nerazmaščen material, najnižji pa tisti, kjer smo ekstrahirali material, razmaščen s cikloheksanom.

Izkoristek smo preračunali tudi samo na trdni ekstrakt, ki je ostal po izpiranju s heksanom. Rezultati so prikazani na sliki 5-16.

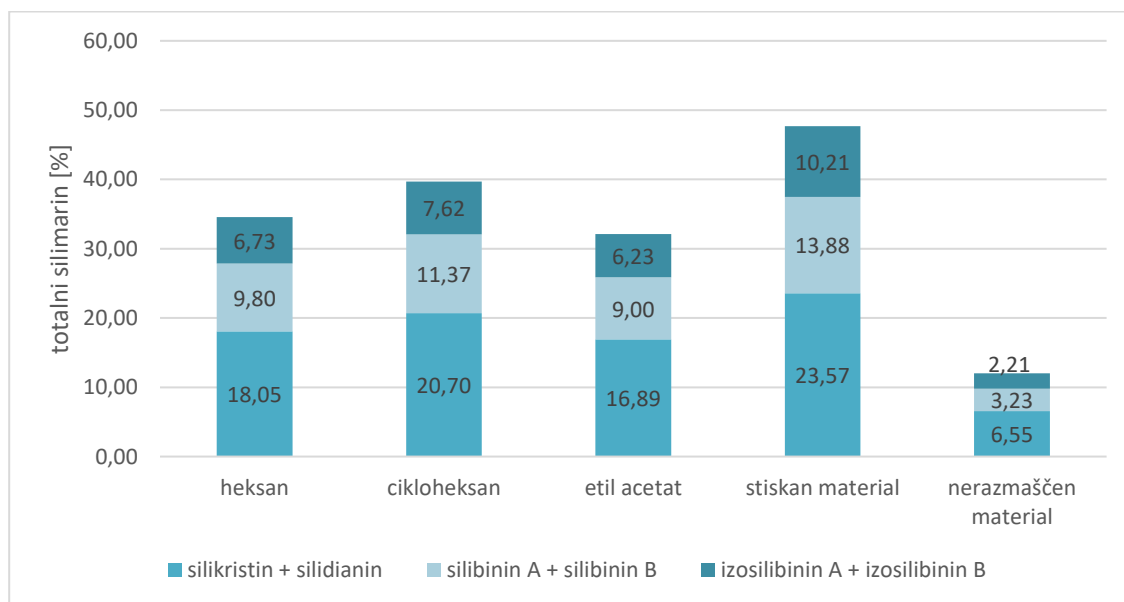


Slika 5-16. Izkoristki ekstrakcij predhodno razmaščenih semen pegastega badlja (s hladnim stiskanjem in s tremi različnimi topili) in nerazmaščenih semen, izvedenih z acetonom, pri optimalnih pogojih, podani na dobljeno količino trdnega ekstrakta.

Največji izkoristek smo dobili pri ekstrakciji hladno stiskanega materiala, in sicer je tam znašal 1,29 %. Sledil mu je nerazmaščen material (1,21 % izkoristka ekstrakcije), najmanjši izkoristek pa je imela ekstrakcija, ki je bila izvedena s cikloheksanom (0,49 %).

Največ trdnega ekstrakta in s tem najmanj olja se je ekstrahiralo iz materiala, ki je bil hladno stiskan, največ olja pa se je ekstrahiralo iz materiala, ki je bil razmaščen s cikloheksanom.

Ekstrakte smo analizirali še za vsebnost silimarina. Rezultati so prikazani na sliki 5-17.



Slika 5-17. Vsebnosti silimarina v ekstraktih, dobljenih z ekstrakcijo z acetonom, pri optimalnih pogojih, iz materiala, ki je bil predhodno razmaščen z različnimi topili, hladno stiskan in iz nerazmaščenega materiala.

Pri optimalnih pogojih izvedene ekstrakcije so dale naslednje rezultate: največ silimarina je vseboval ekstrakt hladno stiskanega materiala (47,66 %), sledil mu je material, ekstrahiran s cikloheksanom (39,69 %), nato material, ekstrahiran s heksanom (33,00 %), nato pa še material, ekstrahiran z etil acetatom (31,21 %). Nerazmaščen material je vseboval občutno

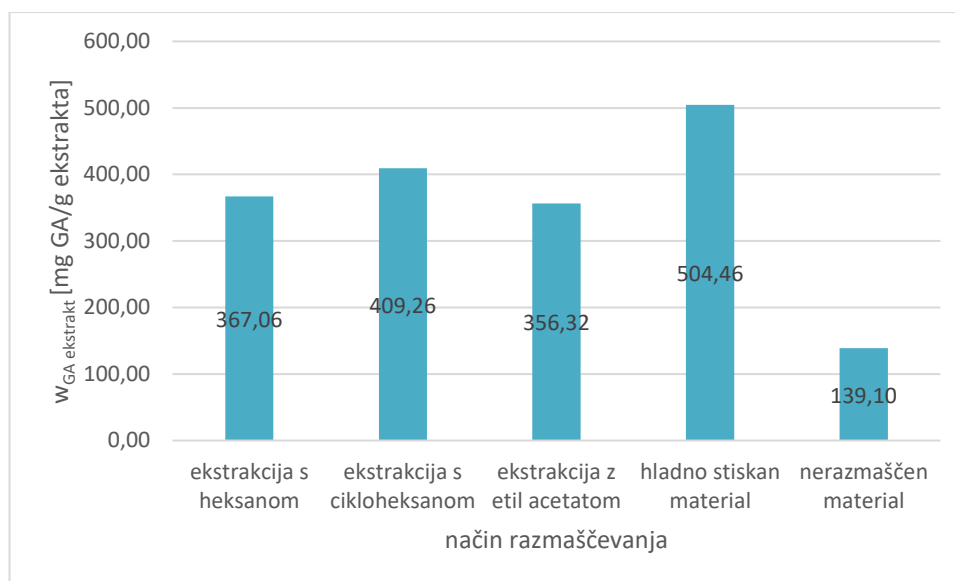
manj silimarina (11,47 %), s čimer smo dokazali, da je predhodno razmaščevanje semen ključnega pomena.

Tako kot prej se je ekstrahiralo največ mešanice silikristina in silidianina, sledila je mešanica silibinina A in silibinina B, najmanj pa se je ekstrahiralo mešanice izosilibina A in izosilibina B.

5.2.4 Vsebnost totalnih fenolov

Kot smo že omenili, smo si za analiziranje vsebnosti totalnih fenolov najprej pripravili umeritveno krivuljo $A = f(\gamma_{GA})$.

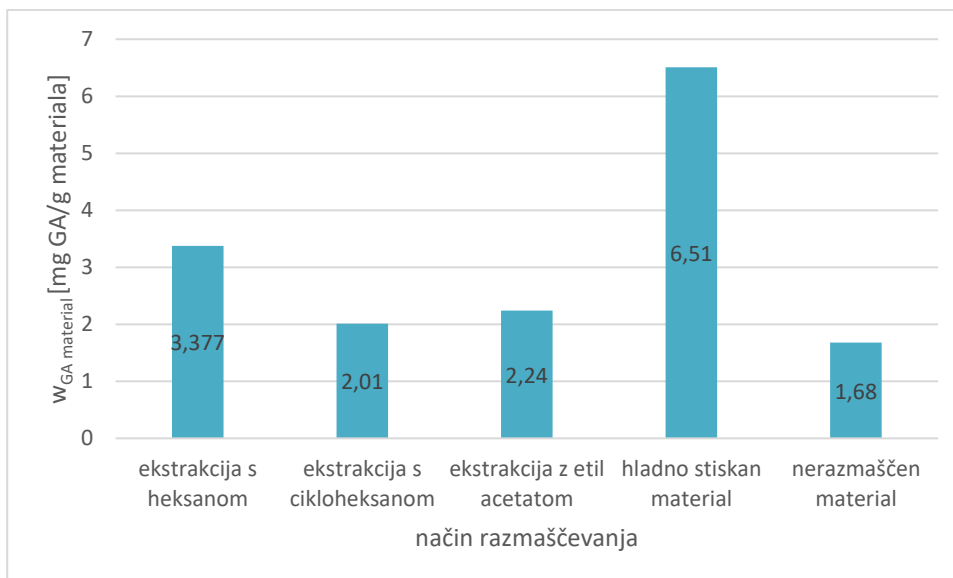
Sestava ekstraktov se lahko razlikuje zaradi različnih načinov ekstrahiranja. Vsebnost polifenolov v ekstraktih je prikazana na sliki 5-18.



Slika 5-18. Količina izoliranih polifenolov v ekstraktih silimarina, ekstrahiranih z acetonom, pri optimalnih pogojih, iz nerazmaščenih semen pegastega badlja in iz semen razmaščenih na različne načine.

Po pričakovanjih so vzorci imeli visoko vsebnost polifenolov. Izstopa le vzorec, kjer je bila ekstrakcija narejena iz nerazmaščenega materiala. Tam je vsebnost polifenolov znašala 139,10 mg polifenolov/g ekstrakta. Največ polifenolov (504,26 mg polifenolov/g ekstrakta) je vseboval vzorec, ki je bil razmaščen s pomočjo hladnega stiskanja. Vzorci, kjer je bilo olje odstranjeno s pomočjo topil, so dajali precej podobne rezultate, med njimi je imel največjo vsebnost polifenolov vzorec, kjer so bila semena razmaščena s cikloheksanom, in sicer 409 mg polifenolov/g ekstrakta. Vsebnost polifenolov v vzorcu, kjer so bila semena ekstrahirana s heksanom, je znašala 367,06 mg polifenolov/g ekstrakta, v vzorcu, dobljenem z etil acetatom, pa je vsebnost znašala 356,32 mg polifenolov/g ekstrakta. Takšni rezultati so bili pričakovani in so tudi v skladu z rezultati za vsebnost totalnega silimarina v vzorcih. Silimarin je namreč flavonolignan, ki ga uvrščamo med fenolne spojine.

