



UNIVERZA V MARIBORU
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Miha Oman

**UPORABA EKSTRAKCIJSKIH IN
KROMATOGRFSKIH METOD ZA
SEPARACIJO BIOLOŠKO AKTIVNIH SNOVI**

Diplomska naloga

Maribor, september 2010



Univerza v Mariboru

*Fakulteta za kemijo in
kemijsko tehnologijo*

Diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa
**UPORABA EKSTRAKCIJSKIH IN KROMATOGRFSKIH
 METOD ZA SEPARACIJO BIOLOŠKO AKTIVNIH SNOVI**

Študent: Miha OMAN
 Študijski program: univerzitetni, Kemijska tehnologija
 Smer: Kemijska tehnika
 Predvideni strokovni naslov: uni. dipl. inž. kem. tehnol.

Mentor: redni prof. dr. Željko Knez
 Somentorica: izr. Prof. dr. Mojca Škerget

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal(a) sam(a), prispevki drugih so posebej označeni.
 Pregledal(a) sem literaturo iz področja diplomskega dela po naslednjih elementih:

Vir:	Chemical Abstracts
Gesla:	Kromatografija, ekstrakcija, fosfolipidi
Skupine gesel (unija itd.):	
časovno obdobje:	Od leta 1992. do leta 2009
Število referenc:	16
Število prebranih izvlečkov:	20
Število prebranih člankov:	10
Število pregledanih knjig:	3

Maribor, september 2010

 podpis študenta



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo in
kemijsko tehnologijo

Številka: K-550
Datum: 18.08.2010

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Ur. l. RS, št. 1/2010)

izdajam

SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

Miha Oman, študent-ka univerzitetnega študijskega programa KEMIJSKA TEHNOLOGIJA, lahko izdelata diplomsko delo pri predmetu Termodifuzijska tehnika.

Mentor-ica: red. prof. dr. Željko Knez
Somentor-ica: izr. prof. dr. Mojca Škerget

Naslov diplomskega dela:

UPORABA EKSTRAKCIJSKIH IN KROMATOGRFSKIH METOD ZA SEPARACIJO BIOLOŠKO AKTIVNIH SNOVI

Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:

APPLICATION OF EXTRACTION AND CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR SEPARATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS

Diplomsko delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za izdelavo diplomskega dela« in ga oddati v treh izvodih ter en izvod elektronske verzije do 19.08.2011 v referatu za študentske zadeve Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na senat članice v roku 3 delovnih dni.

Obvestiti:

- kandidata -ko,
- mentorja,
- somentorja,
- odložiti v arhiv



DEKAN:
red. prof. dr. Željko Knez

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Željku Knezu za pomoč in vodenje pri opravljanju diplomskega dela. Prav tako se zahvaljujem somentorici, prof. dr. Mojci Kerget.

Hvala tudi mag. Petri Kotnik, Igorju Krmelju, Marku Kreiner in vsem zaposlenim v Laboratoriju za separacijske procese, ki so mi na kakrznikoli način pomagali pri delu.

Posebna zahvala velja staršem, ki so mi omogočili študij, mi pomagali in me spodbujali skozi vsa ta leta.

UPORABA EKSTRAKCIJSKIH IN KROMATOGRFSKIH METOD ZA SEPARACIJO BIOLOŠKO AKTIVNIH SNOVI

Povzetek

Biološko aktivne snovi so substance, ki imajo efekt na tkiva živalih organizmov. V diplomski nalogi smo raziskovali različne separacijske procese za izolacijo takih komponent iz rastlinskih materialov. Osredotočili smo se predvsem na ekstrakcijske in kromatografske metode separacije in primerjali smo konvencionalne metode z metodami s superkritnimi fluide.

Najprej smo opravili visokotlačne ekstrakcije (ekstrakcije s superkritnim fluidom - SFE) s propanom. Eksperimente smo izvedli pri različnih pogojih, opazovali smo kinetiko in konični izkoristek vsake superkritne ekstrakcije. Po teh eksperimentih smo tudi opazovali ekstrakcijo s različnimi organskimi topili (petroleter in etanol). Primerjali smo izkoristke med posameznimi tipi ekstrakcij in preverili ali so prisotna organska topila v ekstraktu. Ko smo vse ekstrakcije opravili, smo različne metode med seboj na splošno primerjali. Poskušali smo določiti, kakšne so prednosti in slabosti ene in druge in dejanska uporaba v industriji.

V drugem delu diplomske naloge smo se ukvarjali s kromatografskimi postopki separacije. Izvedli smo konvencionalno kolonsko kromatografijo surovega lecitina pri različnih temperaturah (25 °C, 40 °C in 60 °C). Iz surovega lecitina, v katerem je veliko fosfolipidov, smo poskušali skoncitrirati fosfatidilholin, ki je pomemben za žive organizme, saj sestavlja celične membrane.

Kakor je SFE alternativa konvencionalnim ekstrakcijam, je kromatografija s superkritnimi fluide (SFC) alternativa konvencionalni kolonski kromatografiji. V naslednji fazi smo zato raziskovali parametre, ki so pomembni za pripravo metode separacije s SFC. Uporabili smo superkritni CO_2 in se pri tem seznanili o njegovih lastnostih.

Po opravljenih eksperimentih smo različne kromatografije primerjali med seboj in razpravljali o potencialni uporabi v industriji.

Ključne besede: ekstrakcija, kromatografija, superkritni fluide, fosfolipidi, propan, CO_2

UDK: 543.54-139:66.061(043.2)

APPLICATION OF EXTRACTION AND CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR SEPARATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS

Abstract

Bioactive compounds are substances with effect on living tissue. In diploma thesis various separation processes for isolation of bioactive compounds from plant materials were explored. Research work was focused on extraction and chromatographic separation methods and conventional methods were compared with methods using SCF.

First high-pressure extractions (supercritical fluid extractions . SFE) of pumpkin cake with propane were done. Our experiments were carried out at various conditions and kinetics and final yields of pumpkin oil of each SFE was observed. After those experiments extraction of pumpkin oil from pumpkin cake with organic solvents (petroleum benzene and ethanol) was made. The yield of each type of extraction was compared and it was checked whether there was any organic solvent left in extract. After all extractions were done, various methods were compared and advantages and disadvantages and actual application in the industry were discussed

In second part of the diploma thesis chromatographic procedures of separation were studied. First conventional column chromatography of raw lecithin at various temperatures (25 °C, 40 °C and 60 °C) was carried out. The aim was to concentrate phosphatidylcholine (component of cell membranes), from raw lecithin, which is rich with phospholipids.

As SFE is an alternative to conventional extraction, the supercritical chromatography (SFC) presents an alternative to conventional column chromatography. In next phase the parameters, important for design of separation methods with SFC, were explored. In our experiments SF-CO₂ was used and its properties were observed.

After all experiments were done, various types of chromatography in general were compared and potential applications in industrial scale were discussed.

keywords: extraction, chromatography, supercritical fluids, phospholipids, propane, CO₂

UDK: 543.54-139:66.061(043.2)

KAZALO

1	Uvod.....	13
2	Teoretske osnove	15
2.1	Zgradba fosfolipidov	15
2.2	Tipi fosfolipidov.....	15
2.3	Pridobivanje fosfolipidov	15
2.4	Zakaj so maz obe pomembne za organizem.....	16
2.5	Visokotla na separacija biološko aktivnih komponent.....	17
2.5.1	Superkritni fluidi.....	17
2.5.2	Fizikalno kemijski podatki, potrebni za nartovanje superkritne ekstrakcije.....	19
2.5.3	Topnost substanc v plinih visoke gostote.....	19
2.5.4	Visokotla na in konvencionalna ekstrakcija	20
2.5.5	Sub in superkritna ekstrakcija.....	21
2.5.6	Prenos snovi pri visokotlani ekstrakciji	21
2.5.7	Semikontinuirna visokotla na ekstrakcija.....	22
2.5.8	Superkritna kromatografija	23
3	Aparati in potek dela	25
3.1	Aparati	25
3.1.1	Soxhletov aparat.....	25
3.1.2	HPLC kromatograf	25
3.1.3	Aparat za visokotlano ekstrakcijo	26
3.1.4	Aparatura za kolonsko kromatografijo.....	27
3.1.5	Aparat za superkritno kromatografijo.....	28
3.2	Material.....	29
3.3	Potek dela.....	30
3.3.1	Visokotla na in konvencionalna ekstrakcija bu ne poga e	30
3.3.2	Kolonska kromatografija lecitina	31
3.3.3	Kromatografija s plini nad kritno toko.....	31
3.4	Analitika	33
3.4.1	Metoda »Acetone Insoluble Matter« po Ja 4-46.....	33
3.4.2	Metoda »Hexane Insoluble Matter« po Ja 3-87.....	33

3.4.3	Analiza na HPLC kromatografu.....	33
4	Rezultati in opa0anja.....	35
4.1	Rezultati AIM in HI	35
4.2	Rezultati ekstrakcije bu ne poga e s propanom	35
4.3	Rezultati konvencionalne ekstrakcije bu ne poga e	37
4.4	Rezultati kolonske kromatografije lecitina	37
4.5	Rezultati raziskovanja parametrov separacije biolozko aktivnih snovi s superkriti no kromatografijo	41
5	Zaklju ki.....	47
6	Literatura in viri	49
7	Priloge	50
8	življenjepis.....	56

SEZNAM SLIK

SLIKA 2-1: DIAGRAM TLAK . TEMPERATURA ZA ISTO SNOV [8].....	18
SLIKA 2-2: SPLOŽEN POTEK TOPNOSTNIH IZOTERM TEŽJE KOMPONENTE V ZGOŽ ENEM PLINU [8]	20
SLIKA 2-3: KARAKTERIZACIJA EKSTRAKCIJSKE KRIVULJE Z UPORABO FILMSKO IN DIFUZIJSKO KONTROLIRANIH KOEFICIENTOV PRENOSA SNOVI[2]	22
SLIKA 2-4 PODRO JA ZA RAZLI NE MOBILNE FAZE V KROMATOGRFSKI SEPARACIJI Z UPOŽTEVANJEM LASTNOSTI KOMPONENT [11].....	24
SLIKA 3-1 SOXHLETOV APARAT	25
SLIKA 3-2 HPLC KROMATOGRF	26
SLIKA 3-3: SHEMA APARATURE ZA VISOKOTLA NO EKSTRAKCIJO	27
SLIKA 3-4 APARATURA ZA KONVENCIONALNO KOLONSKO KROMATOGRFIJO	28
SLIKA 3-5 APARATURA ZA SUPERKRITI NO KROMATOGRFIJO LABORATORIJSKO MERILO	29
SLIKA 3-6 SHEMATSKI PRIKAZ APARATURE ZA KROMATOGRFIJO S SUPERKRITI NIM FLUIDOM.....	29
SLIKA 4-1 EKSTRAKCIJA S PROPANOM (EKSTRAKCIJSKE KRIVULJE BU NE POGA E-1. STISKANJE)	36
SLIKA 4-2 EKSTRAKCIJA S PROPANOM (EKSTRAKCIJSKE KRIVULJE BU NE POGA E 2. STISKANJE)	36
SLIKA 4-3 KOLONSKA KROMATOGRFIJA LECITINA (DELEŽ PC (%) V EKSTRAKTU PRI TEMPERATURAH 25, 40 IN 60°C).....	40
SLIKA 4-4: KOLONSKO KROMATOGRFIJE LECITINA (DELEŽI PC (%) PO FRAKCIJAH PRI TEMPERATURAH 25, 40 IN 60°C).....	41
SLIKA 4-5 SFC: VPLIV PRETOKA NA RETENZIJSKI AS BENZOJSKE KISLINE PRI SUPERKRITI NI KROMATOGRFIJI CO ₂ PRI 150 BAR IN 30°C.....	42
SLIKA 4-6 SFC: VPLIV MIKRO RAZDELILNEGA VENTILA RETENZIJSKE ASE KOFEINA	43
SLIKA 4-7 SFC: VPLIV PRETOKA SOTOPILA NA SEPARACIJO KOFEINA IN TOFILINA (PRI 150 BAR IN PRI 35°C, PRETOK SKOZI KOLONO JE ZNAČAL 2,8 ML/MIN)	44
SLIKA 4-8 SFC: SIGNAL SEPARACIJE KOFEINA IN TEOFILINA IN USTREZNI SIGNALI STANDARDOV KOFEINA IN TEFILINA (150 BAR, 35°C, 2,8 ML/MIN PRETOK SKOZI KOLONO)	45
SLIKA 7-1 SFC: VPLIV PRETOKA NA SEPARACIJO BENZOJSKE KISLINE. POVE ANO.....	52
SLIKA 7-2 SFC:VPLIV MIKRO RAZDELILNEGA VENTILA RETENCIJSKE ASE KOFEINA . POVE ANO.....	53
SLIKA 7-3 SFC: VPLIV PRETOKA SOTOPILA NA SEPARACIJO KOFEINA IN TOFILINA. POVE ANO.....	54
SLIKA 7-4 SFC: KROMATOGRAM KOFEINA IN TEOFILINA IN I STANDARD - POVE ANO.....	55

SEZNAM PREGLEDNIC

TABELA 2-1 RED VELIKOST FIZIKALNIH VELI IN ZA PLINE, TEKOLINE IN SCF [8]	18
TABELA 3-1 PODATKI O ANALITIČNI METODI NA HPLC KROMATOGRFU	34
TABELA 4-1 REZULTATI EKSTRAKCIJ BUČNE POGAČE S PROPANOM PRI RAZLIČNIH POGOJIH	35
TABELA 4-2 REZULTATI KONVENCIONALNIH EKSTRAKCIJ BUČNE POGAČE	37
TABELA 4-3: REZULTATI ANALIZ VHDNEGA MATERIALA IN FRAKCIJ KOLONSKO KROMATOGRAFIJE PRI 60°C	38
TABELA 4-4: ZADETNI PODATKI PRI KOLONSKI KROMATOGRAFIJI LECITINA PRI RAZLIČNIH TEMPERATURAH	40
TABELA 7-1 REZULTATI KOLONSKO KROMATOGRAFIJE LECITINA PRI 60°C 1. VSEMERITVE	50
TABELA 7-2 KOLONSKA KROMATOGRAFIJA LECITINA 25°C	51
TABELA 7-3 KOLONSKA KROMATOGRAFIJA LECITINA PRI 40°C	51
TABELA 7-4 KOLONSKA KROMATOGRAFIJA LECITINA PRI 60°C	51

UPORABLJENE KRATICE

HPLC	Teko inska kromatografija visoke loljivosti
PC	fosfatidilholin
PI	fosfatidilinositol
PE	fosfatidiletanolamin
PS	fosfatidilserin
SCF	superkritni fluid
SG	silikagel
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
AIM	Aceton-Insoluble Matter (v acetonu netopne snovi)
HI	Hexane-insoluble Matter (v heksanu netopne snovi)

UPORABLJENI SIMBOLI

T	temperatura	°C
p	tlak	Pa (bar)
T_c	kriti na temperatura	°C
p_c	kriti ni tlak	bar
D	difuzivnost, difuzijski koeficient	m ² /s, cm ² /s
m	masa	g
m_{za}	za etna masa vzorca	g
m_{ost}	masa ostanka	g
m_{ekstr}	masa ekstrakta	g
q	pretok	ml/min
m_{SG}	masa silikagela	g
m_{etanol}	masa etanola	g
$m_{ekstrakt\ za}$	masa ekstrakta za kolonsko kromatografijo	g
KK		
q_{kol}	pretok skozi kolono	ml/min
$q_{sotopilo}$	pretok sotpila skozi kolono	ml/min
q_{eksp}	pretok CO ₂ na ekspanzijskem delu	L/min
D	presevek	%
R	ostanek	%
$\hat{e}\ m/\hat{e}\ d$	diferecnial mase skozi diferencial premera	g/mm
S/F	je brezdimenzijsko ztevilo, ki podaja maso topila na enoto mase	kg plina/kg snovi
t	as	min, h
m_{sum}	sezteta masa	g
t_{sum}	sezteti as	min
p_{zrak}	zra ni tlak	Pa (mbar)
T_{zrak}	temperatura okolice	K
R	plinska konstanta	J/(K* μ mol)
M	molski delež	g/mol
Grzke rke		
	gostota	kg/m ³
v	prostorninski pretok	L/h, L/min
	viskoznost	(kg/ms)

1 UVOD

V farmacevtski in prehrabni industriji se 0e vrsto let uporabljajo rastlinski materiali kot osnovna surovina za pridobivanje nekaterih biolozko aktivnih snovi in kljub temu da dandanes proizvedejo veliko substanc sinteti no, ima to ze podro je precejzen potencial v prihodnosti. Diplomaska naloga govori o raziskovanju mo0nih metod za separacijo biolozko aktivnih snovi iz rastlinskih materialov.

Osredoto ili smo se na metode s plini nad kriti no to ko . superkriti nimi fluid (SCF), saj so te ze relativno nove in ze neraziskane. Klub temu pa ta na in separacije ponuja ztevilne prednosti, saj so lastnosti SCF, ki so podobne delno lastnostim plinov in delno lastnostim teko in, dobra osnova za splozno uporabo teh metod.

V svoji diplomski nalogi smo se seznanili s prednostmi metod s SCF in jih poskuzali primerjati s konvencionalnimi metodami, ki so v veljavi 0e dlje asa. Raziskovali smo parametre, ki vplivajo na u inkovitost teh separacij in parametre za pripravo separacijskih metod kromatografije s plini in teko inami nad kriti no to ko (SFC). Iz razli nih rastlinskih materialov smo 0eleli lo iti nekatere biolozko aktivne snovi, npr. iz lecitina, dobljenega iz soje, smo poskuzali izolirati nekatere fosfolipide ter iz stisnjenih bu nic dobiti ostanek olja, ki naj bi vsebovalo pomembne fosfolipide.

Princip ekstrakcije s SCF in princip konvencionalne ekstrakcije sta si podobna, vsaka izmed njiju ima svoje prednosti in slabosti. Ena izmed prednosti uporabe SCF kot topila pri ekstrakciji je ta, da v ekstraktu ni prisotnih ostankov topila, saj se fluid z ekspanzijo uplini in uide iz ekstrakta. Domnevali smo, da lahko nadaljnjim suzenjem pri povizani temperaturi ugotovimo, e je v ekstraktu ze prisoten plin, ki smo ga uporabili kot SCF. Prav tako smo postavili domnevo, da lahko s suzenjem pri vakuumu in povizani temperaturi izvemo ali lahko popolnoma odstranimo neko organsko topilo iz ekstrakta ter ostanka po ekstrakciji. Pomagali smo si s tehtanjem in iz razlike v masah izra unali dele0 morebitno prisotnega ostanka topila. Organska topila in superkriti na topila so kljub nekaterim podobnostim med seboj razli na. Zanimalo nas je ali so snovi, ki jih ekstrahiramo tudi razli ne in ali so izkoristki enaki. Domnevali smo, da se lastnosti enakih komponent pri razli ni vrsti ekstrakcije ne spremenijo, vendar bi izkoristki naj bili druga ni. Da bi lahko to potrdili, smo ekstrahirali olje iz bu nih poga z superkriti no in konvencionalno ekstrakcijo. Hipoteza, da so izkoristki neenaki, je temeljila na tem, da topila, ki nimajo enakih lastnosti lahko iz materiala lo ijo ze druge komponente in ne le 0elene.