Večje razlike v količini izoliranih polifenolov pa so se pojavile, če smo količino izoliranih polifenolov izrazili na enoto mase materiala, ki je bil uporabljen za ekstrakcijo. Vsebnosti so prikazane na sliki 5-19.



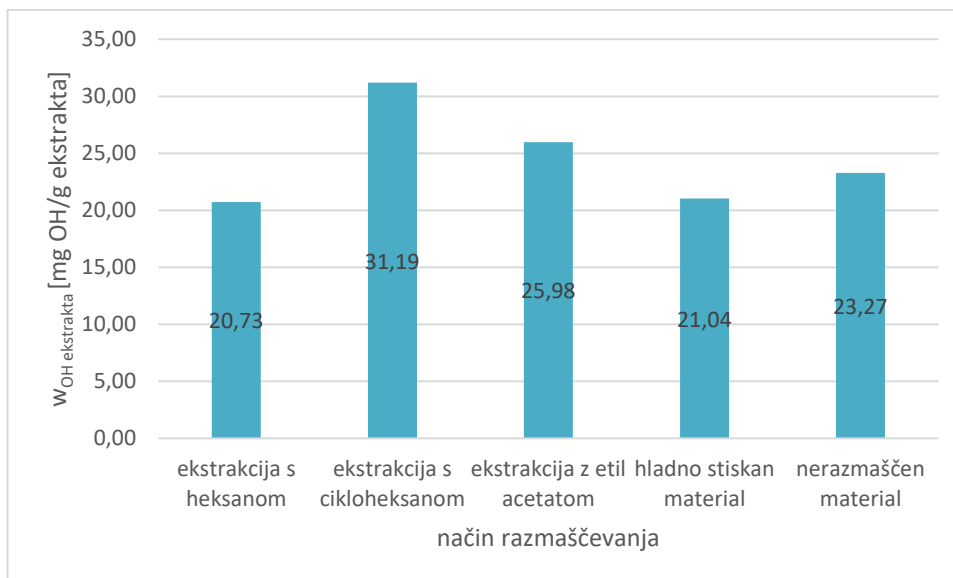
Slika 5-19. Količina izoliranih polifenolov na enoto mase materiala, ki je bil uporabljen za ekstrakcijo silimarina.

Zaradi zelo majhnih izkoristkov je bila tudi količina izoliranih polifenolov iz nerazmaščenega materiala pričakovano majhna. Največ polifenolov smo izolirali iz hladno stiskanega materiala, in sicer 6,51 mg polifenolov/g materiala. Sledil mu je material, razmaščen s heksanom (3,38 mg polifenolov/g materiala), precej podobni pa sta količini za material, ekstrahiran z etil acetatom (2,24 mg polifenolov/g materiala), in material, ekstrahiran s cikloheksanom (2,00 mg polifenolov/g materiala). Iz materiala, ki predhodno ni bil razmaščen, pa smo ekstrahirali najmanj polifenolov, in sicer 1,68 mg polifenolov/g materiala. Vsi rezultati in primeri izračunov so zbrani v prilogi 8.5.

5.2.5 Vsebnost ogljikovih hidratov

Tudi za preverjanje vsebnosti ogljikovih hidratov smo najprej pripravili umeritveno krivuljo $A = f(\gamma_{GL})$.

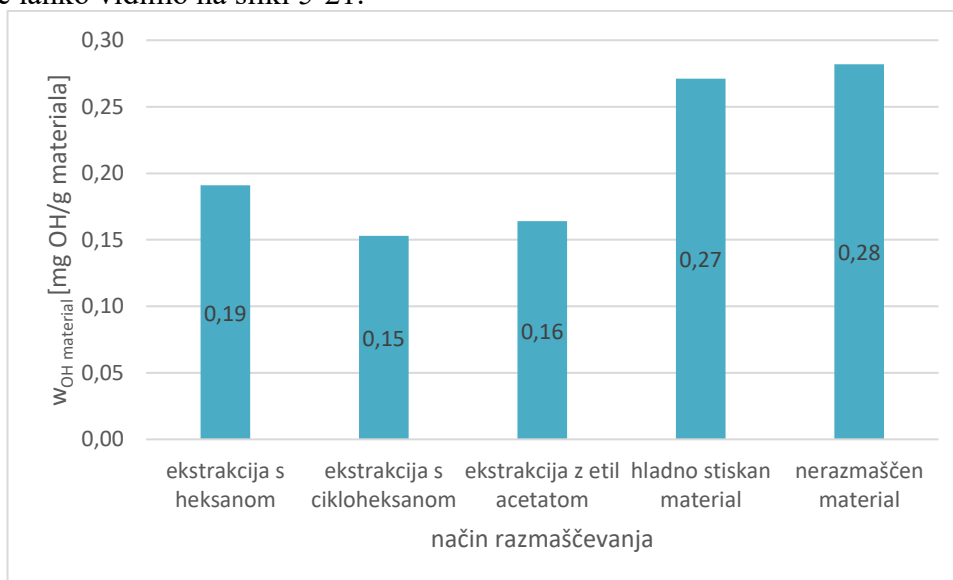
Zaradi različnih načinov predhodne obdelave materiala imajo vzorci različno sestavo in različne prevladujoče komponente. Razlikujejo se tudi vsebnosti ogljikovih hidratov. Rezultati so prikazani na sliki 5-20.



Slika 5-20. Količina izoliranih ogljikovih hidratov v ekstraktih silimarina, ekstrahiranih z acetonom, pri optimalnih pogojih, iz nerazmaščenih semen pegastega badlja in iz semen razmaščenih na različne načine.

Največ ogljikovih hidratov je vseboval vzorec, ki je bil ekstrahiran iz materiala, ki je bil predhodno razmaščen s cikloheksanom, in sicer 31,19 mg OH/g ekstrakta, najmanj pa tisti, ki je bil ekstrahiran iz materiala, predhodno razmaščenega s heksanom (20,73 mg OH/g ekstrakta), čeprav razlike niso bile zelo velike.

Količino izoliranih ogljikovih hidratov smo preračunali tudi na vsebnost enote mase materiala. Rezultate lahko vidimo na sliki 5-21.

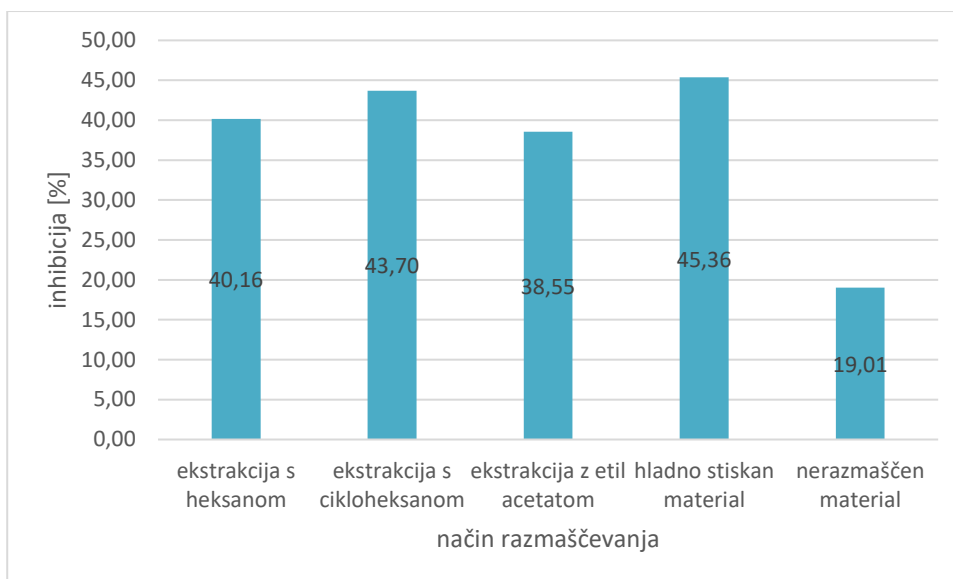


Slika 5-21. Količina izoliranih ogljikovih hidratov na enoto mase materiala, ki je bil uporabljen za ekstrakcijo silimarina.

Največ ogljikovih hidratov smo izolirali iz predhodno nerazmaščenega materiala (0,282 mg OH/g materiala), podobno količino pa tudi iz predhodno hladno stiskanega materiala (0,271 mg OH/g materiala).

5.2.6 Določanje antioksidativne aktivnosti z DPPH radikalsko metodo

Rezultate lahko vidimo na sliki 5-22.



Slika 5-22. Antioksidativna aktivnost končnih ekstraktov.

Antioksidativna aktivnost se izraža kot odstotek inhibicije oziroma sposobnost inhibicije prostih radikalov. Odstotek inhibicije je dokaj visok za vse vzorce, izstopa le vzorec, kjer smo silimarin ekstrahirali iz nerazmaščenega materiala. Tukaj je odstotek inhibicije znašal le 19,01 %. Največjo sposobnost dušenja prostih radikalov ima kot pričakovano vzorec, ki je bil ekstrahiran iz hladno stiskanega materiala, in sicer njegov odstotek inhibicije znaša 45 %. Precej podoben odstotek inhibicije ima vzorec, kjer je material bil predhodno ekstrahiran s cikloheksanom (43,70 %), malo manjšo sposobnost inhibicije pa imata vzorca, kjer je bil material predhodno ekstrahiran s heksanom (40,16 %) in etil acetatom (38,55 %).

Glede na to, da so polifenoli nosilci antioksidativne aktivnosti, se ti rezultati skladajo s prejšnjimi ugotovitvami. Ekstrakt, pridobljen iz hladno stiskanega materiala, je namreč vseboval največ fenolnih spojin, najmanj pa jih je vseboval ekstrakt iz nerazmaščenega materiala.

6 Zaključek

V sklopu magistrskega dela smo želeli doseči naslednje: poiskati optimalne pogoje ekstrakcije silimarina iz pegastega badlja, poiskati najboljši možen način razmaščevanja semen, dokazati, da olje pegastega badlja ni samo stranski produkt dvostopenjske ekstrakcije, ampak ima tudi samo olje zdravilne učinke, in poiskati najboljšo možno kombinacijo razmaščevanja semen ter ekstrahiranja silimarina.

V industriji razmaščevanje semen pegastega badlja v veliki večini poteka s pomočjo topil, najpogosteje heksana. Razlog za to je, da je ta metoda hitra, cenovno ugodnejša, izkoristki so višji. Problem razmaščevanja s topili je, da velik del topil ostane v samem olju in je treba olja termično obdelati, da topila odstranimo, s tem pa izgubimo pomembne prehranske snovi. Tudi mi smo preverjali vsebnost topil v oljih, ki smo jih pridobili s pomočjo cikloheksana, heksana in etil acetata, ter ali se ta topila po izpostavitvi visokim temperaturam res odstranijo iz olj. Po tem, ko smo olje okoli tri ure izpostavljali temperaturam okoli 200 °C, se je vsebnost topil v povprečju tako zmanjšala, da je ostalo v oljih samo še okoli 0,001 % topila, vendar pa se je hkrati znižala tudi vsebnost tokoferolov za več kot 10-krat.

Čprav olje pegastega badlja pri proizvodnji silimarina velikokrat zavržejo, tudi to vsebuje učinkovine, ki pozitivno vplivajo na zdravje. Eni izmed teh so tokoferoli, ki so znani po svojih antioksidativnih učinkih. Zanimalo nas je, koliko tokoferolov vsebujejo olja, ekstrahirana z različnimi topili. Olje smo ekstrahirali iz semen s pomočjo treh topil in tudi z metodo hladnega stiskanja. Predpostavljali smo, da bo olje, ekstrahirano na tak način, vsebovalo največ tokoferolov, saj je to metoda, ki ima na produkt najmanj vpliva. Vsebnost tokoferolov v oljih, ki smo jih pridobili z različnimi topili oziroma s hladnim stiskanjem (pred termično obdelavo), je bila podobna. Največ tokoferolov je, kot pričakovano, vsebovalo olje hladno stiskanega materiala (0,1444 %), izmed olj, ki so bila pridobljena s topili, pa je največ tokoferolov vsebovalo olje, ekstrahirano z etil acetatom (0,1187 %). Ko pa smo olja izpostavili visokim temperaturam in nato ponovno analizirali vsebnost tokoferolov, se je ta znatno zmanjšala. To je bilo pričakovano, saj so antioksidativne spojine običajno toplotno neobstoje. Po toplotni obdelavi so olja sicer vsebovala zelo malo topil, vendar pa so se s tem razgradili vsebovani tokoferoli, kar je zmanjšalo kakovost samega olja. S tem smo ugotovili, da je najboljši način razmaščevanja metoda hladnega stiskanja. Metoda je najbolj zdravju in okolju prijazna, produkt ne vsebuje topil, ki jih ni treba odstranjevati s pomočjo toplote, s čimer se ohranita kvaliteta in zdravilni učinek olja.

Preden smo ekstrakcijo silimarina iz razmaščene materiala optimirali, smo morali določiti topilo, ki ga bomo uporabljali. Poskusili smo tri topila, ki jih za ekstrakcijo silimarina priznava farmakopeja: aceton, metanol in etanol, poskusili pa smo še 2-propanol, acetonitril, etil acetat in vodo. Vse ekstrakcije smo izvajali pri sobni temperaturi, osem ur in pri razmerju topilo : material = 3 mL/g. Izkoristek ekstrakcij se je gibal med 18,00 % in 43,82 %. Največ silimarina je ekstrahiral aceton, za katerega smo nato optimirali ekstrakcijo s pomočjo programa Design Expert 13.

Odločili smo se, da bomo prilagajali tri parametre: temperaturo, razmerje topilo : material in čas ekstrakcije. Za vsakega izmed treh parametrov smo izbrali maksimalno in minimalno vrednost, in sicer: za temperaturo 25 °C in 50 °C, razmerje topilo : material 2 mL/g in 4 mL/g in čas štiri ure in 12 ur. Program Design Expert 13 je na podlagi tega oblikoval eksperimentalni načrt, ki je obsegal 15 ekstrakcij.

Dobili smo torej 15 različnih ekstraktov, katerih vsebnost silimarina je znašala med 27,75 % in 44,06 %. Ugotovili smo, da vsebnost silimarina pada z višanjem temperature in narašča z naraščanjem razmerja topilo : material. Vsebnost silimarina se s časom ekstrakcije veča, po

11 urah začne padati. Optimalni pogoji ekstrakcije so torej bili: topilo – aceton, temperatura – 25 °C, čas ekstrakcije – 11 ur, razmerje topilo : material = 4 mL/g.

Pri teh pogojih smo nato izvedli še ekstrakcije petih različnih materialov z acetonom: razmaščenega s heksanom, etil acetatom, cikloheksanom, hladno stiskanega materiala in nerazmaščenega materiala. Največ silimarina je vseboval ekstrakt, pridobljen z ekstrakcijo hladno stiskanega materiala (47,66 %), sledil je ekstrakt materiala, razmaščenega s cikloheksanom (36,69 %), ekstrakt materiala, razmaščenega s heksanom (33,00 %), ekstrakt materiala, razmaščenega z etil acetatom (31,21 %), in ekstrakt nerazmaščenega materiala (11,47 %). S tem smo dokazali, da je razmaščevanje materiala ključnega pomena.

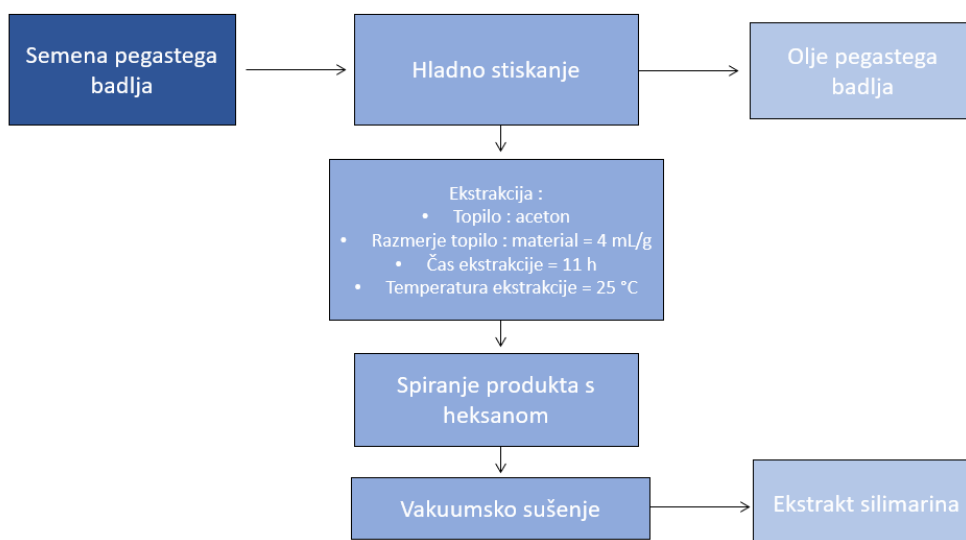
V vseh petih dobljenih ekstraktih smo določili tudi vsebnost totalnih polifenolov, ogljikovih hidratov in DPPH radikalsko aktivnost. Ker smo ekstrakte pridobivali z različnimi postopki, imajo ti posledično različne sestave in prevladujoče komponente.

Največ polifenolov je vseboval ekstrakt hladno stiskanega materiala (50,45 %), sledil mu je ekstrakt materiala, predhodno ekstrahiranega s cikloheksanom (40,93 %), najmanj pa jih je vseboval ekstrakt nerazmaščenega materiala (13,91 %).

Rezultati so se skladali z rezultati antioksidativne aktivnosti, analizirane z DPPH metodo, saj polifenoli spadajo med antioksidante. Odstotek inhibicije je bil najvišji pri ekstraktu hladno stiskanega materiala (45,36 %), sledil mu je ekstrakt materiala, predhodno ekstrahiranega s cikloheksanom (43,70 %), na zadnjem mestu pa je bil tudi pri tem parametru ekstrakt nerazmaščenega materiala (19,01 %).

Največ ogljikovih hidratov je vseboval vzorec iz materiala, ki je bil predhodno razmaščen s cikloheksanom (3,12 %), najmanj pa sta jih vsebovala vzorec iz materiala, predhodno ekstrahiranega s heksanom (2,07 %), in ekstrakt hladno stiskanega materiala (2,10 %).

Na podlagi izvedenega eksperimentalnega dela smo ugotovili, da je kombinacija razmaščevanja semen s pomočjo hladnega stiskanja in ekstrakcije silimarina z acetonom pri 25 °C, 11-urni ekstrakciji in razmerju topilo : topljenec = 4 mL/g najboljša možna opcija dvostopenjske izolacije silimarina iz pegastega badlja. Izmed treh topil, ki smo jih uporabili za prvo stopnjo ekstrakcije oz. razmaščevanje, pa se je za najboljšega izkazal cikloheksan, saj so bile skoraj vse analize precej blizu rezultatom, ki smo jih dobili s hladno stiskanim materialom. Na sliki 6-1 lahko vidimo predlagan diagram poteka ekstrakcije olja pegastega badlja in silimarina.