Naze raziskovanje je poleg poizkusov ekstrakcije obsegalo ze lo evanje biolozko aktivnih snovi iz lecitina s konvencionalnimi kromatografskimi metodami. Najprej smo naredili niz eksperimentov kolonske kromatografije pri treh razli nih temperaturah. Topnost s povizevanjem temperature naraz a, zato smo sklepali, da bomo zaradi tega dosegli boljzo separacijo pri vizji temperaturi. To hipotezo smo preverjali z koncentriranjem fosfatidilholina (PC) iz lecitina s kolonsko kromatografijo, s pomo jo analize na HPLC kromatografu (teko inska kromatografija visoke lo ljivosti) smo dolo ili sestave.

Kolonsko kromatografijo smo v naslednji fazi želeli postaviti ob bok kromatografiji s SCF in ugotoviti, kakšne so razlike med obema in preveriti uinkovitost slednje. Predmet nazega dela je bilo preverjanje parametrov za pripravo metode za separacijo s kromatografijo s superkriti nim fluidom (SFC), ki jo je zaradi spremenljivih pogojev teko nadzorovati. Domnevali smo, da bi bila zaradi tega preverjanje vseh parametrov nekoliko oteeno in smo sklepali da metoda, ki bi jo pripravili, ne bi bila uporabna za veliko primerov, saj bi bilo prisotnih preve parametrov, na katere se bi bilo potrebno ozirati pa jih ne bi mogli upoztevati v celoti. Za razli ne snovi obstajajo razli ne metode kromatografije.

Diplomsko delo je sestavljeno iz treh delov: teoretskega, prakti nega dela ter segmenta, kjer so predstavljeni rezultati in razprava o njih. Zadnji del so zaklju ki, kjer so naze ugotovitve na kratko povzete. V teoretskem delu so povzete snovi s katerimi smo se pri delu sre ali, njihov pomen in funkcija. V tem odseku smo razdelali teoretsko ozadje posameznih metod separacije, njihovo uporabo, parametre, ki smo jih morali upoztevati. Ob vsem tem je klju nega pomena poznavanje principa prenosa snovi, ki je prav tako predstavljen v teoretskem delu. V prakti nem delu so razloene metode dela, materiali, naprave, poteki eksperimentalnega dela in metode analiz. V tretjem delu so predstavljeni rezultati nazih eksperimentov in izsledki analiz, s katerimi smo lahko ovrednotili naze poizkuse. V tem delu je podana razprava o rezultatih in v nekaterih primerih podane ideje za nadaljnjo delo. Zaklju ki so strnjena celota nazih rezultatov in vsebujejo potrditve in zavrnitve nazih hipotez.

2 TEORETSKE OSNOVE

2.1 Zgradba fosfolipidov

Fosfolipidi so amfipati ni, kar pomeni da imajo na enem delu polarne skupine (hidrofilne glave), na drugem pa nepolarne (hidrofobni repi). So molekule lipidov, ki vsebujejo eno ali več fosfatnih skupin. Fosfolipidi ali fosfatidi so diestri fosforjeve(V) kisline. Razlikujemo glicerol fosfatide in sfingozin fosfatide. [13]

Osnova fosfolipidov (glicerollipidov) je glicerol (3-valenten alkohol). Fosfolipidi sodijo med polarne maz obe, molekule fosfolipidov so po zgradbi podobne trigliceridom. Vsaka molekula je sestavljena iz ztirih delov: na alkoholu (pri fosfogliceridih je alkohol glicerol, pri sfingomelinu pa sfingozin) sta zaestrena dva radikala maz obnih kislin, na tretjem mestu je zaestrena fosforjeva kislina, na katero je vezan še drugi alkohol.[1]

Ena izmed maz obnih kislin je nenasi ena (dvojna vez). Ta preoblikuje maz obno kislino, zato le-ta v membrani zaseda več prostora in se ves čas vrtili. Fosfatna skupina ima negativen naboj. [16]

2.2 Tipi fosfolipidov

Fosfolipide, katerih osnova je glicerol, imenujemo glicerollipidi, tiste, ki vsebujejo sfingozin pa sfingozini. Oboji so prisotni v celi ni membrani. Med najpomembnejše predstavnike glicerollipidov sodijo fosfatidilholin (lecitin), fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol.[15]

Razlika narava fosfolipidov je pogojena z različnimi dolžinami verig in stopnjami nasi enosti zaestrenih maz obnih kislin.[15]

Fosfolipidi so značilni gradniki celi nih membran, ker so amfipati ni in netopni v vodi. Celi no membrano sestavljajo ztirje tipi fosfolipidov, to so fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin in sfingomielin. Holin in mielin se nahajata na zunanji strani membrane, etanolamin in serin pa na notranji strani membrane. Fosfolipidi so asimetri no razporejeni. [15]

2.3 Pridobivanje fosfolipidov

Fosfolipide se vedno v največji meri pridobivajo v oljarnah pri procesu rafinacije olj. Surova rastlinska olja so kisla, močno obarvana in imajo neprijeten vonj in okus. Pridobljena so iz semen oljnic z mletjem, stiskanjem ali pa s solventno ekstrakcijo. Pred uporabo v prehranske namene jih je zato treba očistiti/rafinirati. S tehnološkimi postopki rafinacije se iz surovih olj odstranijo proste mazobne kisline (PMK), povzra

termooksidacijska stabilnost ter se zagotovijo ustrezne organoleptične lastnosti olja (barva, vonj, okus).

Rastlinska olja poleg trigliceridov (TAG) vsebujejo tudi delne gliceride kot monogliceride (MAG) in digliceride (DAG) ter vrsto raznih negliceridnih komponent, kot so mazobne kisline, fosfatidi, steroli, tokoferoli, ogljikovodiki, proteinski fragmenti ter različne ostale primesi.

Večina negliceridnih komponent v oljih je nezaobelenih, saj povzročajo obarvanost in potemnenje olja, penjenje ali sprožanje dimnih hlapov ali navedene procese pospezujejo. Nekatere komponente kot npr. Gosipol v surovem bombaevem olju so celo strupene. Smoter rafinacije je odstraniti moteče negliceridne komponente v olju, vendar z minimalnim vplivom na trigliceride in minimalnimi izgubami koristnih negliceridnih komponent.

V svetu sta v uporabi dva alternativna tehnološka postopka rafinacije, kemijska rafinacija in fizikalna rafinacija. Osnovna razlika je v postopku odstranitve prostih mazobnih kislin iz olja, bodisi preko nevtralizacije z dodatkom alkalne raztopine (kemijska rafinacija) bodisi z destilacijo (fizikalna rafinacija). Kemijska rafinacija je v uporabi predvsem v ZDA, v Evropi pa je bolj razširjena fizikalna rafinacija.

Deguminacija je prvi postopek kemijske ali fizikalne rafinacije. S procesom deguminacije se iz surovega olja odstranijo fosfatidi in nekatere druge v olju prisotne nečistoče, kot so: lepljive snovi, sluzi, ostanki semen ipd.

Fosfatidi imajo podobno osnovno kemijsko strukturo kot trigliceridi, s tem da imajo trigliceridi vse tri vezi na glicerolu zaestrene z vizjimi mazobnimi kislinami, medtem ko imajo fosfatidi z vizjimi mazobnimi kislinami zaestrene le dve vezi na glicerolu. Na tretji glicerolni vezi je vezana skupina, ki vsebuje fosfor. Proces deguminacije v glavnem sestavljajo postopki hidratacije fosfolipidov in lepljivih sluzi, da se zmanjša njihova topnost v olju in da se na ta način omogoči njihovo odstranjevanje z vodo.

Nevezni fosfolipidi (HP), ki so hidrofilni, se enostavno hidratirajo in jih je zato mogoče enostavno odstraniti z vmeževanjem vroče vode (1 do 3 %) v fazo surovega olja, kateremu sledi ločevanje s centrifugalno separacijo. Nasprotno pa je kompleksne fosfolipide (NHP), ki so hidrofobni zelo težko hidratirati. Najprej jih je potrebno obdelati s kislino, da se odstranijo kationi, ki so odgovorni za nehidratibilnost fosfatidov. Običajno se odstranitev kationov izvede z vmeževanjem fosforne kisline (0,1 % do 0,3 %, 85 % raztopine H_3PO_4) ali citronske kisline (0,1 % do 1,0 %, 30 % raztopine).

Deguminacijo je najbolje izvesti takoj po ekstrakciji kot kasneje v rafineriji med rafinacijskimi postopki. Z deguminacijo neposredno po stiskanju surovega olja in ekstrakciji se močno zmanjšajo ali eliminirajo tekočine, povezane s sedimentacijo fosfolipidov med dolgotrajnim skladizanjem v skladiznih rezervoarjih ali pa s sedimentacijo fosfolipidov med transportom. Stranski produkt deguminacije je lecitin, ki ima visoko tržno vrednost. Lecitin proizveden iz svežega olja je boljše kakovosti kot lecitin pridobljen med rafinacijskimi procesi. [10]

2.4 Zakaj so maščobe pomembne za organizem

Prevelika izguba mazobnega tkiva . lipodistrofija . vodi do metabolnih okvar kot sta inzulinska rezistenca in diabetes. Zaradi pomanjkanja adipocitov, torej skladiz a za mazobno, naraste nivo prostih mazobnih kislin in triacilglicerolov v krvi, kar pa posledično pripelje do povzrane koncentracije glukoze v krvi in hiperinsulinemije. Manjše ztevilno adipocitov izloča manj leptina, kar tudi pripomore k nastanku inzulinske rezistence. [15]

2.5 Visokotlačna separacija biološko aktivnih komponent

Pri načrtovanju separacijskih procesov potrebujemo podatke o obratovalnih pogojih. Podatki o faznih ravnotežah in transportne lastnosti (prenos snovi in toplote) nam pomagajo pri določitvi procesnih parametrov in lažjem razumevanju celotnega sistema. Podatki o faznih ravnotežah pri visokih tlakih so na razpolago le v zelo omejenem obsegu. Tako je mogoče nekatere vplivne parametre določiti le z eksperimentalnimi raziskavami, ki so običajno zelo dolgotrajne. Zahtevajo tudi zelo drago in visoko razvito opremo in natančno izvedbo. Potek topnostnih izoterm pogosto odstopa od običajnega poteka, kar ne znamo razložiti, saj je v literaturi premalo podatkov za takšne sisteme. Za izvedbo separacije komponent pri visokih tlakih je potrebno poznati termodinamične in transportne lastnosti sistema. [2]

Uporaba visokotlačnih procesov z namenom separacije predstavlja alternativo konvencionalnim procesom. V primerjavi s konvencionalnim procesom ima visokotlačna separacija številne prednosti. [2]

2.5.1 Superkritni fluidi

Superkritni fluidi (SCF) se uporabljajo kot topila za različne ekstrakcijske ali kromatografske procese. Nekaj komercialnih primerov takšnih ekstrakcij so dekofeinacija kave in čaj, ekstrakcija hmelja, začinjen eteričnih olj.

V zadnjem času se veliko industrijskih in znanstvenih raziskav ukvarja z razvojem procesov, ki uporabljajo SCF kot topila. Uporabljajo se tudi kot topila pri neekstrakcijskih procesih kot npr. :

- topila za kemijske in biokemijske reakcije
- topila za kromatografske postopke
- mediji za pridobivanje majhnih delcev

Splošen trend v Evropi je pridobivanje izdelkov visoke tržne vrednosti in v ta namen se lahko uspešno uporabljajo procesi s sub- in superkritnimi fluidi, ki imajo v primerjavi s konvencionalnimi procesi številne prednosti. [8]

Večina fizikalnih in kemijskih lastnosti, potrebnih za načrtovanje procesov je določena pri atmosferskih pogojih. Pri povzanih tlakih se vrednosti posameznih termodinamičnih lastnosti spreminjajo. [14]

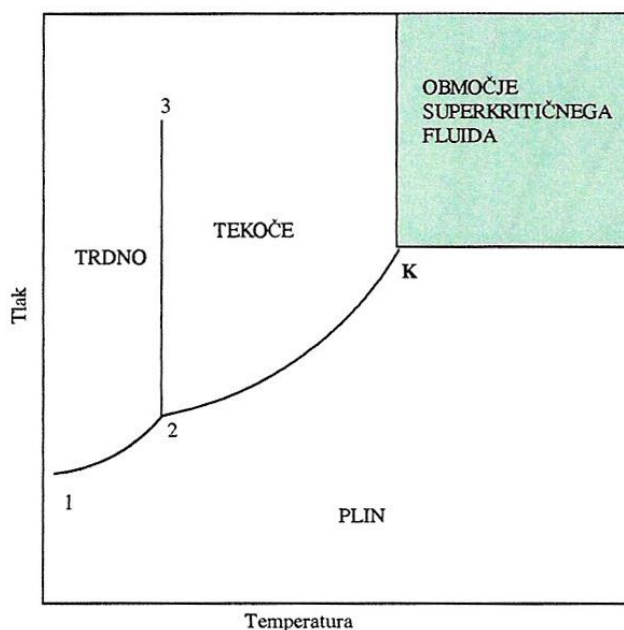
Stisljivi mediji v bližini kritične točke zelo hitro menjajo svoje lastnosti. Takšno obnašanje pod visokim tlakom stisljivega medija je znano že več kot 100 let. Eksistenco kritične točke so ugotovili že leta 1822, prvi visokotlačni postopek pa je bil patentiran že leta 1970. Hannay in Hogarth sta že leta 1879/1880 ugotovila, da se kovinske soli topijo v SCF in da pri zniževanju tlaka spet izpadejo. Pojav opisujeta kot tvorbo finega snega (»snow«) ali zmrzal (»frost«). [7]

O plinu v superkritnem stanju (Slika 2-1 diagram p-T za isto snov) govorimo, kadar sta tlak in temperatura nad kritičnima vrednostma ($T > T_c$, $p > p_c$), kar prikazuje slika 2-1. Lastnosti topil pri superkritnih pogojih združujejo lastnosti topil v tekočem stanju in v plinastem stanju (gostota SCF je reda velikosti tekočine, medtem ko je njihova viskoznost reda velikosti plinov). V tabeli 2-1 vidimo, da je difuzivnost SCF nižja od difuzivnosti plinov in višja od difuzivnosti tekočine. [8]

Tabela 2-1 red velikost fizikalnih veli in za pline, teko ine in SCF [8]

	Plin	Superkrit. fluid	Teko ina
(kg/m ³)	1	0.3 10 ³	10 ³
D (m ² /s)	10 ⁻⁴	10 ⁻⁷	5 10 ⁻¹⁰
(kg/ms)	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻³

Zvikanje gostote fluida pogosto omogo a pove anje topnosti topljenca, medtem ko njihova viskoznost, ki je podobna viskoznosti plinov omogo a boljše transportne lastnosti. Osnovna lastnost SCF, ki predstavljajo zirok potencial v separacijskih procesih, je mo0nost spreminjanja lastnosti topila SCF v okolici kriti ne to ke z majhnimi spremembami temperature in /ali tlaka.[8]



Slika 2-1: Diagram tlak vs temperatura za isto snov [8]

Majhne spremembe temperature in /ali tlaka povzro ijo velike spremembe gostote topila in s tem razli ne vzajemne topnosti v sistemu snov/SCF. [8] Z zvikanjem tlaka se gostota SCF pove a in se glavna intermolekularna razdalja zmanjza. Tako se pove a specifi na interakcija med molekulami topljenca in raztopine (topila). Poleg izjemne topnosti je za ekonomi no separacijo potrebna ze dobra selektivnost izbranega topila. Tudi nanjo lahko vplivamo s spremembami temperature in /ali tlaka. Velikokrat velja, da je pri veliki topnostni mo i selektivnost topila majhna. Povizamo jo lahko le ze dodatno s primernim dodatkom sotpila («entrainer»). Z dodatkom pomo0nih snovi v razli nih koncentracijah (1 do 15 %), pove amo specifi ne interakcije v sistemu topljenec/topilo in tako vplivamo na porazdelitvene koeficiente. Naslednji faktor, ki vpliva na ravnote0je, je temperatura sistema. Tako na topnostne karakteristike v sistemu snov/SCF vplivata dva dejavnika:

- fizikalno-kemijske lastnosti snovi in
- fizikalno-kemijske karakteristike SCF.

2.5.2 Fizikalno kemijski podatki, potrebni za načrtovanje superkritične ekstrakcije

Za načrtovanje sistema za ekstrakcijo s sub- ali superkritičnimi fluidi potrebujemo podatke, ki jih lahko določimo iz podatkov o faznih ravnotežah s pomočjo meritev prenosa snovi ter iz termodinamičnih analiz pogojev v procesu ekstrakcije in separacije. To so podatki o tlaku in temperaturi za ekstrakcijo in separacijo, vrsti in količini topila, hitrosti obtoka topila in porabi energije. [8]

2.5.3 Topnost substanc v plinih visoke gostote

Topnost je koncentracija ali delež substance v superkritični fazi pri določenih pogojih, temperaturi in tlaku, ko je sistem SCF/ista snov v ravnoteži. Realni procesi po navadi vsebujejo mešanice in tako se lahko topnost komponente v zmesi razlikuje od topnosti iste komponente. Tako nam podatek o topnosti iste komponente podaja le namig relativne sposobnosti ekstrakcije določene substance kot funkcija temperature in tlaka. Če vedno pa je pomemben podatek za načrtovanje obratovalnih pogojev za separacijo komponent v določeni sestavi.

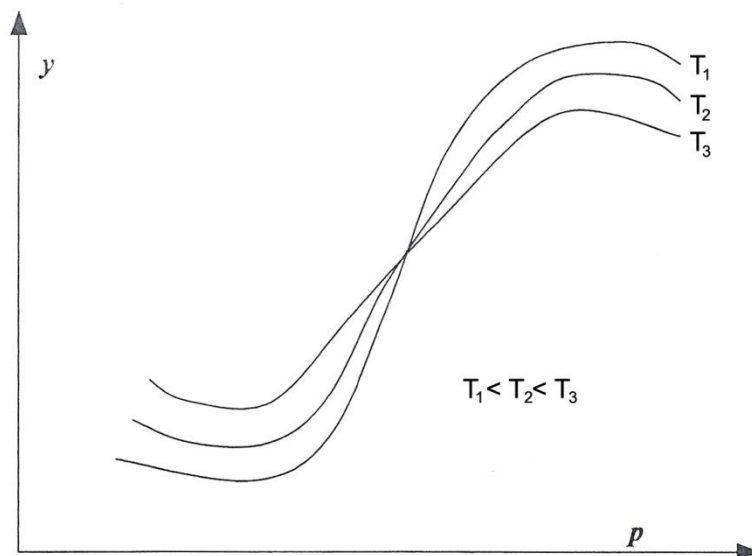
Splošni pravili, ki določata topnost substanc v SCF sta:

- s povečanjem gostote pri konstantni temperaturi se poveča topnostna kapaciteta fluida,
- s povzemanjem temperature pri določeni gostoti se poveča topnost snovi v superkritičnem fluidu.

Katero pravilo bo v specifičnem primeru prevladovalo, ni mogoče napovedati, zato je za specifičen primer potrebno eksperimentalno določiti topnost v odvisnosti od temperature in tlaka.

Topnost trdne substance v zgostjenem plinu je odvisna razen od T in p tudi od lastnosti obeh komponent v sistemu, kot so dipolni moment, velikost molekul, sublimacijski tlak, kristalna struktura in fazno obnašanje trdne komponente. Da bi ugotovili odvisnost topnosti od teh parametrov, je potrebno opraviti raziskave topnosti, ki se ponavadi podajajo v obliki izoterm pri različnih tlakih.

Topnostne krivulje prikazuje slika 2-2, kjer lahko opazimo koncentracijski minimum in maksimum. Koncentracijski maksimum je pri nižjih temperaturah slabše viden, medtem ko je v bližini zgornje kritične točke ($UcEP$) bolj izražen. Navadno so pogoji (T , p), ko nastopi maksimum relativno visoki, zato jih navadno ne izmerimo eksperimentalno. Položaj koncentracijskega minimuma in maksimuma je pomemben predvsem za načrtovanje superkritične ekstrakcije topljenca v fluidno fazo. [8]



Slika 2-2: Splošen potek topnostnih izoterm tečje komponente v zgoč enem plinu [8]

2.5.4 Visokotla na in konvencionalna ekstrakcija

Ekstrakcija je postopek, s katerim odstranjujemo iz trdnih ali tekočih zmesi topne komponente s topilom. Sestavljena je iz dveh zaporednih operacij. Najprej spravimo zmes v intenziven stik s topilom, nato pa v drugi operaciji obe fazi ločimo. Postopek ekstrakcije se uporablja predvsem za pridobivanje olj iz plodov semen ter za pridobivanje arom, za imbe in farmacevtskih učinkovin iz rastlin in sadežev. Kot topilo uporabimo lahko hlapna organska topila, v določenih primerih pa tudi vodo. V ekstrakcijskih procesih se uporabljajo naslednja topila: voda, propan, butan, butilacetat, etilacetat, etanol, ogljikov dioksid, aceton in N_2O . Vsa druga topila so ali prepovedana ali pa imajo zelo natančno določeno področje uporabe in dovoljeno količino preostankov topila v produktih. Izbira opreme za ekstrakcijo in obratovalni pogoji so odvisni od delovne in porazdelitve topne komponente v materialu, narave trdne snovi in velikosti delcev. Zato moramo pri izbiri opreme za ekstrakcijski proces upoštevati naslednje štiri dejavnike, ki vplivajo na ekstrakcijsko hitrost: [8]

- velikost delcev

Na hitrost ekstrakcije vpliva na več načinov. Glavni dejavnik je velikost, temveč je medfazna površina med trdnim materialom in tekočino, in tako je prenos snovi hitrejši. V tem primeru je difuzijska pot topljenca iz notranjosti delca manjša. Po drugi strani pa lahko zelo fini delci ovirajo separacijo delcev in fluida, saj se primejo v večje delce in zato ovirajo pretok fluida. V splošnem se izogibamo zelo majhnim delcem, zato pa je, da je območje velikostne porazdelitve delcev čim manjše, tako da vsak delec zahteva približno enako čas za ekstrakcijo.

- topilo

Izbira topila je zelo pomembna. Izbrati moramo selektivno topilo z nizko viskoznostjo. Med ekstrakcijskim procesom koncentracija topljenca v topilu naravno pada, ekstrakcijska hitrost pa pada zaradi zmanjšanja koncentracijskega gradienta in deloma tudi zaradi naravnega zmanjšanja viskoznosti raztopine.

- temperatura

V večini primerov topnost komponente, ki jo ekstrahiramo naravno s temperaturo, s tem pa naravno tudi ekstrakcijska hitrost. Na hitrost ekstrakcije vpliva tudi difuzivnost,

ki s temperaturo naraz a. V nekaterih primerih je zgornja meja temperature določena sekundarno, npr. z aktivnostjo encima, ekonomičnostjo procesa, itd.

- mezanje fluida

Mezanje je pomembno, saj poveča snovni prenos s površine materiala v glavno maso topila. Razen tega preprečuje sedimentacijo delcev. [8]

Hitrost procesa kontrolira difuzija topljenca skozi porozni material, naj bi bila granulacija materiala čim manjša, zato je difuzijska pot čim krajša. Če pa hitrost procesa kontrolira difuzija topljenca s površine delca v glavno maso topila, fino zmleti material nima posebnega učinka. V tem primeru pospešimo ekstrakcijo z intenzivnejšim mezanjem fluida. [8]

V primeru, ko je topljenec porazdeljen po trdni snovi, ki je nepropustna za topilo, v obliki majhnih izoliranih zrn, moramo material zdrobiti, tako da je ves topljenec izpostavljen topilu. V tem primeru ima fino zmleti material odločilni vpliv, ne le na hitrost reakcije, temveč tudi na njeno dobit. [8]

Če ima trdna snov celično strukturo, bo ekstrakcijska hitrost praviloma majhna, ker celične stene predstavljajo dodaten upor. Kadar tvori trdni material v nasutem stanju dobro propusten sloj, ga ekstrahiramo s perkolacijo, to je s pretokom topila skozi sloj. Če je sloj slabo propusten oziroma nepropusten ekstrahiramo tako, da material dispergiramo v topilo in ga nato ločimo od telesa. Obe metodi sta v tehnološkem merilu lahko kontinuirani ali diskontinuirani. [8]

2.5.5 Sub in superkritična ekstrakcija

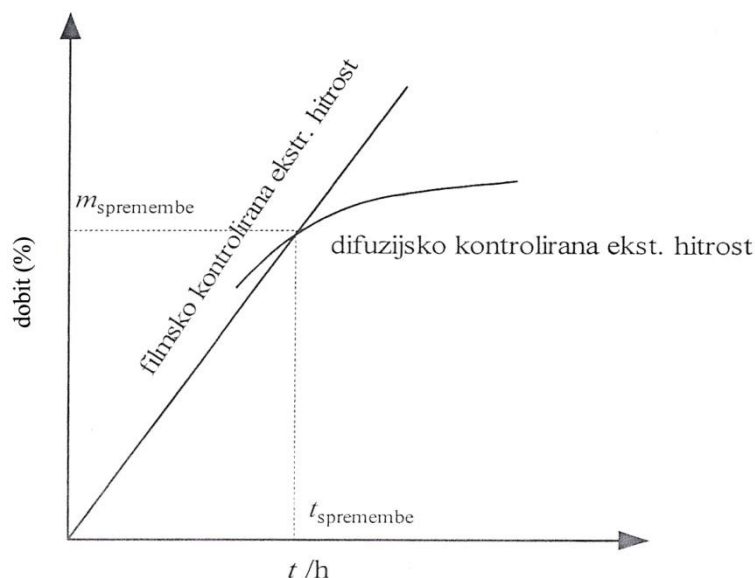
Kakor pri ostalih postopkih ekstrakcije tudi pri ekstrakciji s sub- in superkritičnimi fluidi odstranjujemo iz trdnih ali tekočih zmesi s topilom topne komponente. Razlikujemo procese ekstrakcije z utekočinjenimi plini (pri subkritičnih pogojih), kjer je temperatura malo pod kritično vrednostjo, tlak pa je lahko nad ali pa pod kritičnim tlakom, in postopke pri nadkritičnih pogojih s superkritičnimi fluidi, kjer sta tlak in temperatura za ekstrakcijo uporabljenega fluida nad kritičnimi vrednostmi. [8]

2.5.6 Prenos snovi pri visokotlačni ekstrakciji

Za načrtovanje procesne opreme je poleg poznavanja faznih ravnotečin ključnega pomena tudi poznavanje prenosa snovi.

Izrazni teoretični ekstrakcijski krivulji temeljijo na različnih modelih.

Slika 2-3 prikazuje ekstrakcijsko krivuljo določeno z uporabo filmske in difuzijske kontroliranih koeficientov prenosa snovi.[2]



Slika 2-3: Karakterizacija ekstrakcijske krivulje z uporabo filmsko in difuzijsko kontroliranih koeficientov prenosa snovi[2]

2.5.7 Semikontinuirna visokotla na ekstrakcija

Ekstrakcija s plini visoke gostote je proces, ki je v zadnjih nekaj letih vzbudil veliko zanimanja, postal je industrijsko zelo zanimiv. Pred 0e uveljavljenimi procesi ima ztevilne prednosti, saj lahko dose0emo 0eljen u inek 0e pri zmernih temperaturah, kar je uporabno tudi za substance, ki so temperaturno ob utljive in ob izpostavljanju visokim temperaturam razpadejo. ¥kolljiva topila se iz produktov popolnoma odstranijo.

Poleg tega lahko variiramo obratovalne pogoje (temperatura, tlak) in tako vplivamo na kapaciteto in selektivnost topila, z enostavnimi operacijami, kot so izobarno segrevanje in izotermna dekompresija dose0emo lo enje topila od topljenca. Zaradi enostavne regeneracije topila so obratovalni strozki in energijski strozki procesa nizki, procesi so okolju prijazni. [8]

Najpogosteje uporabljen plin za sub in superkriti ne ekstrakcije je ogljikov dioksid (CO_2), ki ima kot topilo naslednje prednosti pred drugimi topili:

- Kriti ni tlak relativno nizek ($p_c=73,8$ bar)
- Nizka kriti na temperatura ($T_c=31^\circ\text{C}$)
- Ni koroziven
- Gostota CO_2 je visoka
- Relativno poceni topilo
- Predstavlja manjzo nevarnost, kot druga topila, saj je manj toksi en
- Dobra selektivnost, katera se z uporabo sotopila lahko ze pove a

Zraven naztetih stvari pa ima tudi nekaj slabosti:

- Mo no polarne in ionske molekule so slabo topne v superkriti nem CO_2
- Visoka cena opreme
- Nizka topnostna mo

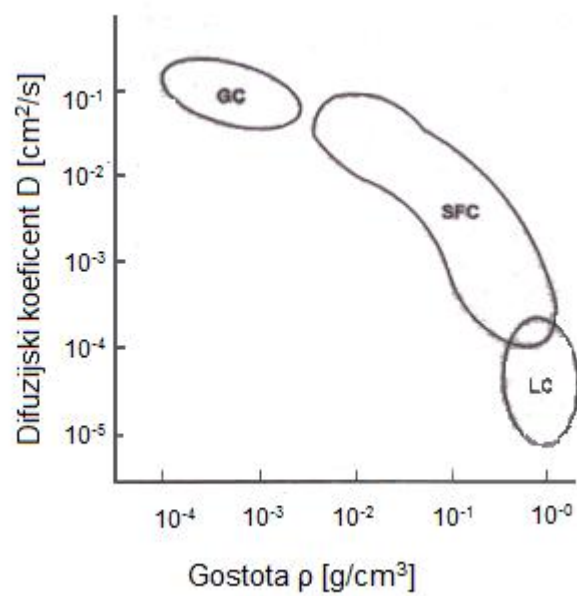
V zadnjem asu pa se za ta tip ekstrakcije uporablja tudi propan, butan, dimetileter in ze nekateri drugi plini. Ekstrakcije, kjer kot topilo uporabimo plin visoke gostote, pridejo v rabo pri ekstrakcijah naravnih materialov, v prehrabni, kozmeti ni in farmacevtski industriji. V novejem asu se uporabljajo v industrijskem merilu za izolacijo snovi iz trdnih

ali teko ih snovi, kot topilo za kemijske in biokemijske procese in kot topilo za procese mikronizacije in kromatografije. Zaradi relativno visokih investicijskih strozkov opreme se procesi z uporabo SCF uporabljajo tedaj, ko je separacija zahtevna in je ni mo0no dose i z alternativnimi separacijskimi postopki. Komercializacija SCF je podrobneje dokumentirana v ztevilnih lankih. [7]

2.5.8 Superkriti na kromatografija

Kromatografijo lahko definiramo kot separacijsko metodo, ki temelji na razli ni porazdelitvi komponent zaradi razli nih interakcij z mobilno in stacionarno fazo, ki sta v ravnote0ju. V primeru, da je mobilna faza superkriti ni fluid, kromatografijo ozna ujemo kot superkriti na kromatografija. Separacija s superkriti nimi fluidi obsega analiti no, preparativno in produktno kromatografijo. Preparativna kromatografija je uporabna za izolacijo ene substance iz mezanice substanc za nadaljnjo uporabo, to je separacija intermediatov in kon nih produktov kemijske in biokemijske sinteze ali za iz enje substanc. Metoda je hitra, vendar temelji na topnosti te komponente v superkriti nem fluidu. Analiti na obsega kromatografijo v laboratorijskem merilu in jo uporabljamo za analizo. Produktna kromatografija je kromatografija ve jega obsega in jo najdemo v industrijskem merilu, primerna je za separacijo nekaterih biolozko aktivnih substanc iz rastlinskih materialov.

Pri superkriti ni kromatografiji (SFC) je mobilna faza superkriti ni plin ali teko ina blizu kriti ne to ke. V primerjavi s plinsko kromatografijo (GC), kjer je mobilna faza plin pri atmosferskem tlaku in s teko insko kromatografijo (LC), kjer je mobilna faza teko a, se mo topila mobilne faze pri SFC lahko spreminja z gostoto. Topnost naraz a v glavnem s tlakom pod superkriti nimi pogoji mobilne faze. [11] Superkriti na kromatografija poteka pri konstantnem tlaku (izobarna separacija) ali naraz ajo em tlaku (tlakovno programirana separacija). Dodatno spremenljivko predstavlja temperatura. SCF ima podobne lastnosti kot plin in podobne lastnosti kot teko ina. Gostotna in mo topila se lahko primerja s teko inami, med tem ko se lahko viskoznost primerja z viskoznostjo plina. Difuzivnost je ni0ja od difuzivnosti plinov in vizja od difuzivnosti teko in. Zaradi tega SFC pokriva vmesno podro je med GC in LC, kakor je prikazano na sliki 2-4 kjer so prikazana razli na obmo ja za razli ne mobilne faze, z obzirom na gostoto in difuzijski koeficent. Slabost pa je, da se mo no polarne in ionske molekule ne morejo lo iti s pomo jo superkriti nega fluida, saj je ve ina plinov, ki so uporabljeni v SFC, nepolarnih. Te lastnosti lahko izkoristimo pri SFC, saj lahko nepolarne molekule zlahka lo imo od polarnih. e 0elimo eluirati polarne substance, SCF dodamo sotopilo (organsko topilo, ki nepolarnemu CO₂ pove a polarnost). Sestava mobilne faze lahko mo no vpliva na separacijo pri SFC. Retenzijski asi so lahko zelo razli ni zaradi polarnosti ali drugih fizikalno . kemijskih lastnosti komponent mobilne faze. [11]



Slika 2-4 Podrobnosti za različne mobilne faze v kromatografski separaciji z upoštevanjem lastnosti komponent [11]

3 APARATI IN POTEK DELA

3.1 Aparati

3.1.1 Soxhletov aparat

Soxhletov aparat, ki je prikazan na sliki 3-1 uporabljamo za konvencionalno ekstrakcijo. Za ta aparat je značilno, da je trden material, ki ga ekstrahiramo, v vsakem ciklu v stiku s svežim topilom, zaradi česar je izkoristek ekstrakcije večji.

Izbučke potopljene v vodno kopel izhlapeva topilo, ki prehaja po cevki v zgornji del aparature. Tam se topilo kondenzira in začne se zbirati ekstrakt. Ko ekstrakt doseže določeno višino, se zaradi tlačne razlike zbiralna posoda izprazni. Ekstrakt odteče v spodnjo bučko. Iz spodnje bučke topilo ponovno izpareva in ponovi se cikel. Tako ekstrakcijo pa izvajamo tako dolgo, da odstranimo iz vzorca vse topilne substance.



Slika 3-1 Soxhletov aparat

3.1.2 HPLC kromatograf

Na sliki 3-2 je prikazan HPLC kromatograf, kjer izvajamo tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Napravo sestavljajo vakuumski razplinjevalec, steklena stebra, avtomatični vzorčni vnosnik, termostatisiran kolonski del in detektorja DAD (diode array detector - detektor z nizom diod) in ELSD (evaporating light scattering detector).

Vakuumski razplinjevalec ima nalogo odstraniti plin, ki je raztopljen v mobilni fazi, saj lahko ta moti detekcijo. Stebra sesa mobilno fazo iz steklenic skozi posebne membrane. Mobilni raztopljeni plin prehaja skozi membrano v posodo, ki je pod vakuumom, da je mobilno fazo na iztoku iz vakuumskega razplinjevalca skoraj popolnoma brez prisotnosti plinov.

rpalka, ki rpa mobilno fazo je *etverna rpalka* in omogo a, da lahko uporabljamo naenkrat do ztiri mobilne faze in jih mezamo med seboj v razli njih razmerjih.

Avtomati ni vzor evalnik . naprava za avtomati no injiciranje vzorcev je sestavljena iz stojala za vialo, podajalnika za vialo ter injekcijskega dela. Stojalo ima sto prostih mest za vialo (stekleni ke, v katere damo vzorec in jih pokrijemo s pokrov kom z gumijastim tesnilom). Podajalnik premakne vialo na mesto, kjer se odvzame dolo en volumen vzorca in ga injicira v sistem.

Vzorec skupaj z mobilno fazo potuje do kromatografske kolone, ki je termostatirana na dolo eno temperaturo.

Koloni sledi *detektor z nizom diod*. Detektor omogo a najvizjo opti no zmogljivost in podpira UV in VIS obmo je valovnih dol0in. Na kerami nem spektrografu je preko 1000 fotodiod, ki detektirajo valovne dol0ino od 190 nm do 970nm.