Slika 6-1. Predlagan diagram poteka ekstrakcije silimarina in olja pegastega badlja.

7 Literatura

- [1] Folia scopoliana: pegasti bodelj. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1986.
- [2] Ramawat, K. G., Merillon, J. M. Silybum marianum (L.) Gaertn: the Source of Silymarin. *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, 6, 123-148, 2008.
- [3] Enciklopedija rastlin: Silybum marianum. <https://www.avogel.si/enciklopedija-rastlin/pegasti-badelj.php> (dostop 28. 10. 2022)
- [4] Rady, M. R. Plant Biotechnology in Milk Thistle. *Plant Biotechnology and Medicinal Plants*, 97-147, 2019.
- [5] Marceddu, R., Dinolfo, L., Carrubba, A., Sarno, M., Di Miceli, G. Milk Thistle (*Silybum Marianum* L.) as a Novel Multipurpose Crop for Agriculture in Marginal Enviroments: A Review. *Agronomy*, 12(3), 729, 2022.
- [6] Abenavoli, L., Izzo, A. A., Milić, N., Cicala, C., Santini, A., Capasso, R. Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytotherapy Research*, 32(11), 2202-2213, 2018.
- [7] Fathi-Achachlouei, B., Azadmard-Damirchi, S. Milk Thistle Seed Oil Constituents from Different Varieties Grown in Iran. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 86(7), 643-649, 2009.
- [8] Zhang, Z. S., Wang, S., Liu, H., Li, B. Z., Che, L. Constituents and thermal properties of milk thistle seed oils extracted with three methods. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 126, 2020.
- [9] Why cold pressed is best ?. <https://www.totallykiwi.co.nz/blogs/research/why-cold-pressed-is-best> (dostop 28. 10. 2022)
- [10] Pegasti badelj. https://sl.wikipedia.org/wiki/pegasti_badelj (dostop 25. 10. 2022)
- [11] Lesser, J. How to Identify and Remove Milk Thistle, 2022. <https://www.thespruce.com/growing-milk-thistle-5090128> (dostop 25. 10. 2022)
- [12] Zdravilni učinki pegastega badlja. <https://www.bonatura.si/p/528> (dostop 25. 10. 2022)
- [13] Spohn, M., Spohn, R. Katera cvetlica je to?. Kranj: Založba Narava, 2008.
- [14] National Center for Complementary and Integrative Health. Milk thistle. <https://www.nccih.nih.gov/health/milk-thistle> (dostop 26. 10. 2022)
- [15] Kapoor, A. 7 Amazing Benefits of Milk Thistle: For Strong Immunity & Better Digestion, 2017. <https://food.ndtv.com/health/7-amazing-benefits-of-milk-thistle-for-strong-immunity-better-digestion-1664534> (dostop 25.10.2022)
- [16] Wang, X., Zhang, Z., Wu, S. C. Health Benefits of Silybum marianum : Phytochemistry, Pharmacology, and Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(42), 11644-11664, 2020.
- [17] Abouzid, S. Silymarin Flavonolignans: Structure-Activity Relationship and Biosynthesis. *Studies in Natural Products Chemistry*, 40, 469-484, 2013.
- [18] Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., Capasso, F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, 24(10), 1423-1432, 2010.
- [19] Pegasti badelj (*Silybum marianum*). <https://www.futunatura.si/pegasti-badelj-clanek> (dostop 26. 10. 2022)
- [20] Burgess, L. What are the benefits of milk thistle?, 2021. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/320362> (dostop 26. 10. 2022)

- [21] Milk thistle. <https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements-milk-thistle/art-20362885> (dostop 26. 10. 2022)
- [22] Schoenfelder, P., Schoenfelder, I. Zdravilne rastline – vodnik. Preddvor: Založba Narava, 2001.
- [23] Chevallier, A. Herbal Remedies. London: Dorling Kindersley Limited, 2007.
- [24] Frommenwiler, D. A., Reich, E., Sharaf, M. H. M., Canigueral, S., Etheridge, C. J. Investigation of market herbal products regulated under different categories: How can HPTLC help to detect quality problems?. Front Pharmacology, 2022. VSE+1
- [25] Milk Thistle Supplements Market. <https://www.factmr.com/report/662/milk-thistle-supplements-market> (dostop 24. 10. 2022)
- [26] Types of Fat. <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/what-should-you-eat/fats-and-cholesterol/types-of-fat/> (dostop 25. 10. 2022)
- [27] Vitamin E. https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_E (dostop 26. 10. 2022)
- [28] Auguštin, L. Vitaminski leksikon: Vitamin E, 2020. <https://www.zdravo.si/vitamin-e> (dostop 26. 10. 2022)
- [29] Vitamin E. <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/vitamin-e/> (dostop 26. 10. 2022)
- [30] Korošec, Ž. Vitamin E. <https://www.nutris.org/prehrana/abc-prehrane/vitamini/191-vitamin-e.html> (dostop 26. 10. 2022)
- [31] Kubala, J. 8 Unique Benefits of Vitamin E, 2022. <https://www.healthline.com/health/all-about-vitamin-e> (dostop 26. 10. 2022)
- [32] Gan, R. Y., Chan, C. L., Yang, Q. Q., Li, H. B., Zhang, D., Ge, Y. Y., Ge, J., Corke, H. Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains. Sprouted Grains, 191-246, 2019.
- [33] Al Mamari, H. Phenolic Compounds: Classification, Chemistry and Updated Techniques of Analysis and Synthesis, 2021. <https://www.intechopen.com/chapters/77604> (dostop 28. 10. 2022)
- [34] Rupasinghe, H. P. V, Nair, S. V. G., Robinson, R. A. Chemopreventive Properties of Fruit Phenolic Compounds and Their Possible Mode of Actions. Studies in Natural Products Chemistry, 229-266, 2014.
- [35] Kedare, S. B., Singh, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology, 48(4), 412-422, 2011.
- [36] Aryal, S., Baniya, M. K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., Koirala, N. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. Plant (Basel), 8(4), 96, 2019.
- [37] Ainsworth, E., Gillespie, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu Reagent. Nature protocols, 2, 875-877, 2007.
- [38] Eddy, D. R., Permana, M. D., Nursyamsiah, D., Noviyanti, A. R. Green Production of Zero-Valent (ZVI) Using Tea-Leaf Extracts for Fenton Degradation of Mixed Rhodamine B and Methyl Orange Dyes. Materials, 15(1), 332.
- [39] Bhagavan, N. V. Simple Carbohydrates. Medical Biochemistry, 133-151, 2002.
- [40] Carbohydrates. <https://www.heart.org/en/healthy-living/healthy-eating/eat-smart/nutrition-basics/carbohydrates> (dostop 28. 10. 2022)

- [41] Carbohydrates: How carbs fit into a healthy diet. <https://www.mayoclinic.org/healthy-lifestyle/nutrition-and-healthy-eating/in-depth/carbohydrates/art-20045705> (dostop 28. 10. 2022)
- [42] Braissant, O., Astasov-Frauenhoffer, M., Waltimo, T., Bonkat, G. A Review of Methods to Determine Viability, Vitality and Metabolic Rates in Microbiology. *Frontiers in Microbiology*, 2020.
- [43] Nielsen, S. S. Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates. *Food Analysis Laboratory Manual*, 47-53, 2010.
- [44] DPPH. <https://en.wikipedia.org/wiki/DPPH> (dostop 28. 10. 2022)
- [45] Dureja, A., Dhiman, K. Free radical scavenging potential of total phenolic and flavonoid content of *Ziziphus mauritana* and *Ziziphus nommularia* fruit extracts. *International Journal of Green Pharmacy*, 6(3), 187-192, 2012.
- [46] Pyrzynska, K., Pekal, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 17, 2013.
- [47] Termination – with impurity. https://sh.wikipedia.org/wiki/Datoteka:Termination_-_with_impurity_2.png (dostop 28. 10. 2022)
- [48] Untapping the power of nature : essential oil extraction methods. <https://www.newsdirectionsaromatics.com/blog/articles/how-essential-oils-are-made.html> (dostop 26. 10. 2022)
- [49] Cold pressing explained. <https://olixabeauty.com/journal/cold-pressing-oil> (dostop 26. 10. 2022)
- [50] Cold Pressed Oils: the Major Upgrade from Supermarket Oils. <https://www.ullisoilmill.com/blogs/articles/cold-pressed-oils> (dostop 27. 10. 2022)
- [51] Switch to cold-pressed oils for amazing health benefits. <https://pristineorganics.com/switch-to-cold-pressed-oils/> (dostop 25. 10. 2022)
- [52] The NatureFRESH Cold Press Process. <https://www.botanicinnovations.com/expertise/cold-press-process/> (dostop 26. 10. 2022)
- [53] Why cold pressed is best?. <https://www.totallykiwi.co.nz/blogs/research/why-cold-pressed-is-best> (dostop 25. 10. 2022)
- [54] Bauman, Davorin (1952). Hladno stiskanje olja. 15. 12. 2022.
- [55] Knez, Ž., Škerget, M. Termodifuzijski separacijski procesi (zbrano gradivo). Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2009.
- [56] Chanioti, S., Liadakis, G., Constantina, Tzia. Solid-liquid extraction. *Food Engineering Handbook*, 253-286, 2014.
- [57] Shaqib, F., Shabir, A. M., Manzoor, A. S., Manickavasagan, A. Chapter 2 – Extraction techniques. *Plant Extracts: Applications in the Food Industry*, 23-37, 2022.
- [58] Walker, G. S. Sample preparation for Chromatographic Applications in Forensic Science. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 864-876, 2012.
- [59] Filtration. <https://www.chegg.com/learn/chemistry/introduction-to-chemistry/filtration> (dostop 26. 10. 2022)
- [60] Organic laboratory techniques 3. <https://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/laboratory/filtration.pdf> (dostop 28. 10. 2022)

- [61] Elgie, K. What is a Rotary Evaporator?, 2022. <https://www.asynt.com/blo/what-is-a-rotary-evaporator/> (dostop 27. 10. 2022)
- [62] Vacuum evaporation. <https://aquadest.cz/en/vacuum-evaporation> (dostop 27. 10. 2022)
- [63] Rotary Evaporator. <https://chembam.com/definitions/rotary-evaporator/> (dostop 27. 10. 2022)
- [64] Rotary Evaporation, 2021. https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Demos_tehniques_and_experiments/general_lab_tehniques/rotary_evaporation (dostop 27. 10. 2022)
- [65] Geankoplis, C. J. Transport Processes and Unit Operations, 3. New Jersey: Prentice-Hall International, Inc., 1993.
- [66] Gorane, J. Filtration – definition, process, examples and limitations, 2022. <https://classnotes123.com/filtration-definition-process-examples-and-limitations/> (dostop 26. 10. 2022)
- [67] Basinger, J. Chemical processing 101: Drying. <https://howardchem.com/chemical-processing-101-drying/> (dostop 26. 10. 2022)
- [68] Vacuum drying equipment for powders. <https://www.amixon.com/en/vacuum-drying> (dostop 27. 10. 2022)
- [69] Vacuum drying. https://en.wikipedia.org/wiki/vacuum_drying (dostop 27. 10. 2022)
- [70] Ngamwonglumert, L. Microstructure and its relationship with quality and storage stability of dried foods. Food Microstructure and Its Relationship with Quality and Stability, 139-159, 2018.
- [71] Jiang, H., Zhang, M. Fruit and vegetable powders. Handbook of Food Powders, 532-552, 2013.
- [72] Moisture Analyzers. https://www.mt.com/gb/en/home/products/Laboratory_Weighing_Solutions/moisture-analyzer.html (dostop 27. 10. 2022)
- [73] Drying oven method vs. halogen moisture analyzer. https://www.mt.com/ca/en/home/library/white-papers/laboratory-weighing/Drying_Oven_vs_Halogen_Moisture_Analyzer.html. (dostop 28. 10. 2022)
- [74] May, M. Top features of moisture analyzers. <https://www.labmanager.com/product-focus/top-features-of-moisture-analyzers-25031>. 2021. (dostop 28. 10. 2022)
- [75] A quick guide to moisture analyzers. <https://www.adamequipment.com/es/aeblog/guide-to-moisture-analyzers>. (dostop 28. 10. 2022)
- [76] Zeenat, S. A., Kamm, I., Nguyen T., Pellet, J. D., Kumar, A. Loss on drying using halogen moisture analyzer: an orthogonal technique for monitoring volatile content for in-process control samples during pharmaceutical manufacturing. Organic process research & amp, 25, 300-307, 2021.
- [77] Sedimentation and Centrifugation. <https://www.chegg.com/learn/physics/introduction-to-physics/sedimentation-and-centrifugation> (dostop 27. 10. 2022)
- [78] Centrifugation theory. <https://www.fishersci.se/se/en/scientific-products/centrifuge-guide/centrifugation-theory.html> (dostop 27. 10. 2022)
- [79] Sagar, A. HPLC – Definition, principle, parts, types, uses, diagram, 2022. <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/> (dostop 27. 10. 2022)

- [80] Holler, J. F., Crouch, S. R. Fundamentals of analytical chemistry 9E. Belmont: Brooks/Cole, 2014.
- [81] What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)? https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html (dostop 27. 10. 2022)
- [82] HPLC VS. UPLC. <https://dyadlabs.com/hplc-vs-uplc/> (dostop 27. 10. 2022)
- [83] Gas Chromatography, 2020. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography) (dostop 27. 10. 2022)
- [84] What is Gas Chromatography ? <https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/gas-chromatography/what-is-gas-chromatography/index.html> (dostop 27. 10. 2022)
- [85] Introduction to gas chromatography – principles, characteristics and process. <https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/introduction-to-gas-chromatography-principles-characteristics-and-process/> (dostop 27. 10. 2022)
- [86] Turner, D. Gas Chromatography – How a gas chromatography machine works, how to read chromatograph and GCxGC, 2021. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxc-335168> (dostop 27. 10. 2022)
- [87] European Medicines Agency. ICH guidelines Q3C (R6) on impurities: guideline for residual solvents, 2017. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-33.pdf (dostop 27. 10. 2022)
- [88] Directive 2009/32/ES of the european parliament and of the council of 23 April 2009 on the approximation of the laws of the member states on extraction solvents used in the production of foodstuffs and food ingredients. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32009L0032>. (dostop 29. 10. 2022).
- [89] What is spectrophotometry? <https://www.hzcaipu.com/en/download/fileview421.html> (dostop 27. 10. 2022)
- [90] UV-Vis Absorption Spectroscopy. <https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/uvvisab3.htm> (dostop 27. 10. 2022)
- [91] Design Expert 13. <https://www.statease.com/software/design-expert/> (dostop 27. 10. 2022)
- [92] Kandanand, K. Using the Response Surface Method to Optimize the Turning. Advances in Mechanical Engineering, 2010.
- [93] Box-Behnken Designs for Optimizing Product Performance. <https://www.weibull.com/hotwire/issue130/hottopics130.htm> (dostop 27. 10. 2022)
- [94] Box-Behnken Design. https://en.wikipedia.org/wiki/Box%E2%80%93Behnken_design (dostop 27. 10. 2022)
- [95] Palanikumar, K., Davim, P. J. Electrical discharge machining: Study on machining characteristics of WC/Co composites. Machining and Machine-Tools, 135-168, 2013.
- [96] Cvelbar, M., Šmid-Korbar, J., Budihna, M. Farmacevtski zakoniki: Evropska Farmakopeja in Formularium Slovenicum z dopolnili. Zdravstveni vestnik, 72, 25-26, 2003.

- [97] Fran. <https://fran.si/iskanje?View=1&Query=farmakopeja> (dostop 27. 10. 2022)
- [98] Odredba o določitvi nacionalnega dodatka k evropski farmakopeji, stran 3209. <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/1998-01-1956/>, 1956. (dostop 27. 10. 2022)
- [99] Common Solvents Used in Organic Chemistry: Table of Properties. <https://organicchemistrydata.org/solvents/> (dostop 27. 10. 2022)
- [100] Solvent Removal. <https://www.orgchemboulder.com/Technique/Procedures/SolventRemoval/SolventRemoval.shtml> (dostop 28. 10. 2022)
- [101] Safety Data Sheet: Organic Milk Thistle Oil (*Silybum marianum*). https://www.nhrorganicoils.com/uploads/20170613095523e_Milk_Thistle_SDS.pdf (dostop 28. 10. 2022)
- [102] Thermal Stability of Tocopherol. <https://skinchakra.eu/blog/archives/428-Thermal-stability-of-Tocopherol.html> (dostop 28. 10. 2022)
- [103] Lohani, U. C., Fallahi, P., Muthukumarappan, K. Comparison of Ethyl Acetate with Hexane for Oil Extraction from Various Oilseeds. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 92, 743-754, 2015.
- [104] Bijak, M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)-Chemistry, Bioavailability and Metabolism. *Molecules*, 22(11), 2017.

8 Priloge

8.1 Ekstrakcija olja

Tabela 8-1. Izračun izkoristkov ekstrakcij olja iz semen pegastega badlja.

Način ekstrakcije	m_{semen} (g)	m_b (g)	m_{b+o} (g)	m_o (g)	η (%)
ekstrakcija s heksanom	194,35	267,40	289,16	21,76	11,20
ekstrakcija s cikloheksanom	212,99	273,12	304,08	30,96	14,54
ekstrakcija z etil acetatom	214,69	317,08	349,95	32,87	15,31
hladno stiskanje	9568,12	/	/	3096,28	32,36

Primer izračuna za ekstrakcijo s heksanom:

$$m_o = m_{b+o} - m_b = 289,16 \text{ g} - 267,40 \text{ g} = 21,76 \text{ g} \quad (8.1)$$

$$\eta = \frac{m_o \cdot 100}{m_{\text{semen}}} = \frac{21,76 \text{ g} \cdot 100}{194,35 \text{ g}} = 11,20 \% \quad (8.2)$$

kjer je:

m_{b+o}	masa bučke in olja po uparjanju (g)
m_b	masa bučke (g)
m_o	masa ekstrahiranega olja (g)
m_{semen}	masa zatehtanih semen za ekstrakcijo olja (g)
η	izkoristek ekstrakcije (%)

8.2 Izbira topila za ekstrakcijo silimarina iz hladno stiskanega materiala

Tabela 8-2. Izkoristki ekstrakcij silimarina, ekstrahiranih iz predhodno razmaščenih semen pegastega badlja s hladnim stiskanjem, z različnimi topili.