Temu detektorju sledi *ELSD detektor*, s katerim dobimo natan nejze rezultate analize. Namenjen je detekciji komponent eluenta teko inske kromatografije z visoko lo ljivostjo (HPLC) in zazna nehlapne komponente. V tem detektorju se hlapne komponente uparijo, te0ko hlapne komponente pa obsevamo z razprzeno svetlobo. Del svetlobe se na molekulah te0ko hlapnih absorbira. Operacija poteka v treh stopnjah, prva stopnja je razprzitev mobilne faze z vzorcem v drobne kapljice s pomo jo inertnega plina (v nazem primeru duzik). V naslednji stopnji v ogrevani cevi se uparijo hlapne komponente, da ostanejo le molekule te0je hlapnih komponent. Nosilni plin prenese mikrodelce iz ogrevalne cevi v detekcijski prostor, kjer LED dioda odda svetlobo. Delci v nosilnem plinu to svetlobo razprzijo, fotopomno0evalka pa razprzeni snop svetlobe zazna in pretvori v signal

Detektorji so povezani z ra unalnikom, kjer se v dolo enem programu vsi rezultati izpisujejo. Z tem programom krmilimo in nadzorujemo celotno analizo.



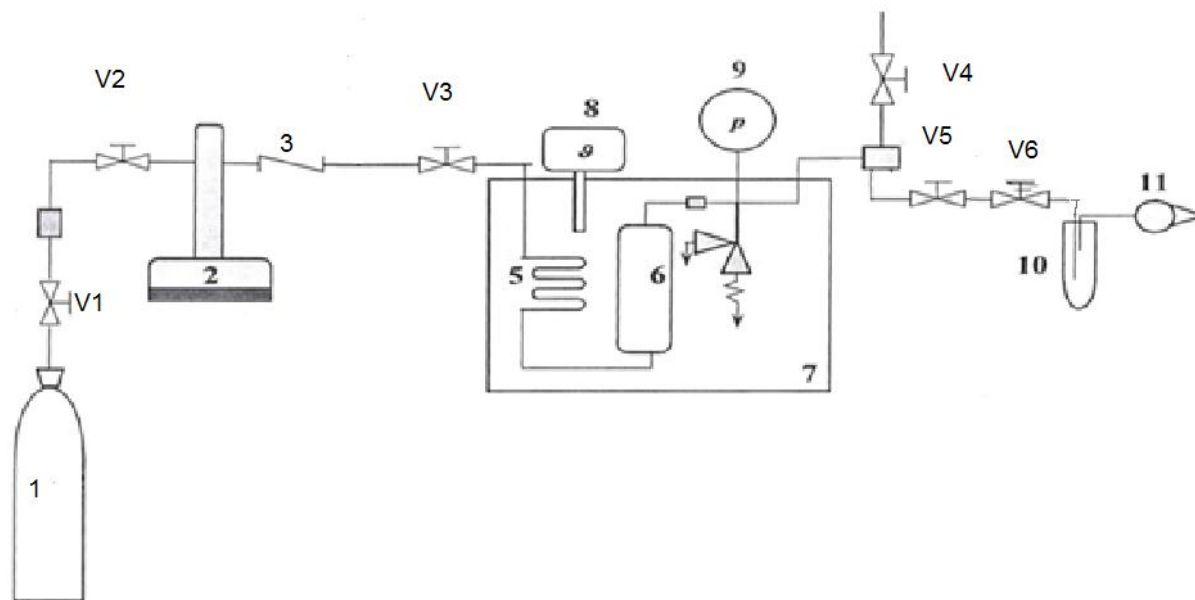
Slika 3-2 HPLC kromatograf

3.1.3 Aparat za visokotla no ekstrakcijo

Naprava (slika 3-3) sestoji iz ekstrakcijskega dela, separatorja, rpalka in ustreznih cevi ter ventilov (pod sliko 3-3 so ozna eni sestavni deli). S pomo jo grelca reguliramo 0elno temperaturo, plin dobavljamo skozi cevi s pomo jo kompresorja. Ekstrakt se zbira na dnu separatorja v epruveto zaradi zni0anja tlaka. [2]-

Iz plinskega rezervoarja vodimo plin v visokotla no rpalko, kjer ohlajen plin stisnemo na delovni tlak. Skozi nepovratne ventile vodimo stisnjen plin v toplotnega izmenjevalca, ki je skupaj z viskotla nim avtoklavom potopljen v ogrevani vodni kopeli. V toplotnem izmenjevalcu se stisnjen plin segreje na delovno temperaturi in dobimo SCF. Ta potuje

skozi avtoklav, kjer poteka superkritna ekstrakcija, do separatorja, kjer se plin ekspandira in izloči se ekstrakt (produkt). Cev med avtoklavom in separatorjem je povezana z manometrom, s katerim kontroliramo tlak in če je potrebno, tlak ročno nastavimo na visokotlačni rpaški. [2]



1-plinski rezervoar	5-toplotni izmenjevalec	9-manometer
2-visokotlačna rpaška	6-visokotlačni avtoklav	10-vzorčna evalna pasta
3-nepovratni ventil	7-vodna kopel	11-rotameter
V6-igelnasti ventil za uravnavanje pretoka	8- regulator temperature in grelec	V10 V5-zapiralni ventili

Slika 3-3: Shema aparature za visokotlačno ekstrakcijo

3.1.4 Aparatura za kolonsko kromatografijo

Na sliki 3-4 je prikazana aparatura, ki smo jo uporabljali za kolonsko kromatografijo. Deli, ki sestavljajo to aparaturo so termostat za ogrevanje kolone s plazem, stacionarna faza silikagel (SG) in posoda za zbiranje eluata.

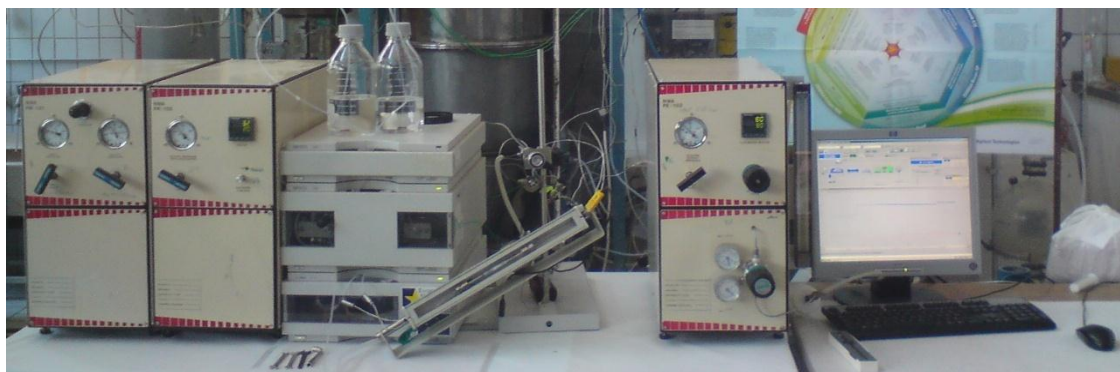


Slika 3-4 Aparatura za konvencionalno kolonsko kromatografijo

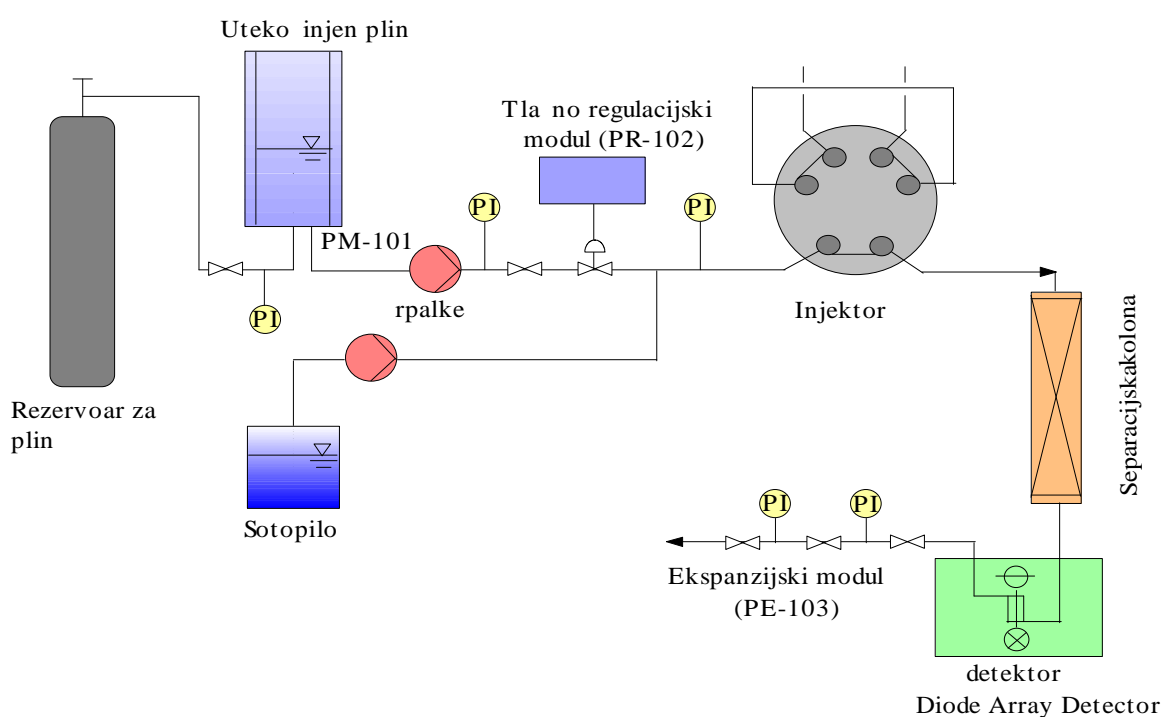
3.1.5 Aparat za superkritno kromatografijo

Na sliki 3-5 je aparat za SFC na sliki 3-6 je shema tega aparata. Naprava je sestavljena iz:

- **tla nega dela** CO_2 iz jeklenke se v hladilnem delu uteko ini. Uteko injene plin nato stisnemo na 0elen tlak.
- **regulacijski del**, kjer s pnevmatskim ventilom fino nastavimo 0elen tlak.
- **rpalka za sotopilo**, nazem primeru je to binarna rpalka, ki ima tla na tipala, da nam pove kolikzen je tlak pred kolono. Njena glavna naloga je, da rpa sotopilo in ga nato pridru0i komprimiranemu CO_2 . Sotopilo rpa iz steklenic, ki so priklju ene na razplinjevalec.
- **Injektor**, je ro ni vzor evalnik, s katerim injiciramo vzorec. Ventil vzor evalnika prestavimo v polo0aj »load«, z injekcijo injiciramo vzorec in prestavimo polo0aj »inject«. Vzorec po zanki z dolo enim volumnom ste e z mobilno fazo v termostatirano kolono.
- **kolona s termostatom**, v kateri poteka SFC. Te kolone so lahko z nasutjem ali kapilarne odvisno od detekcije. Uporabnost in u inkovitost enih in drugih so opisane v lanku. [3] Kolona je povezana z detektorjem.
- **DAD (»Diode Array Detector«) detektor**, na katerega eluirane komponente prihajajo lo eno, vsaka komponenta ima svoj retenzijski as. Ta detektor deluje po principu absorbiranja UV in VIS svetlobe. Sestavljen je iz volframove (VIS) in devterijeve 0arnice (UV). V nazem primeru uporabljamo le UV svetlobo. Preprost princip delovanja tega detektorja je naslednji. Devterijeva 0arnica oddaja svetlobo, ki jo fotopomno0evalka uravna na dolo eno valovno dol0ino. Molekule komponent vzorca pridejo v tok svetlobe, kjer vsaka izmed njih absorbira dolo eno koli ino svetlobe. Niz diod zazna razliko v absorbanci, posledica tega je signal, ki se pretvori v elektronsko obliko, da ga lahko vidimo na zaslonu ra unalnizke enote v obliki kromatograma.
- **ra unalniýka enota**, osebni ra unalnik, ki je povezan z detektorjem in rpalko. S programsko opremo lahko nadzorujemo in upravljamo nastavitve detektorja in rpalke. Spremljamo lahko ali je tlak v koloni konstanten, opazujemo bazno rto detektorja in spreminjamo nastavitve rpalke in detektorja ter obdelamo podatke
- **ekspanzijski del**, zadnji del naprave kjer se SCF ekspandira in izlo i iz sistema kot plinasti CO_2 .



Slika 3-5 Aparatura za superkriti no kromatografijo laboratorijsko merilo



Slika 3-6 Shematski prikaz aparature za kromatografijo s superkriti nim fluidom

3.2 Material

Bu no poga o po 1. stiskanju in po 2. stiskanju smo dobili iz oljarne Gea (Slovenska Bistrica-Slovenija).

Silikagel 60 (0,2-0,5 mm) za kolonsko kromatografijo je bil dobavljen iz Kemike (Hrvazka) Kemikalije potrebne za analizo, pripravo mobilnih faz, kolonske kromatografije so bile kupljene v Merck (Nem ija).

Standardi fosfatidilholin, fosfatidilinositol, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin so bili kupljeni od Sigma Aldrich (Nem ija).

Lecitin v prahu smo dobili prehranske industrije, kjer predelujejo sojo.

Propan in CO₂ je bil dobavljen od Messer (Ruze-Slovenija).

3.3 Potek dela

3.3.1 Visokotlačna in konvencionalna ekstrakcija bučne pogače

Priprava materiala

Pred ekstrakcijo s sub- oz. superkritičnim fluidom smo bučno pogačo po 1. stiskanju in po 2. stiskanju smo zdrobili na male kose, te pa zmleli v terilnici na manjše delce. S sejalno analizo smo ugotavljali velikost in porazdelitev velikosti delcev. Sestavili smo zaporedje sedmih sit tako, da so premeri zank padali (zanka z največjim premerom je bila na vrhu). Stolp s siti smo dali z dnom vred na vibracijski del sejalne naprave za deset minut. Po končanem stresanju smo stehali frakcije. V primeru, da bi bila zgornja ali spodnja frakcija najtežja, je bilo potrebno sejalno analizo ponoviti. Izbrali smo toliko dodatnih sit, da frakcija na vrhu ali na dnu ni imela največje mase. Na koncu smo podatke obdelali ter narisali krivuljo integralne porazdelitve mas $[D, R=f(\text{premer zanke})]$ in krivuljo diferencialne porazdelitve mas ($\frac{dm}{dV}$ v odvisnosti od povprečne premera dveh zank sosednjih sit). Mediansko zrno, od itamo iz prese iz obeh krivulj integralne porazdelitve mas. Najvišji vrh na krivulji diferencialne porazdelitve mas pa nam pove, kakšna velikost zrna je najpogosteje zastopana.

Ekstrakcija bučne pogače s propanom

Dinamično ekstrakcijo zmlete bučne pogače smo izvajali na aparaturi na sliki 3-3 pri temperaturah 25°C, 40°C in 60°C ter pri tlakih 50 bar in 150 bar. V avtoklav smo nasuli približno 30 g materiala. Preden smo začeli z ekstrakcijo, smo nastavili oeleni tlak na tla in rpalčki (NVA) ter avtoklav in toplotni izmenjevalnik termostatirali na delovno temperaturo. Ko so se vzpostavili pogoji smo začeli z ekstrakcijo, tako da smo odprli ventil V6. Z igličnim ventilom smo regulirali pretok. Ekstrakt smo lovili v stekleno past - epruveta (separator), kjer se propan zaradi ekspanzije uplini in uide skozi drugo cev v tej pasti. Pretok plina, ki uide, izmerimo s plinsko uro. Če je bil pretok prevelik, je separator začel zmrzovati, saj se je propan hitro ekspanziral in se je pri tem močno ohladil. Takrat smo ekstrakcijo ustavili, da se je epruveta segrela na sobno temperaturo. V določenih časovnih intervalih, najprej dvakrat po 15 minut nato pa po 30 minut do konca, smo proces prekinili in stehali epruveto s produktom, da smo določili količino ekstrakta. Ko se masa ekstrakta v epruveti z nadaljnjim pretokom plina ni več spreminjala, je to pomenilo konec ekstrakcije. Iz dobljene mase ekstrakta smo izračunali izkoristek. Vse rezultate smo pretvorili v grafično obliko kot krivulje izkoristek v odvisnosti od S/F (kg plina/kg snovi).

$$S / F = \frac{\phi_v \cdot P_{\text{zraka}} \cdot M \cdot t_{\text{sum}}}{R \cdot T_{\text{zraka}} \cdot m_{\text{sum}}}$$

Ekstrakcija bučne pogače z organskimi topili

Konvencionalno ekstrakcijo smo izvedli z Soxhletovim aparatom (slik 3-1). Ta oblika konvencionalne ekstrakcije je učinkovitejša zaradi recikliranja topila. Kot topilo smo uporabili petroleter in etanol.

V bučko smo nalili 250 ml petroletra in vanjo dali vrelni kamenček, ki so pospeževali vrenje topila. Na bučko smo nastavili Soxhletov aparat, vanj pa položili določeno količino materiala zavito v filtrni papir. Na aparat smo namestili vodni hladilnik. Sestavljeno aparaturo smo dobro vpeli v stojalo in bučko potopili v ogrevano vodno kopel.

Ko je začelo topilo v bučki vret, so se začeli hlapi dvigovati po cevki Soxhletovega aparata do vodnega hladilnika, kjer so se kondenzirali. Kondenzirani hlapi topila so se zbirali v zbiralni posodi aparata, pri tem je topilo prizlo v stik z materialom in začelo raztapljati topno komponento (v našem primeru ostanke bučne pogače). Ko smo opazili, da se prvi

hlapi topila kondenzirajo, smo za eluiranje in zbiranje vzorcev. Ko se je zbiralna posoda napolnila in je ekstrakt odtekel, se je pripravljal na novi cikel. Ekstrakcijo smo zaključili, ko v topilu v zbirni posodi, ni bilo več znakov obarvanosti, ki jo je povzročil topljenec. Ekstrakcijo smo znova ponovili z etanolom.

Vsem ekstraktom smo uparili topilo, da smo dohveli ali maso ekstrakta, trdne preostanke po ekstrakciji pa posušili.