Topilo	$m_{\text{razmaščenih semen}}$ (g)	m_b (g)	$m_{b+o+ekstr}$ (g)	$m_{o+ekstr}$ (g)	m_v (g)	$m_{v+ekstr}$ (g)	m_{ekstr} (g)	$\eta_{o+ekstr}$ (%)	η_{ekstr} (%)
aceton	50,11	186,50	191,30	4,80	15,62	15,85	0,22	9,58	0,45
etanol	53,22	188,57	191,96	3,39	15,32	15,60	0,27	6,37	0,51
metanol	50,72	185,53	188,35	2,82	15,12	15,42	0,29	5,56	0,58
2-propanol	51,13	196,62	199,95	3,33	15,66	15,86	0,20	6,51	0,39
acetonitril	50,08	195,03	198,73	0,70	15,70	16,02	0,32	1,40	0,64
etil acetat	51,58	186,69	190,28	3,59	15,53	15,53	0,00	6,96	0,00

Primer izračuna za ekstrakcijo z acetonom:

$$m_{o+ekstr} = m_{b+o+ekstr} - m_b = 191,30 \text{ g} - 186,50 \text{ g} = 4,80 \text{ g} \quad (8.3)$$

$$\eta_{o+ekstr} = \frac{m_{o+ekstr} \cdot 100}{m_{razmaščenih\ semen}} = \frac{4,80 \text{ g} \cdot 100}{50,11 \text{ g}} = 9,58 \% \quad (8.4)$$

Kjer je:

$m_{o+ekstr}$ masa ekstrahiranega olja in trdnega ekstrakta (g)
 $m_{b+o+ekstr}$ masa bučke, ekstrahiranega olja in trdnega ekstrakta (g)
 m_b masa bučke (g)
 $\eta_{o+ekstr}$ izkoristek ekstrakcije glede na količino ekstrahiranega olja in trdnega ekstrakta (%)

$$m_{ekstr} = m_{v+ekstr} - m_v = 15,85 - 15,62 = 0,22 \text{ g} \quad (8.5)$$

$$\eta_{ekstr} = \frac{m_{ekstr} \cdot 100}{m_{razmaščenih\ semen}} = \frac{0,22 \text{ g} \cdot 100}{50,11 \text{ g}} = 0,45 \% \quad (8.6)$$

Kjer je:

$m_{v+ekstr}$ masa vial in trdnega ekstrakta (g)
 m_{ekstr} masa trdnega ekstrakta (g)
 m_v masa vial (g)
 $m_{razmaščenih\ semen}$ masa zatehtanih razmaščenih semen pegastega badlja za ekstrakcijo silimarina (g)
 η_{ekstr} izkoristek ekstrakcije glede na količino ekstrahiranega trdnega ekstrakta (%)

Tabela 8-3. Podatki o pikih, dobljenih za ekstrakcije silimarina iz predhodno razmaščenih semen, z metodo hladnega stiskanja, z različnimi topili.

Topilo	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	m ₁ (g)	m ₂ (g)	p (%)
aceton	11,63	41,60	12,26	19,41	12,46	5,91	13,62	21,21	0,04	0,07	26,90
etanol	7,00	21,52	5,75	9,08	5,88	2,81	13,62	21,21	0,04	0,07	26,90
metanol	11,58	43,23	10,46	16,52	13,40	7,42	13,62	21,21	0,04	0,09	26,90
2-propanol	5,33	16,98	4,10	6,46	4,38	2,19	13,62	21,21	0,04	0,06	26,90
acetonitril	8,68	33,14	10,71	16,86	10,84	5,22	13,62	21,21	0,04	0,07	26,90

Primer izračuna vsebnosti silimarina za aceton:

$$\% \text{ totalnega silimarina} = \frac{(A_1+A_2+A_3+A_4+A_5+A_6) \cdot m_1 \cdot p}{(A_7+A_8) \cdot m_2} = \frac{(11,63 + 41,60 + 12,26 + 19,41 + 12,46 + 5,91) \cdot 0,04 \text{ g} \cdot 26,90 \%}{(13,62 + 21,21) \cdot 0,07 \text{ g}} = 42,06 \% \quad (8.7)$$

$$\% \text{ silikristina + silidianina} = \frac{(A_1+A_2) \cdot m_1 \cdot p}{(A_7+A_8) \cdot m_2} = \frac{(11,63+41,60) \cdot 0,04 \text{ g} \cdot 26,90 \%}{(13,62+21,21) \cdot 0,07 \text{ g}} = 21,68 \% \quad (8.8)$$

$$\% \text{ silibinina A + silibinina B} = \frac{(A_3+A_4) \cdot m_1 \cdot p}{(A_7+A_8) \cdot m_2} = \frac{(12,26+19,41) \cdot 0,04 \text{ g} \cdot 26,90 \%}{(13,62+21,21) \cdot 0,07 \text{ g}} = 12,90 \% \quad (8.9)$$

$$\%_{\text{izosilibinina A + izosilibinina B}} = \frac{(A_5 + A_6) \cdot m_1 \cdot p}{(A_7 + A_8) \cdot m_2} = \frac{(12,46 + 5,91) \cdot 0,04 \text{ g} \cdot 26,90 \%}{(13,62 + 21,21) \cdot 0,07 \text{ g}} = 7,48 \% \quad (8.10)$$

kjer je:

% totalnega silimarina	vsebnost totalnega silimarina (%)
%silikristina + silidianina	vsebnost silikristina in silidianina (%)
% silibinina A + silibinina B	vsebnost silibinina A in silibinina B (%)
%izosilibinina A + izosilibinina B	vsebnost izosilibinina A in izosilibinina B (%)
A ₁	območje pika silikristina testne raztopine
A ₂	območje pika silidianina testne raztopine
A ₃	območje pika silibinina A testne raztopine
A ₄	območje pika silibinina B testne raztopine
A ₅	območje pika isosilbinina A testne raztopine
A ₆	območje pika isosilbinina B testne raztopine
A ₇	območje pika silibinina A standardne raztopine
A ₈	območje pika silibinina B standardne raztopine
m ₁	masa zatehtanega standarda (g)
m ₂	masa zatehtanega ekstrakta (g)
p	odstotek standarda (%)

Tabela 8-4. Vsebnosti komponent silimarina v ekstraktih, ekstrahiranih iz predhodno razmaščenih semen z metodo hladnega stiskanja, z različnimi topili.

Topilo	%totalni silimarin (%)	%silikristin + silidianin (%)	%silibinin A + silibinin B (%)	%izosilibinin A + izosilibinin B (%)	%SS (%)
acetone	42,06	21,68	12,90	7,48	96,00
etanol	20,48	11,23	5,84	3,42	97,00
metanol	32,20	17,20	8,47	6,54	98,42
2-propanol	17,54	9,92	4,70	2,92	97,41
acetonitril	35,39	17,32	11,42	6,65	97,18

Tabela 8-5. Vsebnosti komponent silimarina v ekstraktih, ekstrahiranih iz predhodno razmaščenih semen z metodo hladnega stiskanja, z različnimi topili, preračunanimi na suho snov.

Topilo	%totalni silimarin (%)	%silikristin + silidianin (%)	%silibinin A + silibinin B (%)	%izosilibinin A + izosilibinin B (%)
acetone	43,82	22,58	13,44	7,80
etanol	21,12	11,57	6,02	3,53
metanol	32,72	17,48	8,60	6,64
2-propanol	18,00	10,18	4,82	3,00
acetonitril	36,42	17,83	11,75	6,84

Primer preračuna vsebnosti na suho snov za totalni silimarin za topilo acetone:

$$\%_{\text{totalni silimarin SS}} = \frac{\%_{\text{totalnega silimarina}} \cdot 100 \%}{\%_{\text{SS}}} = \frac{42,06 \% \cdot 100 \%}{96,00 \%} = 43,82 \% \quad (8.11)$$

kjer je:

$\%_{totalni\ silimarini\ SS}$

vsebnost totalnega silimarina preračunana na suho snov (%)

$\%_{SS}$

odstotek suhe snovi v vzorcu (%)

8.3 Optimizacija ekstrakcijskih pogojev za ekstrakcijo silimarina iz predhodno razmaščene materiala s programom Design Expert 13

Tabela 8-6. Izkoristki ekstrakcij predhodno razmaščene semen pegastega badlja z metodo hladnega stiskanja, z acetonom, pri različnih pogojih, ki jih je določil program Design-Expert 13.

Ekstrakcija	$m_{razmaščeneh\ semen}$ (g)	m_b (g)	$m_{b+o+ekstr}$ (g)	$m_{o+ekstr}$ (g)	m_v (g)	$m_{v+ekstr}$ (g)	m_{ekstr} (g)	$\eta_{o+ekstr}$ (%)	η_{ekstr} (%)
1	105,05	186,65	195,04	8,39	14,99	15,51	0,52	7,99	0,50
2	112,69	187,19	198,66	11,47	15,24	15,89	0,65	10,18	0,58
3	101,17	185,49	195,01	9,52	15,75	16,23	0,48	9,41	0,48
4	103,15	196,6	206,37	9,77	16,10	17,39	1,28	9,47	1,25
5	102,09	196,59	205,46	8,87	15,23	15,73	0,50	8,69	0,49
6	95,28	185,49	193,34	7,85	15,37	16,35	0,98	8,24	1,03
7	98,020	267,4	279,06	11,66	15,74	16,35	0,61	11,90	0,62
8	109,11	318	328,07	10,07	15,82	17,46	1,64	9,23	1,51
9	100,74	186,27	196,36	10,09	15,09	15,49	0,40	10,02	0,40
10	101,94	195,01	202,73	7,72	15,44	16,32	0,88	7,57	0,86
11	104,30	267,38	276,94	9,56	15,74	16,35	0,61	9,17	0,59
12	108,87	318,01	328,35	10,34	15,36	15,97	0,61	9,50	0,56
13	109,11	318,01	328,07	10,06	15,58	16,36	0,78	9,22	0,72

Tabela 8-7. Podatki o pikih za ekstrakte silimarina, ekstrahirane iz predhodno razmaščene semen pegastega badlja z metodo hladnega stiskanja, pri različnih pogojih, ki jih je določil program Design-Expert 13.