3.3.2 Kolonska kromatografija lecitina

Poskuse smo izvajali pri treh različnih temperaturah 25°C, 40°C in 60°C. Izhajali smo iz postopka razloženega v prilogi [4]

Ekstrakcija surovega lecitina

Vzorce smo zatehtali lecitin in dodali 96% etanol v razmerju lecitin:etanol=1:3,75. Temperatura ekstrakcije je bila enaka temperaturi, pri kateri je potekala kolonska kromatografija. Vzorce z zmesjo smo postavili v vodno kopel segreto na določeno temperaturo, dovoljena temperaturna nihanja $\pm 5^\circ\text{C}$. Zmes smo mežljali z mežljalom na mehanski pogon dve uri. Dobljeno zmes ekstrakta in neraztopljenega materiala smo prefiltrirali. Ekstraktu smo uparili topilo. Suhemu ekstraktu smo dohveli ali maso. Del ekstrakta raztopimo v etanolu, da si pripravimo vzorec. [4]

Priprava silikagela

Pred kromatografijo, je bilo potrebno SG očistiti. Vzorec je obsegalo dva dela. V prvem smo zmes SG in etanola zavreli. Po 15 minutah vrenja smo zmes vsuli v kolono, ki je bila ogreeta na delovno temperaturo. Drugi del vzorca je potekal v koloni. Skozi nasuto plast SG smo vlili etanol (za 50 g SG se uporabi okoli 500ml etanola). Paziti smo morali, da se niso naredile kapilare, ki bi motile proces kromatografije. Nivo etanola v koloni ni bil pod nivojem SG.

Kolonska kromatografija in frakcioniranje

Namen kromatografije je bil skoncentrirati PC iz ekstrakta. Vzorec smo vlili na vrh silikagela in po vklopu je vzorec dosegel temperaturo kolone. Ko je dosegel, smo uravnali pretok in ga zbirali v frakcije. Vzorec smo eluirali z etanolom (za 25 g suhega ekstrakta potrebujemo 2000 ml etanola) in smo zbirali zvezne frakcije z določeno volumnom. Pretok etanola se bi naj gibal med 3-5ml/min. Razmerje med SG in vzorcem bi bilo 1:2.

Med poskusom smo spremljali pretok in si zapisovali vršne in volumne, da smo vidimo, ali se je pretok spremenil in ga po potrebi regulirali. Vsem frakcijam smo z uparjanjem odstranili etanol in jih analizirali na HPLC kromatografu. Z vsemi vzorci so analizirali za lecitin, iz katerega so izhajali. [4]

3.3.3 Kromatografija s plini nadkritično točko

Superkritični fluidi (SCF) imajo gostote in kapacitete raztapljanja podobne tekočini, ampak imajo manjše viskoznosti in boljše difuzivne lastnosti. SCF, ki ga uporabimo kot mobilno fazo pri kromatografiji je nosilec substanc po koloni, medtem ko pa komponente niso v SCF topne dodamo sotopilo. Kromatografije, kjer je mobilna faza SCF je znana pod imenom kromatografija s superkritičnimi fluidi (SFC). [3]

Potek

Najprej smo vklopili vse naprave (pumpo, razplinjevalec, detektor, termostat in grelnik na ekspanzijskem delu) in nato na računalniku zagnali program. V programu smo vklopili pumpo in devterijevo 0arnico ter na termostatu nastavili temperaturo kolone. Ko se je 0arnica

segrela na delovno temperaturo, smo na tla nem delu približno nastavili delovni tlak. Stisnjeni CO₂ vodimo v regulacijski del, kjer delovne pogoje natančno nastavimo.

Ko sta se grelnik in kolona segrela, smo odprli ventil na ekspanzijskem delu, s katerim smo vzpostavili kontinuirni pretok skozi sistem. Pred tem pa smo pazili, da tlak v sistemu ni presegel maksimalnega dovoljenega, saj bi to povzročilo izpuste CO₂ iz sistema, čemur smo se izognili.

S programom smo spremljali tlak in bazno rto detektorja. V primeru nihanja v tlaku smo na regulacijskem delu tlak uravnavali, dokler nismo dosegli stacionarnega stanja. Nato je bilo potrebno preveriti, da se uravna bazna rta detektorja. Nanjo vpliva tlak, pretok fluida po sistemu in temperatura kolone. Če se bazna rta ne bi poravnala, bi morali z ukrepi v programu detektor uravnati.

Ko smo dobili uravnano bazno rto detektorja in stacionarne pogoje v koloni in ko smo v program vnesli podatke o metodi smo začeli s SFC. Z injektorjem smo ročno injicirali vzorec in med tem spremljali vse pogoje. Če bi se ti drastično spremenili, bi analizo ustavil, ponovno nastavili pogoje in znova injicirali vzorec. Zaradi takih primerov je potrebno ročno voditi evidenco injiciranj.

Ko se je separacijski postopek končal ali smo ga prekinili sami, smo dobili rezultate v obliki posnetega spektrograma s signalom iz detektorja. Dobljene signale smo s pomočjo standardov integrirali in določili, katere komponente so v posameznem vzorcu. Iz spektrograma lahko izračunamo podatke o resoluciji oz. loljivosti, o selektivnosti, o teoretskih stopnjah in retenzijske ose.

3.4 Analitika

3.4.1 Metoda »Acetone Insoluble Matter« po Ja 4-46

S to metodo dolo ujemo koli ino v acetonu netopne snovi. Je ena izmed analitskih postopkov dolo evanja prisotnosti fosfolipidov neki snovi. [5]

Splozni opis metode

Natehtamo 5g materiala in mu dodamo 10 ml petroletra. e je materiala manj, koli ino petroletra prera unamo iz tega razmerja. Material raztopimo, kolikor se da, in pri tem pazimo, da nam petroleter ne izhlapeva. e se ves material v petroletru ne raztopi, prefiltriramo ostanek. Raztopini ali filtratu dodamo 25 ml acetona, nasi enega z lecitinom s temperaturo 0-5°C. Po dodatku acetona se iz raztopine nekaj materiala obori. Raztopino z oborino damo v dve cncrifugirki (v vsako enako koli ino) in dodamo toliko acetona (nasi enega z lecitinom), da razred imo do 40 ml. Nato damo centrifugirki v hladno vodno kopel pri temperaturi med 0°C in 5 °C za 15 minut. Po prete enem asu centrifugiramo 5 minut na 3000 obratov na minuto. Po centrifugiranju odlijemo teko ino, posedenim trdnim delcem pa ponovno dolijemo nasi en aceton in postavimo v hladno vodno kopel. Proces, brez raztapljanja v petroletru, trikrat ponovimo.

K metodi AIM spada tudi priprava nasi enega acetona. Za pripravo 16 l nasi enega acetona zadostuje 5 g lecitina, torej za pripravo 1 l porabimo le 0,3125 g lecitina. Zmes lecitina in acetona damo v hladno vodno kopel s temperaturo od 0-5°C za dve uri in mezamo po intervalih po 15 minut. Po dveh urah zmes prefiltriramo. Pri tem vseskozi ohranjamo tako temperaturo, kot je bila v kopeli. Prefiltrirano raztopino damo v hladilnik in pustimo stati en dan. Tako pripravljen aceton je pripravljen za metodo AIM. [5]

$$AIM, \% = \frac{\text{masa v acetonu netopnih snovi} \cdot 100}{\text{masa vzorca}} - \% \text{ v petroletru natopne snovi}$$

3.4.2 Metoda »Hexane Insoluble Matter« po Ja 3-87

S to metodo dolo imo substance netopne v heksanu pod dolo enimi pogoji. Primerna je za lecitin iz soje in koruze. [6]

V 250 mililitrsko erlenmajerico natehtamo 10 g. e je vzorec viskozen ga pred tehtanjem omeh amo s segrevanjem (ne ez 60°C). Vzorcju dodamo 100 ml heksana in stresamo dokler se ne ratopi. Raztopino filtriramo skozi kerami no nu o s filter paprijem, ki smo jo pred filtriranjem segrevali 1 uro na 105°C in predhodno stehali. Ko vso vsebino prelijemo iz erlenmajerice skozi nu o, jo ze operemo z dvakrat po 25 ml heksana in oboje vlijemo skozi nu o. Nu o s filterpapirjem suzimo 1 uro v suzilniku pri 105°C, kjer lahko temperatura niha za 2°C. po suzenju nu o ohladimo na sobno temperaturo in stehamo. [5]

$$HI, \% = \frac{\text{razlika v teži nuče} \cdot 100}{\text{masa vzorca}}$$

3.4.3 Analiza na HPLC kromatografu

Vzorci, ki smo jim dolo evali vsebnost PC, PI, PE, smo analizirali na HPLC kromatografu (High Performance Liquid Chromatography). Na tej napravi lahko opravljamo razli ne analize, vendar vsaka od njih pa zahteva drugo metodo in drugo kolono (stacionarno fazo). Vzorec potuje po koloni z mobilno fazo, ki je lahko sestavljena iz enega ali mezanice ve topil. etverna rpalka nam je omogo a, da bi lahko uporabili tudi ve mobilnih faz, ki bi jih med seboj mezali. Komponente v vzorcju so imele razli ne retenzijske ase, kar je pomenilo, da se je vsaka komponenta izlo ila iz vzorca po to no

dolo enem asu. DAD detektor je zaznal koliko svetlobe je absorbirala posamezna komponenta, iz katerih smo dolo ili vsebnost PC, PI, PE. DAD detektorju je sledil detektor ELSD, v katerem so se hlapne komponente najprej uparile, svetloba LED diode z dolo eno valovno dolžino je obsijala molekule posameznih komponent, molekule so to svetlobo razprzile. Detektor je glede koli ino razprzene svetlobe dolo il koncentracijo dolo ene komponente.

Tabela 3-1 Podatki o analiti ni metodi na HPLC kromatografu

Aparat	HPLC
Kolona	Agilent prep-SIL Scalar 150x4,6mm, 5 μ m
MF A:	heksan:metanol:2-propanol=95:2,5:2,5 +10mM NH ₄ Ac
MF B:	metanol:2-propanol=60:40 + 10mM NH ₄ Ac
Gradient(razmerje/čas)	100% A, 0% B/0 min
	81,3% A, 18,7% B/20 min
	0% A, 100%B/21,2 min
	0% A, 100%B/25 min
	82,3%A, 18,7%B/25,1 min
	3 min postrun
Valovna dolžina	UV 210 nm
Temperatura kolone	45°C
Topilo	heksan:kloroform=1:2
Pogoji ELSD	T=45°C
	gain 1
	filter 8
	pretok N ₂ =3,5bar

4 REZULTATI IN OPAȚANJA

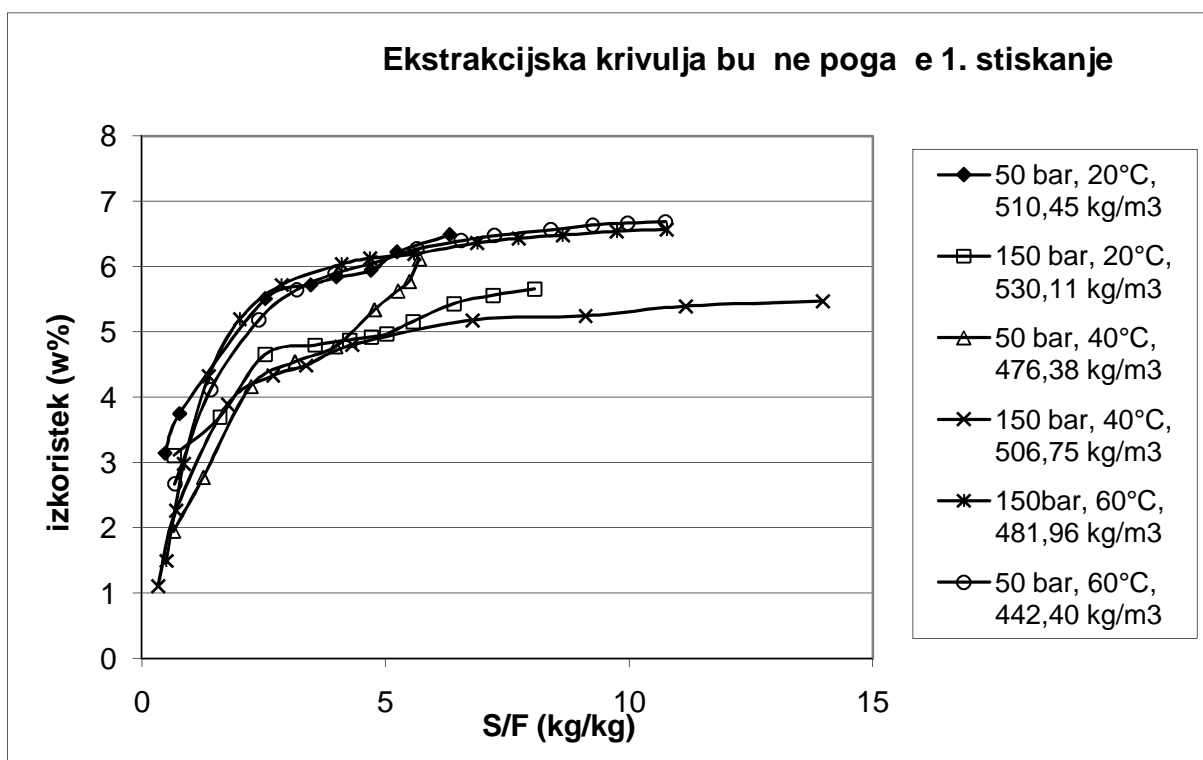
4.1 Rezultati AIM in HI

Koli ina v acetonu netopne snovi v lecitinu po AIM metodi je **89,64%**. Koli ina v heksanu netopne snovi je **6,48%**. Rezultati nam povedo da je v srovem lecitinu 89,64%v acetonu netopnih snovi in 6,48% v heksanu netopnih snovi.

4.2 Rezultati ekstrakcije bučne pogače s propanom

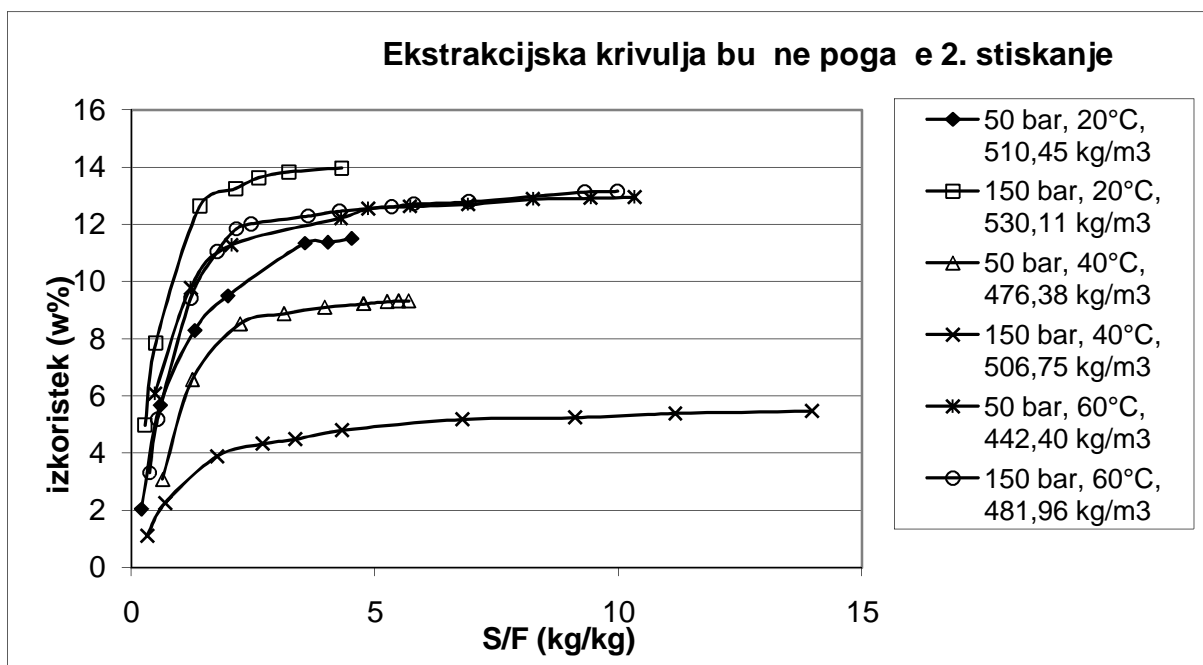
Tabela 4-1 Rezultati ekstrakcij bučne pogače s propanom pri različnih pogojih

material	T[°C]	p[bar]	t[min]	m _{ost} [g]	m _{zač} [g]
1. stiskanje	20	50	210	27,34	29,72
2. stiskanje	20	50	210	25,42	30
1. stiskanje	20	150	300	28,12	30,06
2. stiskanje	20	150	180	26,42	30,12
1. stiskanje	40	50	240	28	30
2. stiskanje	40	50	240	26	30
1. stiskanje	40	150	270	28,2	30,1
2. stiskanje	40	150	270	26,12	30,02
1. stiskanje	60	50	330	27,98	30
2. stiskanje	60	50	270	25,5	30,2
1. stiskanje	60	150	330	28	30
2. stiskanje	60	150	360	25,85	30,01



Slika 4-1 Ekstrakcija s propanom (ekstrakcijske krivulje bu ne poga e-1. stiskanje)

Podatke o gostoti sem nazel v lanku.[12]



Slika 4-2 Ekstrakcija s propanom (ekstrakcijske krivulje bu ne poga e 2. stiskanje)

Na Sliki 4-1 in 4-2 so ekstrakcijske krivulje bu nih poga po 1. in po 2. stiskanju. Presenetljivo je, da je izkoristek ekstrakcije bu ne poga e po 2. stiskanju ve ji kot pa izkoristek ekstrakcije bu ne poga e po 1. stiskanju, saj smo pri akovali ravno obratno. Da bi nazli moöno razlago za tak pojav, smo se pri dobavitelju bu ne poga e pozanimali o

postopku stiskanja. Ugotovili smo, da pred drugim stiskanjem v zmes dodajo son ni no olje. Ker ne poznamo to ne koli ine dodanega olja, je razprava o rezultatih dokaj nesmiselna.

Omejili smo se na ekstrakcijske krivulje bu ne poga e po 1. stiskanju. Najvizje izkoristke opazimo pri temperaturi 60°C, kjer je kon ni izkoristek pri obeh delovnih tlakih približno enak. Podoben izkoristek opazimo pri 50 bar in 20°C. Nekoliko niOje izkoristke opazimo pri ekstrakciji pri 40°C. Najve ji izkoristek imamo pri najvizji temperaturi, ker z naraz anjem temperature naraz a topnost. Na visok izkoristek pri 50 bar in 20°C pa vpliva visoka gostota plina, zaradi katere je topnost ve ja. NajniOji izkoristki so pri ekstrakcijah pri 40°C, zaradi tega ker ne gre ne za najvizjo temperaturo ne za najvizjo gostoto plina. Izkoristke smo dolo ilo z tehtanjem. Ko se je masa ustalila, je ves propan uzal iz ekstrakta in po analizi na HPLC kromatografu nismo zaznali ostankov topila.

4.3 Rezultati konvencionalne ekstrakcije bučne pogače

Tabela 4-2 Rezultati konvencionalnih ekstrakcij bu ne poga e

vzorec	topilo	$t_{\text{ekst.}}[\text{h}]$	št. ciklov	$m_{\text{zač}}[\text{g}]$	$m_{\text{ekstr}}[\text{g}]$	$m_{\text{ost}}[\text{g}]$	Izkoristek[%]	Vsota $m_{\text{ekstr}} + m_{\text{ost}}[\text{g}]$
1. stiskanje	petroleter	2,5	16	28,2	2,11	25,12	7,48	27,23
	etanol	16	29	50	8,99	41,8	17,98	50,79
2. stiskanje	petroleter	3	20	30,25	4,95	25,54	16,36	30,49
	etanol	16	32	50	7,65	43,04	15,30	50,69

Iz preglednice 4-2 lahko vidimo, da so ekstrakcije z etanolom trajale dlje. Delno je bil razlog vizja za etna masa material, delno je bil razlog niOja hlapljivost in vizje vreliz e etanola, ki vre pri okoli 76°C, med tem ko petroleter vre pri okoli 40-60°C.

S petroleterom, smo dobili podobne izkoristke kot pri superkriti ni ekstrakciji s propanom. Pri uporabi etanola smo dobili vizje izkoristke, kar si razlagamo s tem, da je etanol raztopil ze druge komponente in da nismo topila popolnoma odstranili iz ekstrakta.

Vsota mas ekstrakta in trdnega preostanka ostanka po ekstrakciji po tu uparjanju in suzenju, je bila ve ja kakor za etna masa, kar lahko opazimo tudi iz preglednice 4-2. To pomeni, da iz ekstrakta ali ostanka nismo mogli odstraniti vsega topila. Izkazalo se je, da je superkriti na ekstrakcija res ugodnejza, saj ni bilo ostankov topilo kakor pri konvencionalni ekstrakciji.

Ko smo posamezne ekstrakte analizirali na HPLC kromatografu in primerjali komponente v ekstraktih, smo zaznali enake komponente, le sestave so se nekoliko razlikovale. Pri ekstraktu po konvencionalni ekstrakcije je detektor zaznal ze sledove topila.

4.4 Rezultati kolonske kromatografije lecitina

Eksperiment 1:

Prvo kolonsko kromatografijo lecitina smo izvedli pri 60°C. Za ekstrakcijo smo v azo natehtali 50g lecitina in mu dodali 187,24g 96% etanola in azo z zmesjo postavili v vodno kopel, ki je bila segreta na 60°C in zmes za eli mezati z mehanskim mezalom. Tekom mezanja je trdni del postajal lepljiv in zelo gost in se je prijemal mezala. Po dveh urah smo

mezalo odstranili iz aze in iz njega postrgali ostanke materiala, ki so se nanj prijeli. Ekstrakt smo odfiltrirali od ostanka po ekstrakciji, mu uparili topilo in dolo ili maso. Mase trdnega ostanka pa nismo mogli dolo iti to no, saj je prizlo zaradi lepljivost do izgub. Kolonsko kromatografijo smo izvedli v 55 cm visoki koloni s premerom 4 cm. Vzorec smo eluirali in zbrali 10 frakcij po 110ml.

Kolona, ki smo jo uporabili, je bila relativno velika in smo lahko vanjo dali ve jo koli ino topila. Zaradi tega nismo mogli natan no spremljati, kako se tekom kromatografije spreminja barva posameznih frakcij.

Med poskusom nivo SG ni bil enakomeren in pojavile so se kapilare. Pretok je bil od 3-6 ml/min. Ko smo zbrali vse frakcije, smo uparili topilo in jih analizirali na HPLC kromatografu.

Tabela 4-3: Rezultati analiz vhodnega materiala in frakcij kolonske kromatografije pri 60°C¹

EKSTRAKT	/	39,97	7,93	3,81
A1	0,9313	12,39	11,96	6,99
B1	1,7832	17,13	22,57	6,37
C1	1,1463	28,52	18,77	4,21
D1	1,0606	35,12	13,35	4,55
E1	0,9679	37,95	12,56	3,8
F1	0,8962	45,3	9,38	3,33
G1	0,8923	47,29	8,02	3,34
H1	0,7529	58,05	7,61	2,93
I1	0,694	56,13	6,23	3,64
J1	0,658	56,57	6,34	3,2

Iz tabele 4-3 prikazuje rezultate analiz vhodnega materiala in frakcij kolonske kromatografije in iz nje vidimo, da dele0 PC od prve do zadnje frakcije naraz a. Prve frakcije vsebujejo manj PC kot ekstrakt, saj smo se del adsorbira na stacionarno fazo. Najvizji dele0 PC dobimo v frakciji H1 58,05%, sledita ji frakciji J1 z 56,13 % in I1 z 56,57%. Pri akovali smo nekoliko ve je dele0e v vseh frakcijah, najvizje okoli 70-80%. Opazimo pa lahko, da so kar precej manjzi dele0i. Domnevamo, da je temu tako zaradi:

- kapilar, ki so se pojavile,
- neenakomerno nasutega SG,
- velikosti kolone, v katero smo naenkrat dali preve topila, namesto to no dolo eno koli ino, ki je bila potrebna za posamezno frakcijo,
- premera kolone, ki je bil prezirok in zaradi tega nismo dobili primerne vizine nasutja SG.

Niz naslednjih kolonskih kromatografij smo opravili z manjzo kolono, v katero smo nasuli viziji in enakomernejzi nivo SG, ter to no dolo eno koli ino topila za posamezno frakcijo.

Ekspiriment 2:

Kolonsko kromatografijo smo ponovili pri temperaturi 60°C v manjzi koloni (premerom 1 cm in vizino 45 cm, torej prostornina znaza 35,4 ml). Po dvournem ekstrakciji in uparjanju smo topila iz ekstrakta smo pripravili vzorec za kromatografijo. Razmerje med suhim ekstraktom in SG je znazalo okoli 1:2,5. Ko smo o istili SG, smo nanj vlili vzorec in nato eluirali PC iz vzorca. Za to smo smo uporabili 400 ml etanola. Zbirali smo 16 frakcij po 25 ml. Frakcije smo poimenovali s rkami od A do P. Frakcije ki so pri eksperimentu 1 imele podobne koncentracije smo zdru0evali in sicer od A do D (skupni volumen100 ml), E in F

¹ Vrednosti dele0ev v tabeli so povpre je treh analiz, razzrijena tabela je v poglavju Priloge

(skupni volumen 50 ml), GHIJ (skupni volumen 100 ml) in od K do P (skupni volumen 150 ml).

V tem poskusu se kapilare niso pojavile in nivo nasutega SG je bil po celotnem premeru enak. Pred vsako frakcijo smo nalili toliko etanola, kolikor je bilo potrebno za frakcijo, pri tem pa smo pazili, da je bil nivo teko line zmeraj nad nivojem nasutja SG, preden smo vlili novo koli ino etanola. Sprva je bila 1. frakcija brezbarvna. Prva obarvana kapljica je kanila med 15 in 20 ml prve frakcije. Prva frakcija je bila obarvana rumeni rjavo, vse naslednje so bile rumene in so proti koncu vedno bolj bledele do skoraj brezbarvne na koncu. Pretok frakcij skozi SG je znazal med 2 in 3 ml/min. Na slik 4-4 lahko opazimo da je dele0 PC ve ji kakor pri eksperimentu 1, manjza kolona je u inkovitejza.

Eksperiment 3:

Kromatografijo smo izvedli pri 25°C. Mase vzorca in SG ter volumni etanola so bili enaki kot prej. Zdru0evali smo naslednje frakcije od A do D (skupni volumen 100 ml), E in F (skupnim volumen 50 ml). GHI (skupni volumen 75 ml) ter od J do P (skupni volumen 175 ml).

V nasutem sloju SG se niso kapilare pojavile in samo nasutje je bilo enakomerno po celotnem premeru. Pretok frakcij je bil med 3,1 in 4,9 ml/min. Tako kot pri prejnem primeru je tudi tukaj prva rumena kapljica padla med 15 in 20 ml. Prva frakcija je imela najizrazitejzo rumeno-rjavo obarvanje, nato pa je obarvanje prezlo v rumeno barvo, ki je iz frakcije v frakcijo bledele.

Frakcije smo uparjali, da smo odstranili etanol in jim po uparjanju dolo ili maso. Ekstrakte posameznih frakcij smo shranili v inertni atmosferi (prepihali so jih z duzikom) v hladilniku. Sledila je analiza na HPLC kromatografu, kjer smo razen frakcij analizirali ze ostanek po ekstrakciji in ekstrakt. Dolo ili smo vsebnost prisotnih fosfolipidov PC, PE, PI.

Eksperiment 4:

Kromatografija smo izvedli pri 40°C. Postopek in koli ine vzorca, SG in etanola so bile enak kot pri preteklih eksperimentih. Najprej smo lecitin ekstarahirali pri 40 °C za 2 uri. Zmes ekstrakta in trdnega ostanka smo po kon ani ekstrakciji lo ili. Topilo iz ekstrakta smo uparili na rotavaporju, trden ostanek pa smo postrgali is posode in ga posuzili pri 60°C. Posuzenemu ostanku in ekstraktu, smo dolo ili maso. 5 g ekstrakta smo raztopili in vlili v kolono.

Ko smo vzorec vlili v kolono, smo dopolnili etanol do vrha kolone. Po akali smo nekaj asa, da smo dosegli 0eleno temperaturo. Pred novo frakcijo smo kolono vedno znova dopolnili do vrha z etanolom, segretim na delovno temperaturo. Tudi v tem primeru smo frakcije zdru0evali in sicer od A do D (s skupnim volumnom 100 ml), E in F (s skupnim volumnom 50 ml), od G do J (s skupnim volumnom 100 ml) in od K do P s skupnim volumnom 150 ml.

Pogoji so bili ves as eksperimenta konstantni, nasutje SG je bilo enakomerno po celem premeru kolone, kapilare se niso pojavile, termostat je dobro vzdr0eval temperaturo kolone. Pretok je bil med 2 in 2,9 ml/min

Kot 0e v prejnih primerih je tudi tukaj kanila prva obarvana kapljica nekje med 15 in 20 ml, kar pomeni da potrebuje vzorec ravno takzno koli ino etanola, da pride do ventila za regulacijo pretoka eluata. Opazili smo da se barva frakcij spreminja. Prva frakcija je bila obarvana oker, naslednje frakcije so bile rumene, katerih intenzivnost obarvanja je od za etka proti koncu padala. Na koncu so bile frakcije brezbarvne. Ko so bile zbrane vse frakcije, smo iz njih uparili topilo na rotavaporju in iz bu k za uparjanje postrgali vzorce, jih dali v posodice in jih prepicali z duzikom, s katerim smo ustvarili inertno atmosfero in jih dali v zamrzovalnik. Sledila je analiza Na HPLC kromatografu, kjer smo dolo ili vsebnost prisotnih fosfolipidov (PC, PI, PE).

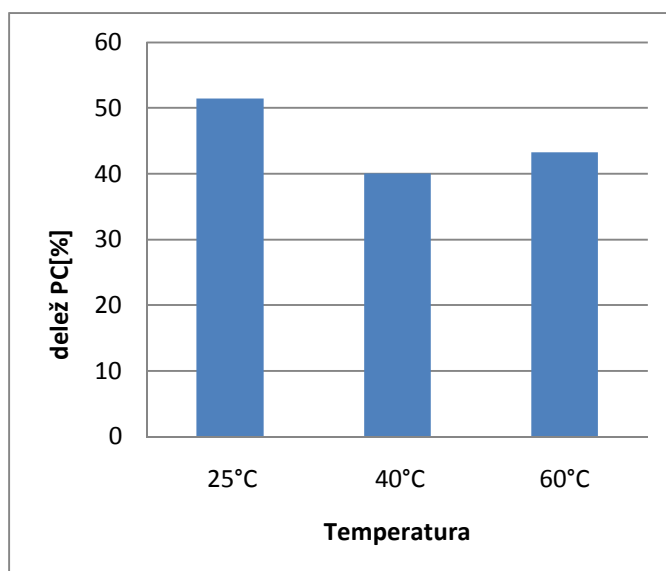
Tabela 4-4 vsebuje mase lecitina in mase etanola uporabljene pri ekstrakciji, izkoristek ekstrakcije, maso trdnega ostanka, maso SG, maso ki smo jo uporabili za pripravo vzorca, masni odstotek vzor ne raztopine in masno razmerje med maso SG in vzorca.

Tabela 4-4: Za etni podatki pri kolonski kromatografiji lecitina pri razli nih temperaturah

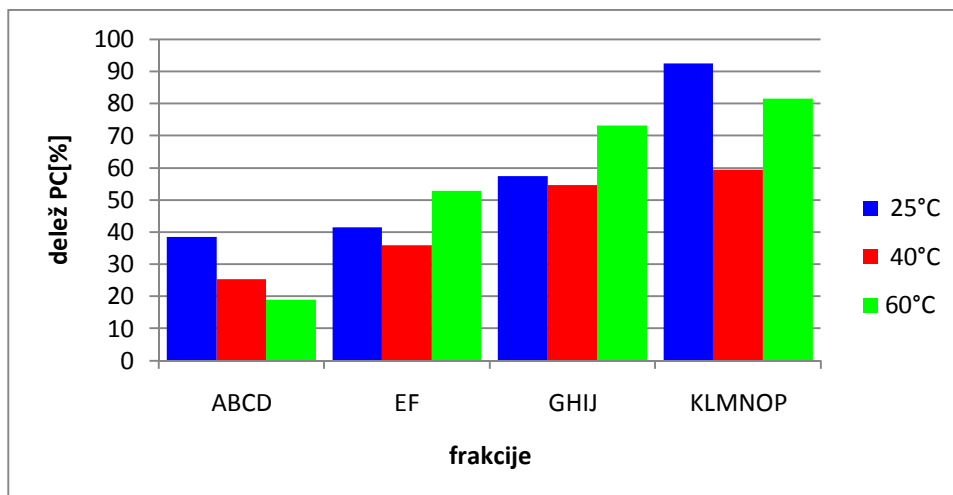
	T [°C]	m _{zac.} [g]	m _{etanol} [g]	m _{ekstrakt} [g]	Izkoristek [%]	m _{SG} [g]	m _{ekstrakta} za KK[g]	R: vzorec:SG	Vzor na raztopina [%]
1	60	50,02	187,24	13,88	27,7	28,75	13,88	1:2	22
2	60	40,00	150,05	15,01	37,5	12,5	5,02	1:2,5	33,4
3	25	40,00	150,45	8,96	22,4	12,5	5,01	1:2,5	33,2
4	40	40,06	150,03	10,59	26,4	12,5	5,02	1:2,5	32,9

Iz slike 4-3, ki prikazuje delež PC (%) v ekstraktu pri temperaturah 25, 40 in 60°C za kolonsko kromatografijo. Delež PC v ekstraktu je najvišji pri 25 °C. Pri temperaturi 40°C in 60°C sta deleža nekoliko nižja. Domnevamo, da je temu tako zaradi zgostitve trdnega materiala in posledično zaradi oteženega prenosa snovi ter morebiti zaradi delnega razpada substance pri povzanih temperaturah. Če pa primerjamo le poskusa pri 40°C in pri 60°C, opazimo nekoliko večji delež PC v ekstraktu pri 60 °C, kar je verjetno posledica boljše prenosa snovi iz trdne v ekstraktno fazo zaradi trenutno boljše kontakta obeh faz.

Analiza ostankov po ekstrakciji z etanolom, je pokazala, da je v njih prisoten večji delež PI kot je prisoten v lecitinu iz katerega smo izhajali. Ni pa nam uspelo določiti točne sestave, saj materiala ni bilo mogoče popolnoma posuziti.



Slika 4-3 Kolonska kromatografija lecitina (delež PC (%) v ekstraktu pri temperaturah 25, 40 in 60°C)



Slika 4-4: Kolonske kromatografije lecitina (delež PC (%) po frakcijah pri temperaturah 25, 40 in 60°C)²

Če primerjamo grafikon s slike 4-3, ki prikazuje delež PC v ekstraktih pri različnih temperaturah in slike 4-4, ki prikazuje delež PC po frakcijah pri različnih temperaturah, opazimo, da so koncentracije PC prvih frakcij manjše kot koncentracije ekstraktov iz katerih izhajamo, kar je posledica, da se ene komponente hitreje eluirajo kot druge. In na ta način se PC adsorbira na površino stacionarne faze.

Naslednja stvar, ki jo lahko vidimo na sliki 4-4, je povečevanje koncentracije PC od prve frakcije proti zadnji. Najvišjo koncentracijo PC opazimo v zadnji frakciji kolonske kromatografije pri 25°C, kjer je vrednost 92%. Koncentracija PC pri ostalih dveh temperaturah v zadnji frakciji je nižja, pri 40°C je okrog 60%, pri 60°C pa 81%. Vzrok za to je verjetno manjši delež PC v posameznih ekstraktih (slika 4-3). Domnevamo, da je tak rezultat tudi posledica delnega razpada substance pri povzani temperaturi in ne povsem enakomernega pretoka topila skozi kolono. Temu bi se lahko izognili, če bi pred kromatografijo naredili preizkus pretoka topila z merjenjem s ztoparico in uravnali enakomeren pretok.

4.5 Rezultati raziskovanja parametrov separacije biološko aktivnih snovi s superkritično kromatografijo³

Superkritična kromatografija je kromatografija, kjer se kot mobilna faza uporablja plin ali tekočina nad kritično točko. V praksi je zagon in izvedba kromatografije težavna, saj je pogoje obratovanja težko vzdrževati konstantne. Pri našem delu smo se lotili stvari sistematično. Sprva smo uporabljali standardno raztopino kofeina in benzojske kisline v metanolu, kasneje smo tem komponentam dodali še druge komponente in opazovali, kako se substance ločijo.