Ekstrakcija	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	m_1 [g]	m_2 [g]	p [%]
1	9,23	29,43	9,38	14,75	9,08	4,57	13,67	21,27	0,04	0,07	26,90
2	13,46	49,42	12,61	20,53	15,72	8,82	13,67	21,27	0,04	0,09	26,90
3	15,94	53,90	15,54	24,76	16,85	9,01	13,67	21,27	0,04	0,09	26,90
4	15,97	56,63	13,01	20,90	17,26	10,10	13,67	21,27	0,04	0,11	26,90
5	12,65	41,90	14,08	22,24	14,31	7,36	13,67	21,27	0,04	0,07	26,90
6	10,69	40,47	9,33	15,25	12,24	7,11	13,67	21,27	0,04	0,07	26,90
7	13,51	43,39	13,54	21,39	13,47	6,98	13,67	21,27	0,04	0,07	26,90
8	10,90	40,04	9,32	15,12	11,86	6,77	13,67	21,27	0,04	0,07	26,90
9	13,16	43,84	12,46	19,88	13,43	7,16	13,67	21,27	0,04	0,07	26,90
10	13,68	47,60	11,49	18,56	14,00	7,93	13,67	21,27	0,04	0,08	26,90
11	8,24	28,79	7,02	11,38	8,36	4,60	13,67	21,27	0,04	0,07	26,90

12	11,68	36,74	10,63	16,44	11,33	6,10	13,67	21,27	0,04	0,06	26,90
13	12,21	43,28	11,40	18,26	13,02	7,12	13,67	21,27	0,04	0,07	26,90
14	12,16	42,80	11,11	17,87	12,54	7,09	13,67	21,27	0,04	0,07	26,90
15	10,33	41,75	10,72	16,71	11,91	6,72	13,67	21,27	0,04	0,07	26,90

Tabela 8-8. Vsebnosti silimarina v ekstraktih, ekstrahiranih iz predhodno razmaščenih semen pegastega badlja z metodo hladnega stiskanja, z acetonom, pri različnih pogojih, ki jih je določil program Design-Expert 13.

Številka ekstrakcije	T (°C)	t (h)	Razmerje topilo : topljenec (mL/g)	%totalni silimarin (%)	%silikristin + silidianin (%)	%silibinin A + silibinin B (%)	%izosilibinin A + izosilibinin B (%)	% _{SS} (%)
1	25	4	3	30,25	15,36	9,54	5,34	95,7
2	50	4	3	36,12	18,92	9,90	7,30	95,8
3	25	12	3	39,43	20,34	11,67	7,43	96,53
4	50	12	3	33,78	18,40	8,54	6,84	97,13
5	25	8	2	41,78	20,32	13,45	8,01	97,26
6	50	8	2	36,57	19,77	9,41	7,40	98,05
7	25	8	4	42,82	21,78	13,32	7,72	97,19
8	50	8	4	36,29	19,74	9,39	7,16	98,67
9	38	4	2	40,46	21,09	11,87	7,50	96,92
10	38	12	2	36,37	19,77	9,63	6,97	97,63
11	38	4	4	27,02	14,72	7,24	5,06	97,36
12	38	12	4	41,50	21,70	12,07	7,73	96,31
13	38	8	3	38,43	20,35	10,79	7,29	96,51
14	38	8	3	38,92	20,75	10,85	7,31	97,25
15	38	8	3	38,49	20,53	10,72	7,24	97,15

Tabela 8-9. Vsebnosti silimarina v ekstraktih, ekstrahiranih iz predhodno razmaščenih semen pegastega badlja z metodo hladnega stiskanja, z acetonom, pri različnih pogojih, ki jih je določil program Design-Expert 13, preračunane na suho snov.

Številka ekstrakcije	T (°C)	t (h)	Razmerje topilo : topljenec (mL/g)	%totalni silimarin (%)	%silikristin + silidianin (%)	%silibinin A + silibinin B (%)	%izosilibinin A + izosilibinin B (%)
1	25	4	3	31,61	16,05	9,97	5,58
2	50	4	3	37,70	19,75	10,33	7,62
3	25	12	3	40,85	21,07	12,09	7,69
4	50	12	3	34,78	18,94	8,79	7,05
5	25	8	2	42,96	20,89	13,83	8,24
6	50	8	2	37,30	20,16	9,59	7,55
7	25	8	4	44,06	22,41	13,71	7,94

8	50	8	4	36,78	20,01	9,52	7,26
9	38	4	2	41,75	21,76	12,25	7,74
10	38	12	2	37,25	20,25	9,86	7,14
11	38	4	4	27,75	15,11	7,44	5,20
12	38	12	4	43,09	22,53	12,53	8,02
13	38	8	3	39,82	21,08	11,18	7,55
14	38	8	3	40,02	21,34	11,17	7,52
15	38	8	3	39,62	21,13	11,03	7,45

8.4 Ekstrakcije nerazmaščene materiala in materiala razmaščene na različne načine pri optimalnih pogojih

Tabela 8-10. Izkoristki ekstrakcij silimarina iz nerazmaščene in predhodno razmaščene semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih.

Ekstrakcija	$m_{\text{razmaščeneh semen (g)}}$	$m_b \text{ (g)}$	$m_{b+o+ekstr} \text{ (g)}$	$m_{o+ekstr} \text{ (g)}$	$m_v \text{ (g)}$	$m_{v+ekstr} \text{ (g)}$	$m_{ekstr} \text{ (g)}$	$\eta_{o+ekstr} \text{ (\%)}$	$\eta_{ekstr} \text{ (\%)}$
1	151,02	186,47	194,46	7,99	15,63	17,02	1,39	5,29	0,92
2	158,77	194,99	204,83	9,84	15,64	16,41	0,77	6,20	0,49
3	154,64	187,21	195,72	8,51	15,60	16,58	0,98	5,50	0,63
4	159,20	185,51	195,5	9,99	15,75	17,80	2,06	6,28	1,29
5	160,28	186,27	202,3	16,03	15,61	17,55	1,94	10,00	1,21

Izračun vsebnosti silimarina pri določenih optimalnih pogojih s pomočjo enačbe, ki jo je predlagal program Design-Expert 13:

$$\begin{aligned}
 Y = & -28,14 + 3,608 \cdot A + 9,6125 \cdot B + 3,88 \cdot C - 0,1844 \cdot A \cdot B - 1,0812 \cdot A \cdot C + \\
 & 1,24 \cdot B \cdot C - 0,029952 \cdot A^2 - 0,8075 \cdot B^2 + 0,84 \cdot C^2 - 0,001808 \cdot A^2 \cdot B + \\
 & 0,013984 \cdot A^2 \cdot C + 0,0162 \cdot A \cdot B^2 = -28,14 + 3,608 \cdot 25^\circ C + 9,6125 \cdot 11 h + \\
 & 3,88 \cdot 4 \text{ mL/g} - 0,1844 \cdot 25^\circ C \cdot 11 h - 1,0812 \cdot 25^\circ C \cdot 4 \text{ mL/g} + 1,24 \cdot 11 h \cdot \\
 & 4 \text{ mL/g} - 0,029952 \cdot (25^\circ C)^2 - 0,8075 \cdot (11 h)^2 + 0,84 \cdot (4 \text{ mL/g})^2 - 0,001808 \cdot \\
 & (25^\circ C)^2 \cdot 11 h + 0,013984 \cdot (25^\circ C)^2 \cdot 4 \text{ mL/g} + 0,0162 \cdot 25^\circ C \cdot (4 \text{ mL/g})^2 = 47,62 \\
 & \%
 \end{aligned}
 \tag{8.12}$$

kjer je:

- A temperatura ($^\circ\text{C}$)
 B čas (h)
 C razmerje topilo : topljenec (mL/g)

Tabela 8-11. Vsebnosti silimarina v ekstraktih, ekstrahiranih iz nerazmaščene in razmaščene semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih.

Način razmaščevanja	%totalni silimarin (%)	%silikristin + silidianin (%)	%silibinin A + silibinin B (%)	%izosilibinin A + izosilibinin B (%)	%SS (%)
heksan	33,00	17,22	9,36	6,42	95,44

cikloheksan	38,24	19,95	10,96	7,34	96,34
etil acetat	31,21	16,41	8,74	6,05	97,15
stiskan material	46,02	22,28	13,19	9,75	96,56
nerazmaščen material	11,47	6,26	3,09	2,11	95,64

Tabela 8-12. Vsebnosti silimarina v ekstraktih, ekstrahiranih iz nerazmaščenih in razmaščenih semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih, preračunani na suho snov.

Način razmaščevanja	%totalni silimarin (%)	%silikristin + silidianin (%)	%silibinin A + silibinin B (%)	%izosilibinin A + izosilibinin B (%)
heksan	34,58	18,05	9,80	6,73
cikloheksan	39,69	20,70	11,37	7,62
etil acetat	32,12	16,89	9,00	6,23
stiskan material	47,66	23,57	13,88	10,21
nerazmaščen material	11,99	6,55	3,23	2,21

8.5 Vsebnost totalnih fenolov v ekstraktih silimarina, ekstrahiranih pri optimalnih pogojih

Tabela 8-13. Podatki za preračun vsebnosti totalnih fenolov v ekstraktih, ekstrahiranih iz nerazmaščenih in razmaščenih semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih.