Z nadaljnjim nastavljanjem tlaka in pretoka smo poskušali najprej dobiti stacionarne pogoje. Po vzpostavitvi stacionarnega stanja smo injicirali vzorec standardne raztopine benzojske kisline s koncentracijo 1,03 mg/ml. Tlak je bil 150 bar in 30 °C. V prvi fazi našega dela smo ugotavljali, kako vpliva pretok na separacijo. Ugotovili smo, manjši kot je

² Tabelirani rezultati so v poglavju Prilogah

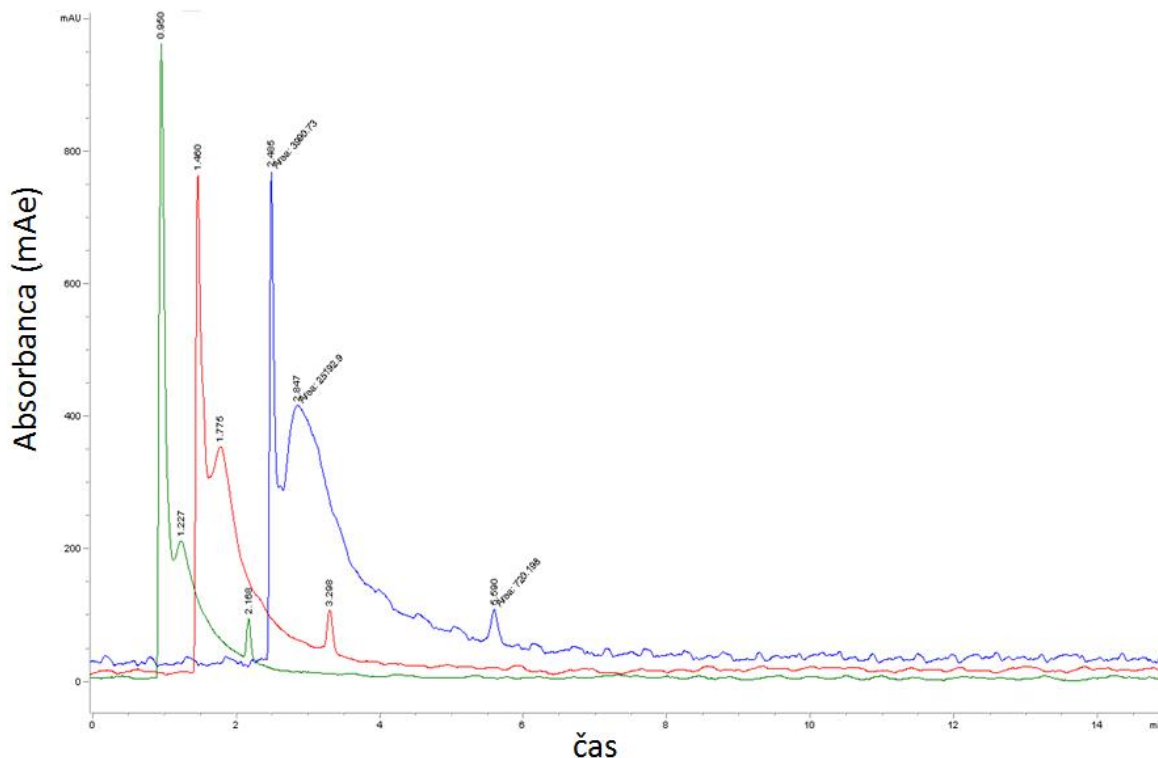
³ Vse slike rezultatov v tej sekciji so boljše vidne v prilogi

pretok, ve ji je torej retencijski čas (čas ki ga komponenta potrebuje da se izloji in na kolono).

Zelena - pretok 1,4 l/min

Rdeča - pretok 1,1 l/min

Modra - pretok 0,5 l/min



Slika 4-5 SFC: Vpliv pretoka na retencijski čas benzojske kisline pri superkritični kromatografiji CO₂ pri 150 bar in 30°C

Iz slike 4-5, na kateri je prikazan vpliv pretoka na retencijske čase benzojske kisline, je razvidno, da se z zmanjševanjem pretoka na ekspanzijskem delu, podaljša elucijski čas komponent s kolono in pozneje pride na detektor. Vrhovi so raztegnjeni. Pretok mobilne faze uravnavamo na ekspanzijskem delu in ga merimo pri sobnih pogojih z rotametrom. Iz temperature in tlaka izračunamo gostoto CO₂ pri sobnih pogojih. Da lahko določimo pretok mobilne faze skozi kolono, moramo izračunati gostoto pri pogojih v koloni. Iz pretoka in gostote ekspanziranega plina izračunamo pretok skozi kolono pri danih pogojih.

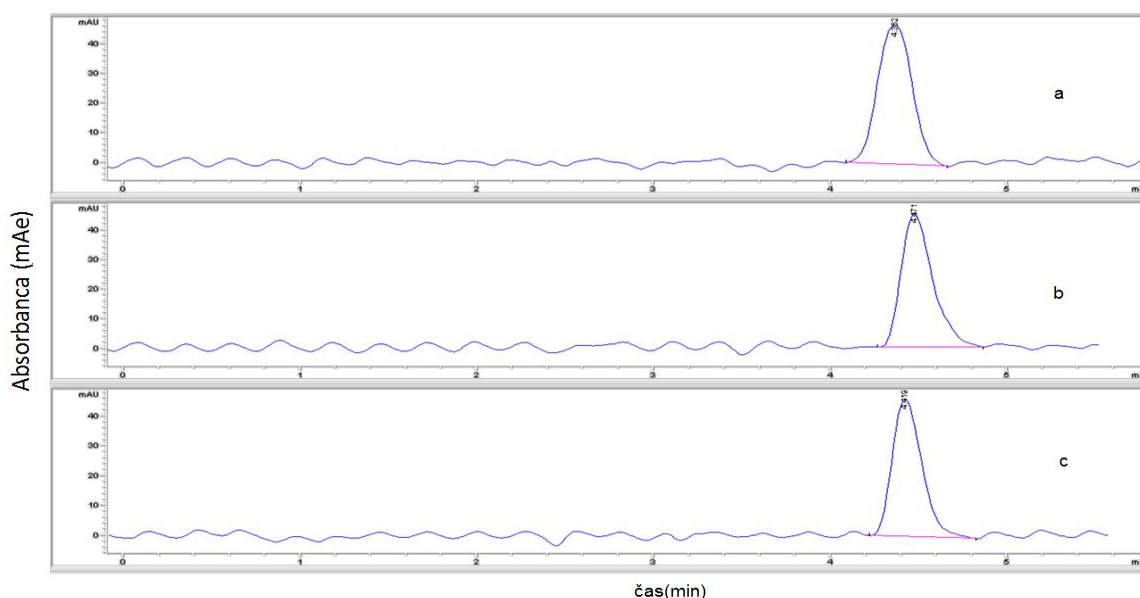
Ko smo poskušali ločiti zmes kofeina in benzojske kisline, separacija ni bila uspešna, saj nismo dobili ločenih peakov. Ugotovili smo, da so pretoki skozi kolono relativno visoki (npr. pri 150 bar in 30°C je pretok skozi kolono $q_{kol}=3$ ml/min, kar je pretok na ekspanzijskem delu 1,4 l/min na ekspanzijskem delu). Da bi dosegli boljše separacije, bi bil morali pretok skozi kolono zmanjšati. Postrojenju pred injektorjem smo dodali mikro razdelilni ventil, s katerim smo poskušali doseči manjši pretok mobilne faze skozi kolono. Vstopni tok mobilne faze razdeli se v tem delu razdeli na dva dela; na del, ki ga vodimo v kolono in na del, kamor vodimo ostanek vstopnega toka. Če toka ne bi razdelili, bi se tlak z zapiranjem ventila povečeval, zaradi česar ne bi imeli konstantnih pogojev. Tok, ki je zelo visok skozi kolono in detektor, smo pred ekspanzijskim delom ponovno združili s tokom preostale mobilne faze. Ugotovili smo, da je nelinearna zveza med stopnjo odprtosti ventila in pretokom. Ker se SCF obnažajo drugače kot tekočine zaradi

druga njih lastnosti, nismo mogli določiti dejanskih pretokov SCF. Zato smo ponovno poskusili ločiti komponente iz prej uporabljene zmesi kofeina in benzojske kisline. Ugotovili smo, da ta ventil ni deloval pravilno, saj smo, namesto boljše separacije kakor v prejšnjem primeru, dobili signal brez vrhov.

Ugotovili smo, da zaradi upora posameznih komponent postrojenja prihaja do padcev tlaka na veji, ki teče skozi kolono in detektor. Na delu, ki združuje tok ostanka in tok iz kolone, prihaja do mezanja fluidov z različnim tlakom. Višji tlak (v našem primeru tok ostanka) prevlada nad nižjim tlakom. Razlika med tlakoma je dovolj visoka, da se mobilna faza v veji s kolono premika izredno počasi ali pa se sploh ne premika. Ker se fluid ne pretaka skozi detektor, ni mogoče zaznati analiziranih komponent; na signalu zato ni vidnih vrhov, prav bi ti morali biti.

To situacijo smo poskušali rešiti z vgradnjo dodatne kolone na vejo, kjer teče ostanek. Uporabte novo vgrajene kolone bi naj pripomogel, da bi izenačili tlaka na združenem delu in ponovno dosegli pretok na glavni veji. Ukrep pa ni prinesel oženih rezultatov, saj detektor se vedno ni zaznal komponent v vzorcu, kar je pomenilo, da je bila razlika v tlakih še vedno previsoka. Tudi dodajanje sotočila v tej fazi ni imelo nobenega učinka.

H koloni na toku ostanka smo nato dodali še pomožni regulator tlaka. S tem regulatorjem smo skušali povečati uporabe toka ostanka do te mere, da bi dobili dober signal na detektorju. Dokler je bila mobilna faza le CO_2 nad kritično točko, detektor komponent ni zaznal. Ko pa smo ogljikovemu dioksidu, ki je skozi kolono tekkel pri 150 bar in 35°C in pretokom okoli 2,8 ml/min, dodali sotočilo metanol, ki se je pretakal s konstantnim volumskim pretokom 0,3 ml/min, smo dobili odziv na detektorju. Pretok sotočila pomeni nek dodaten tlak, ki je bil potreben, da smo lahko premostili razliko v tlakih, zaradi katere prej nismo dobili odziva na signalu. Preverili smo, ali smo z vgradnjo mikro razdelilnega ventila dosegli zmanjšanje pretoka mobilne faze skozi kolono in posledično tudi višje retencijske čase analiziranih komponent (v tem primeru kofeina). Rezultati so na sliki 4-6.

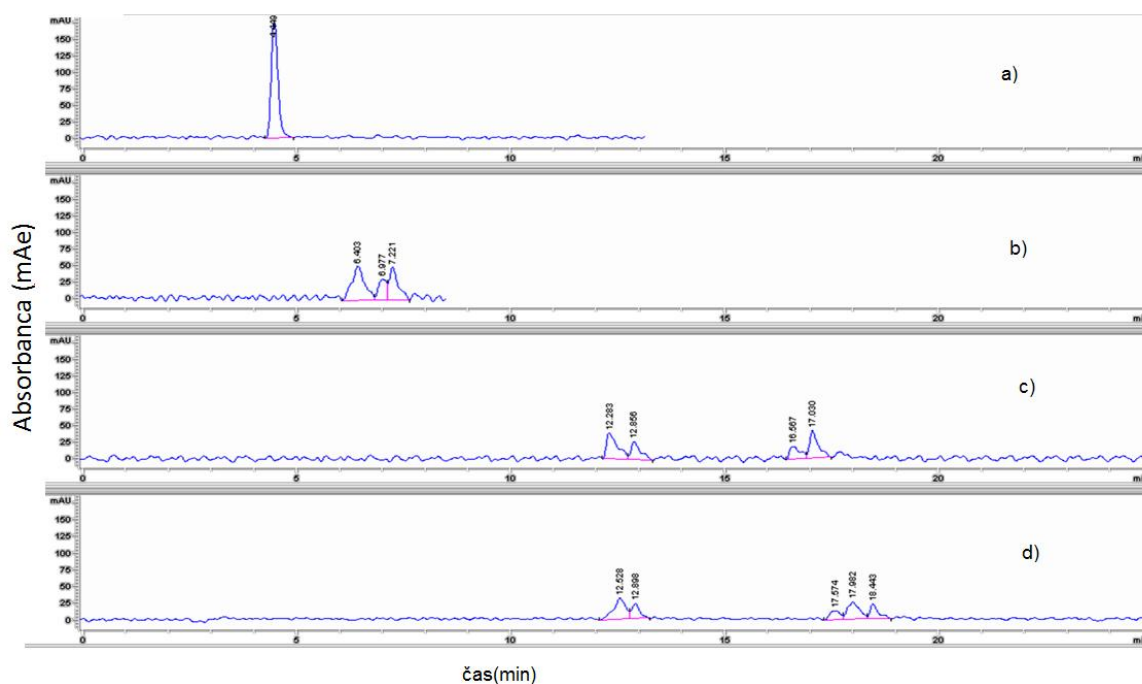


- a) Ventil odprt do konca
- b) Zaprt za 2,5 obrata
- c) Ventil popolno zaprt

Slika 4-6 SFC: Vpliv mikro razdelilnega ventila retencijske čase kofeina

Slika 4-6, ki prikazuje vpliv mikro razdelilnega ventila na retencijske ase, kjer je razdelilni ventil popolnoma odprt (a) in najmanj odprt (c), ka0e da ventil ne obratuje, kakor smo predvidevali, saj so razlike med retencijskimi asi majhne, skoraj zanemarljive.

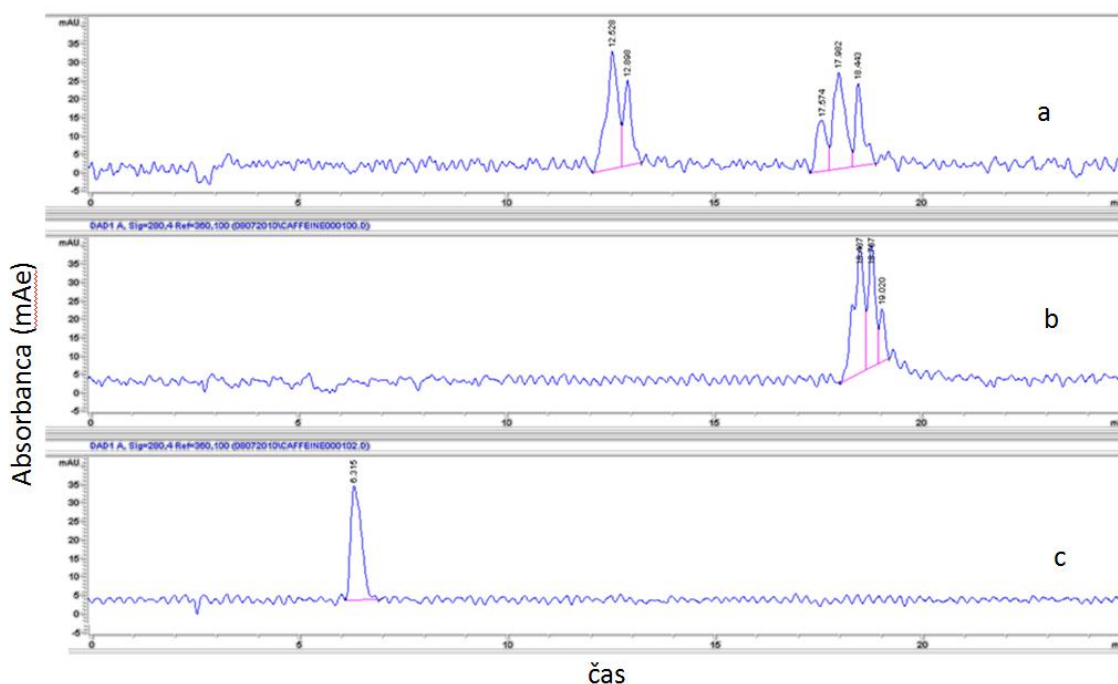
V naslednji fazi smo pretoke sotopila zmanjšali. Sprva je bil pretok sotopila $q_{\text{sotopila}}=0,2$ ml/min, nato smo ga zmanjšali na 0,1 ml/min in kasneje ze na 0,05 ml/ min. Pri vseh pretokih smo injicirali mezanico dveh standardov . kofeina in teofilina in najboljše sta se komponenti lo ili pri pretoku sotopila pri 0,05 ml/min. Na slikah 4-7 od a) do d) so prikazani kromatogrami teh meritev.



- a) Pretok sotopila 0,2 ml /min
- b) Pretok sotopila 0,1 ml/min
- c) Pretok sotopila 0,05 ml/min
- d) Pretok sotopila 0,05 ml/min (nekoliko spremenjene nastavitve detektorja)

Slika 4-7 SFC: Vpliv pretoka sotopila na separacijo kofeina in tofilina (pri 150 bar in pri 35°C, pretok skozi kolono je značal 2,8 ml/min)

Nato smo injicirali posebej vsak standard, da sem lahko dolo il kateri vrh ustreza kateremu standardu. Obratovalni pogoji so bili v vseh primerih enaki 150 bar in 35°C pretok SCF skozi kolono je znazal okoli 2,8 ml/min.



- Kofein in teofilin pri pretoku sotpila 0,05 ml/min
- Tefilin pri pretoku sotpila 0,05 ml/min
- Kofein pri pretoku sotpila 0,05 ml/min

Slika 4-8 SFC: Signal separacije kofeina in teofilina in ustrezni signali standardov kofeina in teofilina (150 bar, 35°C, 2,8 ml/min pretok skozi kolono)

Signali na sliki 4-7 a) signal pri pretoku sotpila 0,2 ml/min, b) je 0,1 ml/min c) in d) je pri 0,05 ml/min. S a) kromatograma na siki 4-7 pri pretoku sotpila 0,2 ml/min vidimo, da se komponenti nista lo ili, saj je samo en sam signal za vse. Na b) kromatogramu slika 4-7 pri 0,1 ml/min opazimo, da se je vrh razdelil in da se je retencijski as pove al, ampak ze vedno ne moremo dolo iti kateri komponenti pripada kateri vrh. Na c) signalu 0e vidimo dve skupini vrhov, kar pomeni, da imamo prisotni dve komponenti. Te0ava je le v tem, da so vrhovi v vsaki skupini lo eni, kar pomeni neko motnjo. Na sliki 4-7 d) je signal jasnejzi zaradi nekoliko spremenjenjih nastavitvev detektorja.

Slika 4-8 ustreza separaciji kofeina in tofilina pri pretoku stopila 0,05 ml/min. Kromatogram na sliki 4-8 a) je enak kromatogramu na sliki 4-7 d), dodani so ji signali standardov. B) kromatogram na sliki 4-8 ustreza signalu teofilina c) pa signalu kofeina. Opazimo lahko, da se signal teofilina odli no prilega s signalom na kromatogramu a). Med tem ko se signal kofeina ne ujema. To bi si lahko razlagali, da se kofein ob prisotnosti teofilina obnaza druga e.

Delo s SFC zahteva veliko natan nost, saj se ob majhnih spremembah v temperaturi, tlaku ali pretoku lahko lastnosti mobilne faze zelo spremenijo. Zato je dobro obvladovanje pogojev obratovanja klju nega pomena. Prvi problem predstavlja zagotavljanje konstantnega tlaka, saj tlak pada zaradi upora, ki ga predstavljajo komponente postrojenja. Tega ni mo0no odpraviti, saj te komponente vedno predstavljajo upor do neke mere. Kve jemu bi lahko izgube tlaka po vsaki komponenti izmerili in jih upoztevali pri posameznih izra unih.