Vzorec	m_{vzorca} (mg)	A_{760}	η (%)
1	15,67	0,6540	0,92
2	7,38	0,3590	0,49
3	7,19	0,3093	0,63
4	7,43	0,4376	1,29
5	7,82	0,1502	1,21

Primer izračuna vsebnosti totalnih fenolov za vzorec številka 1:

Vrednosti k in n smo odčitali iz umeritvene krivulje:

$$k = 0,0108$$

$$n = 0,0328$$

$$\gamma_{GA \text{ vzorec}} = \frac{A_{760} - n}{k} = \frac{0,6540 - 0,0328}{0,0108} = 57,52 \text{ mg/L} = 0,05752 \text{ mg/mL} \quad (8.13)$$

$$\gamma_{\text{vzorec}} = \frac{m_{\text{vzorca}}}{V_{\text{raztopine}}} = \frac{15,67 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} = 0,157 \text{ g/L} \quad (8.14)$$

$$\omega_{GA \text{ ekstrakt}} = \frac{\gamma_{GA \text{ vzorec}}}{\gamma_{\text{vzorec}}} = \frac{57,52 \text{ mg/L}}{0,157 \text{ g/L}} = 367,06 \text{ mg/g ekstrakta} \quad (8.15)$$

$$\%_{GA \text{ v ekstraktu}} = \frac{\omega_{GA \text{ ekstrakt}}}{10} = \frac{367,06 \text{ mg/g ekstrakta}}{10} = 36,71 \% \quad (8.16)$$

$$\omega_{GA \text{ material}} = \omega_{GA \text{ ekstrakt}} \cdot \frac{\eta_{ekstrakcije}}{100} = 367,06 \text{ mg/g ekstrakta} \cdot \frac{0,92}{100} = 3,38 \text{ mg/g material} \quad (8.17)$$

kjer je:

A_{760}	absorbanca raztopine vzorca pri valovni dolžini 760 nm (/)
n	odsek premice umeritvene krivulje na y osi (/)
k	naklon umeritvene krivulje (mL/mg)
$\gamma_{GA \text{ vzorec}}$	koncentracija galne kisline v vzorcu (mg/mL)
γ_{vzorec}	koncentracija ekstrakta (mg/mL)
m_{vzorca}	masa zatehte ekstrakta (mg)
$V_{raztopine}$	volumen raztopine vzorca = 100 mL
$\eta_{ekstrakcije}$	izkoristek ekstrakcije (mg)
$\omega_{GA \text{ ekstrakt}}$	vsebnost totalnih fenolov v ekstraktu (mg GA/g ekstrakta)
$\%_{GA \text{ v ekstraktu}}$	vsebnost totalnih fenolov v ekstraktu (%)
$\omega_{GA \text{ material}}$	vsebnost totalnih fenolov v materialu (mg GA/g materiala)

Tabela 8-14. Vsebnosti totalnih polifenolov v vzorcih, ekstrahiranih iz nerazmaščenih in razmaščenih semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih..

Vzorec	% polifenolov (%)	$\omega_{GA \text{ ekstrakt}}$ (mg GA/g ekstrakta)	$\omega_{GA \text{ material}}$ (mg GA/g materiala)
1	36,71	367,06	3,38
2	40,97	409,26	2,00
3	35,63	356,32	2,24
4	50,44	504,46	6,50
5	13,91	139,09	1,68

8.6 Vsebnost ogljikovih hidratov v ekstraktih silimarina, ekstrahiranih pri optimalnih pogojih

Tabela 8-15. Podatki za preračun totalnih ogljikovih hidratov, ekstrahiranih iz nerazmaščenih in razmaščenih semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih..

Vzorec	m_{vzorca} (mg)	A_{760}	η (%)
1	13,575	1,0600	0,92
2	10,97	1,2845	0,49
3	10,865	1,0631	0,63
4	11,02	0,8764	1,29
5	10,69	0,9391	1,21

Primer izračuna totalnih ogljikovih hidratov za vzorec številka 1:

Iz umeritvene krivulje smo odčitali vrednosti k in n :

$$k = 0,0148$$

$$n = 0,0186$$

$$\gamma_{GL \text{ vzorec}} = \frac{A_{490} - n}{k} = \frac{1,060 - 0,0186}{0,0148} = 70,36 \text{ mg/L} \quad (8.18)$$

$$\gamma_{\text{vzorec}} = \frac{m_{\text{ekstrakt}}}{V_{\text{raztopine}}} = \frac{13,575 \text{ mg}}{4 \text{ mL}} = 3,39 \text{ mg/mL} \quad (8.19)$$

$$\omega_{GL \text{ ekstrakt}} = \frac{\gamma_{GL \text{ vzorec}}}{\gamma_{\text{vzorec}}} = \frac{70,36 \text{ mg/L}}{3,39 \text{ mg/mL}} = 20,73 \text{ mg/g ekstrakta} \quad (8.20)$$

$$\%_{GL \text{ v ekstraktu}} = \frac{\omega_{GL \text{ ekstrakt}}}{10} = \frac{20,75 \text{ mg/g ekstrakta}}{10} = 2,07 \% \quad (8.21)$$

$$\omega_{GL \text{ material}} = \omega_{GL \text{ ekstrakt}} \cdot \frac{\eta_{\text{ekstrakcije}}}{100} = 20,75 \text{ mg/g ekstrakta} \cdot \frac{0,92}{100} = 0,19 \text{ mg/g materiala} \quad (8.22)$$

A_{490}	absorbanca raztopine vzorca pri valovni dolžini 490 nm (/)
n	odsek premice umeritvene krivulje na y osi (/)
k	naklon umeritvene krivulje (mL/mg)
γ_{GL}	koncentracija glukoze v raztopini vzorca (mg/mL)
$\gamma_{GL \text{ vzorec}}$	koncentracija glukoze v vzorcu (mg/mL)
γ_{vzorec}	koncentracija ekstrakta v raztopini vzorca (mg/mL)
m_{vzorec}	masa zatehte ekstrakta (mg)
$V_{\text{raztopine}}$	volumen raztopine vzorca = 4 mL
$\eta_{\text{ekstrakcije}}$	izkoristek ekstrakcije (mg)
$\omega_{GL \text{ ekstrakt}}$	vsebnost ogljikovih hidratov v ekstraktu (mg GL/g ekstrakta)
$\%_{GL \text{ v ekstraktu}}$	vsebnost ogljikovih hidratov v ekstraktu (%)
$\omega_{GL \text{ material}}$	vsebnost ogljikovih hidratov v materialu (mg GL/g materiala)

Tabela 8-16. Vsebnosti totalnih ogljikovih hidratov v vzorcih, ekstrahiranih iz nerazmaščeni in razmaščeni semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom, pri optimalnih pogojih..

Vzorec	%ogljikovih hidratov (%)	ω_{GL} ekstrakt (mg GL/g ekstrakta)	ω_{GL} material (mg GL/g materiala)
1	2,07	20,73	0,19
2	3,12	31,19	0,15
3	2,60	25,98	0,16
4	2,10	21,04	0,27
5	2,33	23,27	0,28

8.7 Določanje antioksidativne aktivnosti z DPPH radikalno metodo v ekstraktih silimarina, ekstrahiranih pri optimalnih pogojih

Tabela 8-17. Rezultati antioksidativne aktivnosti v vzorcih, ekstrahiranih iz nerazmaščeni in razmaščeni semen pegastega badlja na različne načine, z acetonom pri optimalnih pogojih..

Vzorec	A_{vz}^{15}	%inhibicije
1	0,4070	40,16
2	0,3829	43,70
3	0,4179	38,55
4	0,3716	45,36
5	0,5508	19,01

Primer izračuna za antioksidativno aktivnost za vzorec številka 1:

A_{ref}^0 je bil izmerjen 0,6801.

$$\% \text{ inhibicije} = \left(\frac{A_{ref}^0 - A_{vz}^{15}}{A_{ref}^0} \right) \cdot 100 = \frac{(0,6801 - 0,4070)}{0,6801} \cdot 100 = 40,16 \% \quad (8.23)$$

kjer je:

A_{ref}^0 absorbanca referenčne raztopine v času 0 minut

A_{vz}^{15} absorbanca vzorca v času 15 minut

Izjava o avtorstvu zaključnega dela



Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
(ime članice UM)

IZJAVA O AVTORSTVU ZAKLJUČNEGA DELA

Ime in priimek študenta/-ke: Mojca Hraš

Študijski program: KEMIJSKO INŽENIRSTVO

Naslov zaključnega dela: Pridobivanje produktov iz pegastega badlja (*silybum marianum*)

Mentor/-ica: Mojca Škerget

Somentor/-ica: Majca Hodošin Kolar

- Podpisani/-a študent/-ka Mojca Hraš
- izjavljam, da je zaključno delo rezultat mojega samostojnega dela, ki sem ga izdelal/-a ob pomoči mentorja/-ice oz. somentorja/-ice;
 - izjavljam, da sem pridobil/-a vsa potrebna soglasja za uporabo podatkov in avtorskih del v zaključnem delu in jih v zaključnem delu jasno in ustrezno označil/-a;
 - na Univerzo v Mariboru neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi zaključno delo javnosti na svetovnem spletu preko DKUM; sem seznanjen/-a, da bodo dela, deponirana/objavljena v DKUM, dostopna široki javnosti pod pogoji licence Creative Commons BY-NC-ND, kar vključuje tudi avtomatizirano indeksiranje preko spleta in obdelavo besedil za potrebe tekstovnega in podatkovnega rudarjenja in ekstrakcije znanja iz vsebin; uporabnikom se dovoli reproduciranje brez predelave avtorskega dela, distribuiranje, dajanje v najem in priobčitev javnosti samega izvirnega avtorskega dela, in sicer pod pogojem, da navedejo avtorja in da ne gre za komercialno uporabo;
 - dovoljujem objavo svojih osebnih podatkov, ki so navedeni v zaključnem delu in tej izjavi, skupaj z objavo zaključnega dela.

Uveljavljam permisivnejšo obliko licence Creative Commons: CC BY 4.0
(navedite obliko)

Kraj in datum:
Maribor, 08.04.2023

Podpis študenta/-ke:
[Signature]