Naslednji problem je regulacija in izena evanje tlakov v primeru uporabe mikro razdelilnega ventila. V tej fazi bi bilo smiselno uporabiti preverjene priklju ke.

Dodatni problem predstavlja nihanje v gostoti mobilne faze, do katerega pride zaradi nihanja temperature po celem postrojenju. Temperatura fluida iz rpalke do kolone je enaka sobni. Edini del, ki ga segrevamo, je kolona sama. Zaradi različnih temperatur pride do razlik v gostoti. Temu pa bi se do neke mere lahko izognili, če bi imeli toplotno izoliran sistem ter ogrevanje vseh drugih komponent postrojenja (cevi, ventili itd.), ki so v kontaktu s superkritičnim fluidom kot mobilno fazo.

Če dobro poznavanje laboratorijskih naprav omogoča uspešno delo na večji pilotni in industrijski napravi, kjer pa se običajno pojavijo tudi dodatni problemi.

5 ZAKLJUČKI

V tej diplomski nalogi smo raziskovali uporabo ekstrakcijskih in kromatografskih metod za separacijo biološko aktivnih snovi iz rastlinskih materialov. Osredotočili smo se predvsem na uporabo metod s plini nadkriti no to ko . superkriti nimi fluidi. Primerjamo jih s konvencionalni, bolj raziskani metodi separacije.

Že v številni industriji uporabljajo ekstrakcijo za separacijo biološko aktivnih komponent iz rastlinskih materialov. Obstajajo pa metode, ki se pa niso toliko raziskane, vendar bi njihova uporaba prinesla nekatere prednosti. V okviru naših raziskovanj smo preiskovali uporabo ekstrakcij v oljarnah, kjer bi iz obojestranskih bučnic, predelanih v bučno pogačo po 1. in po 2. stiskanju, poskušali povečati izkoristek in z ekstrakcijo dobiti več olja. Bučno pogačo po 1. in 2. stiskanju smo ekstrahirali z visokotlačno ekstrakcijo s propanom ter konvencionalno ekstrakcijo in ju primerjali.

Potrdili smo hipotezo, da se izkoristki ekstrakta med različnimi tipi topila razlikujejo, saj se razlikujejo lastnosti topila. Prav tako smo potrdili hipotezo, da se lastnosti komponent ne spreminjajo, ko uporabimo visokotlačno ekstrakcijo.

Ugotovili smo in s tem potrdili eno izmed hipotez, da je visokotlačna ekstrakcija primernejša, saj v ostanku in ekstraktu ni prisotnih ostankov topila, medtem ko pri konvencionalni ekstrakciji vedno so. Konvencionalna ekstrakcija poteka v nekaterih primerih hitreje kot visokotlačna, saj imajo topila večjo topnostno moč ali pa prej dosežejo nasičeno količino materiala. Kljub prednostim superkritne ekstrakcije pa je uporaba konvencionalne ekstrakcije cenejša in zato zbirke uporabljena. Zaradi toksičnosti nekaterih organskih topil je uporaba omejena le na topila, ki niso toksična.

Ekstrakcije s superkritnim fluidom so uporabne, če ima produkt dovolj veliko tržno vrednost ali če ni drugih možnosti separacijskih procesov.

V drugem delu diplomske naloge smo raziskovali uporabo kromatografskih metod. Najprej smo iz lecitina poskušali skonstruirati fosfatidilholin s konvencionalno kolonsko kromatografijo pri različnih temperaturah. Ločevanje je potekalo najbolje pri najnižji temperaturi, kjer smo dobili najvišji masni delež fosfatidilholina (kar 92 %), kar je nekoliko presenetljivo, saj smo pričakovali, da bo najbolje potekalo pri najvišji temperaturi, kjer je topnost najvišja. Ugotovili smo, da je ta pojav mogoč zaradi delnega razpadanja substance pri višji temperaturi in zaradi manjše koncentracije fosfatidilholina v ekstraktu po ekstrakciji surovega lecitina. V sploznem je metoda uporabna, zato bi jo lahko vključili v proizvodnjo in to aplikacijo uporabljali za koncentriranje fosfatidilholina.

Že pri raziskavah ekstrakcijskih metod smo ugotovili, da pri konvencionalnih metodah ne moremo popolno ločiti topila iz produkta, zato bi bilo smiselno poiskati alternativo kolonski kromatografiji. Ta alternativa je kromatografija s superkritnim fluidom. V diplomskem delu smo raziskovali, kako obratovalni parametri vplivajo na separacijo komponent. Za to smo uporabili modelne substance. Prenos te aplikacije iz laboratorijskega merila na

industrijski nivo je zelo te0ak, saj je pri proizvodnji potrebno upoztevati ze veliko drugih dejavnikov in parametrov.

Kljub temu, da imajo tehnologije s superkriti nimi fluidi velik potencial, bo potrebnih ze veliko raziskav, ki bodo omogo ile rentabilno uporabo teh tehnologij v industriji.

6 LITERATURA IN VIRI

- [1]<http://en.wikipedia.org/wiki/Phospholipid>.
- [2]Knez, M., *Izolacija fosfolipidov iz Oivalskih in rastlinskih materialov*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Diplomaska naloga, 2008
- [3]Taylor, Larry T. *Supercritical fluid chromatography for the 21st century*. The Journal of Supercritical Fluids, **47/ 3**, strani 566-573, 2009
- [4]Sosada, M., *The Preparation of Rapeseed Lecithin with High Phosphatidylcholine Content*. Wiley. **94/1**, strani 35. 37, 1992
- [5]AOCS Official Method Ja 4-46, *Acetone-Insoluble Matter*, ponovno odobrena 2009.
- [6]AOCS Official Method Ja 3-87. *Hexane-Insoluble Matter*, ponovno odobrena 2009.
- [7]Kotnik, P. *Visokotla na separacija biološko aktivnih komponent iz rastlinskih materialov*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Magistersko delo, 2003.
- [8]Knez, ž., Škerget, M. *Termodifuzijski separacijski procesi*. Tehniške fakultete Maribor, 1999.
- [9]Škrinjar, M., *Koncentriranje antioksidantov iz Ustantic (Labiatae)*. Maribor: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, doktorska disertacija, 2007.
- [10]Martin i , V. *Dezodoracija olj z maksimalno retenco negliceridnih komponent*. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, doktorska disertacija, 2007.
- [11]Kotnik, P., *Supercritical Fluid Chromatography(SFC)*, Maribor: Faculty of Chemistry and Chemical Engineering. Laboratory for Separation Processes, 2005.
- [12]McLinden, MO ., *Thermodynamic Properties of Propane. I. p-rho-T Behavior from (265 to 500) K with Pressures to 36 MPa* . JOURNAL OF CHEMICAL AND ENGINEERING DATA **54/12** strani: 3181-3191, 2009.
- [13]F. Sahena, I.S.M. Zaidul, S. Jinap, A.A. Karim, K.A. Abbas, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, *Application of supercritical CO₂ in lipid extraction . A review*. Journal of Food Engineering, **95/ 2**, strani 240-253, 2009.
- [14]Siti Machmudah, Mikako Kondo, Mitsuru Sasaki, Motonobu Goto, Jun Munemasa, Masahiro Yamagata, *Pressure effect in supercritical CO₂ extraction of plant seeds*, The Journal of Supercritical Fluids, **44/ 3**, strani 301-307, 2008.
- [15]MedenoSrce . zbirka gradiv za študente medicine in stomatologije, <http://medenosrce.dsms.net/pogled.asp?ID=1756>.
- [16]Lilijana Ili , Mojca Škerget, Maza Knez Hrni , Željko Knez , *Phase behavior of sunflower oil and soybean oil in propane and sulphur hexafluoride*, The Journal of Supercritical Fluids, **51/2**, strani 109-114, 2009.

7 PRILOGE

Tabela 7-1 Rezultati kolonske kromatografije lecitina pri 60°C 1. vse meritve

FRAKCIJA	MASA FRAKCIJE	SESTAVA					
		PE%		PI%		PC%	
Ekstrakt 1	/	7,99	7,93	3,42	3,81	40,86	39,97
		7,87		4,20		39,07	
A1	0,9313	15,12	11,96	5,95	6,99	12,89	12,39
		10,98		8,48		14,49	
		9,78		6,54		9,81	
B1	1,7832	21,22	22,57	6,17	6,37	17,04	17,13
		23,51		6,51		17,02	
		23,00		6,45		17,31	
C1	1,1463	19,04	18,77	4,16	4,21	28,51	28,52
		18,52		3,67		28,53	
		18,74		4,81		28,52	
D1	1,0606	13,44	13,35	4,00	4,55	35,35	35,12
		13,45		5,00		35,08	
		13,15		4,64		34,91	
E1	0,9679	12,53	12,56	3,43	3,80	37,97	37,95
		12,10		3,81		37,94	
		13,05		4,17		37,93	
F1	0,8962	9,56	9,38	3,03	3,33	45,68	45,30
		9,22		3,43		45,07	
		9,36		3,54		45,16	
G1	0,8923	8,08	8,02	3,31	3,34	47,31	47,29
		8,13		3,16		47,09	
		7,85		3,56		47,48	
H1	0,7529	7,45	7,61	2,91	2,93	57,80	58,05
		7,41		2,93		57,80	
		7,96		2,95		58,54	
I1	0,6940	6,14	6,23	3,92	3,64	56,09	56,13
		6,33		3,36		56,17	
J1	0,6580	6,02	6,34	3,34	3,20	56,89	56,57
		6,63		3,21		56,33	
		6,36		3,04		56,48	

Tabela 7-2 Kolonska kromatografija lecitina 25°C

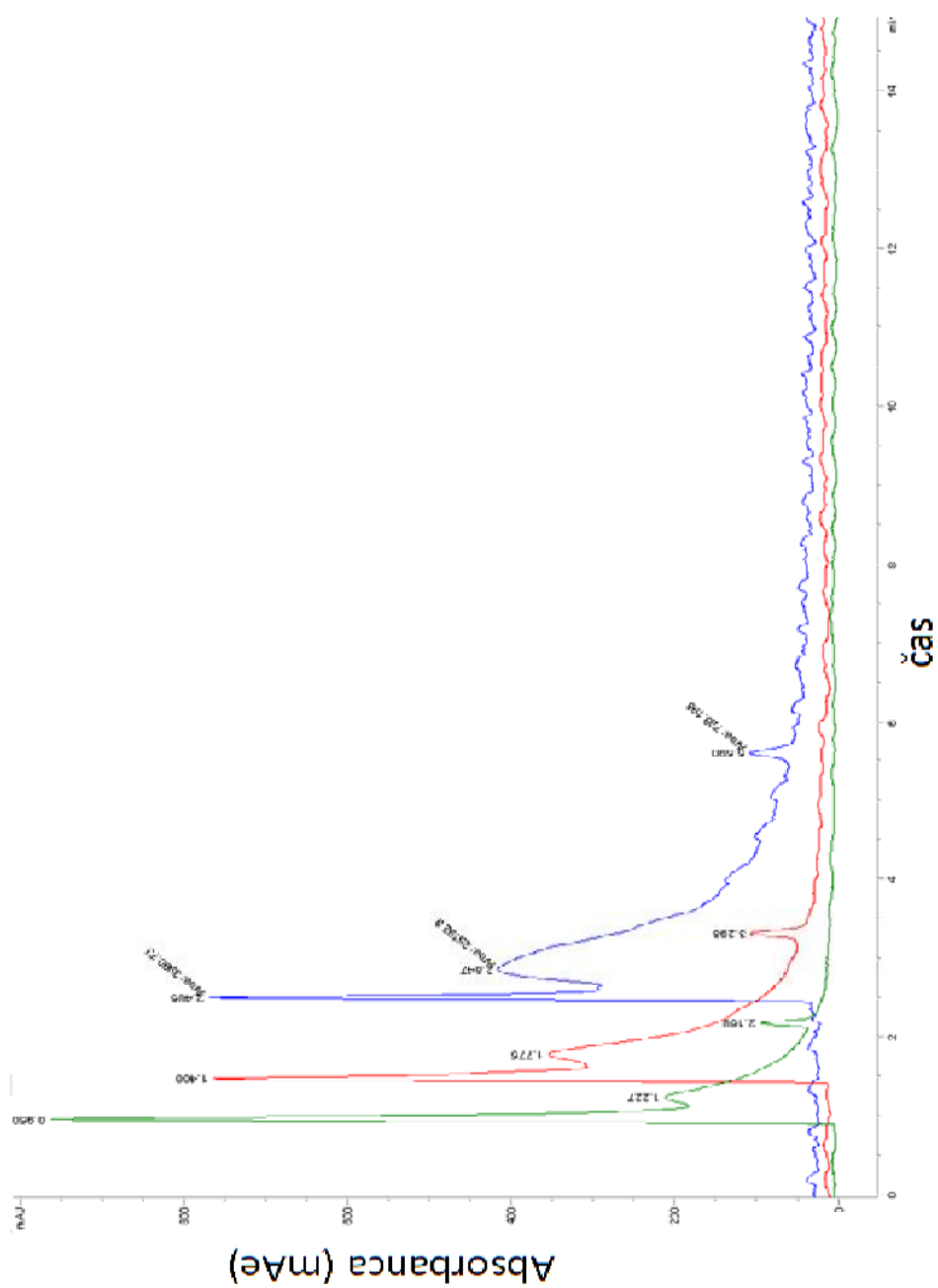
	$m_{\text{ekstrakta}}$	Pe%	Pi%	Pc%		
ekstrakt25	8,958	9,95	-	51,48		
OSTANEK25	30,97	13,94	76,12	14,41		
Vzorec	$m_{\text{frak. V 5 gramih [g]}}$	$m_{\text{fra v cel. ekst. [g]}}$	$m_{\text{frak.}}/m_{\text{ekst.}} (\%)$	Pe%	Pi%	Pc%
ABCD	3,091	5,527	61,7	11,9	-	38,57
EF	0,241	0,431	4,81	17,92	-	41,48
GHI	0,246	0,439	4,9	15,38	-	57,48
JKLMNOP	0,362	0,647	7,23	6,04	-	92,5

Tabela 7-3 Kolonska kromatografija lecitina pri 40°C

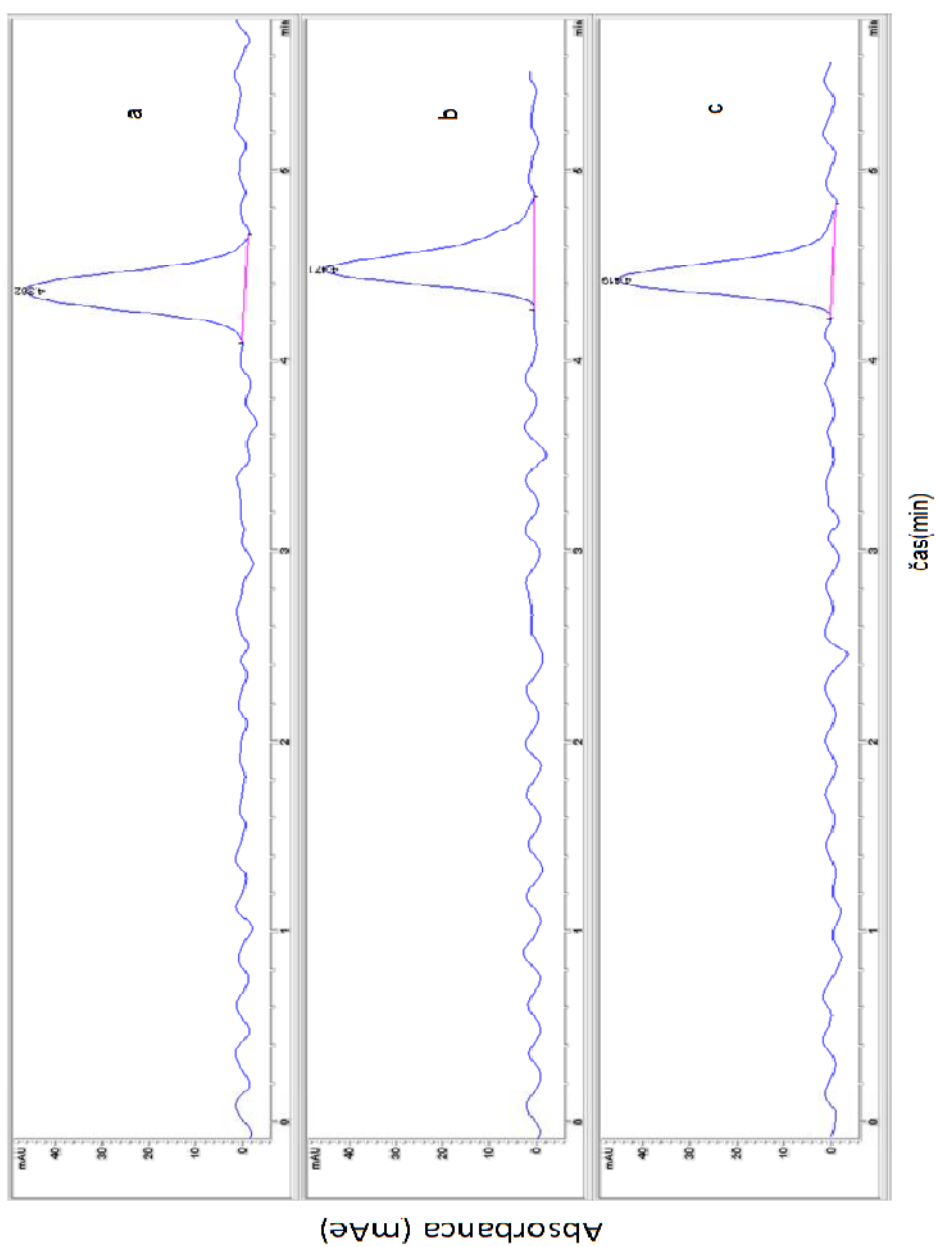
	$m_{\text{frakcije [g]}}$	Pe%	Pi%	Pc%		
EKSTRAKT40	10,593	10,14	3,38	40,09		
OSTANEK40	26,36	13,97	88,47	12,66		
Vzorec	$m_{\text{frak. V 5 gramih [g]}}$	$m_{\text{fra v cel. ekst. [g]}}$	$m_{\text{frak.}}/m_{\text{ekst.}} (\%)$	Pe%	Pi%	Pc%
AB	2,25	4,749	44,83	10,69	2,45	25,23
CD	0,75	1,582	14,931	17,02	3,65	25,43
EF	0,317	0,669	6,319	17,54	0	35,85
GHIJ	0,441	0,931	8,785	8,23	-	54,54
KLMNOP	0,518	1,094	10,323	3,97	-	59,37

Tabela 7-4 Kolonska kromatografija lecitina pri 60°C

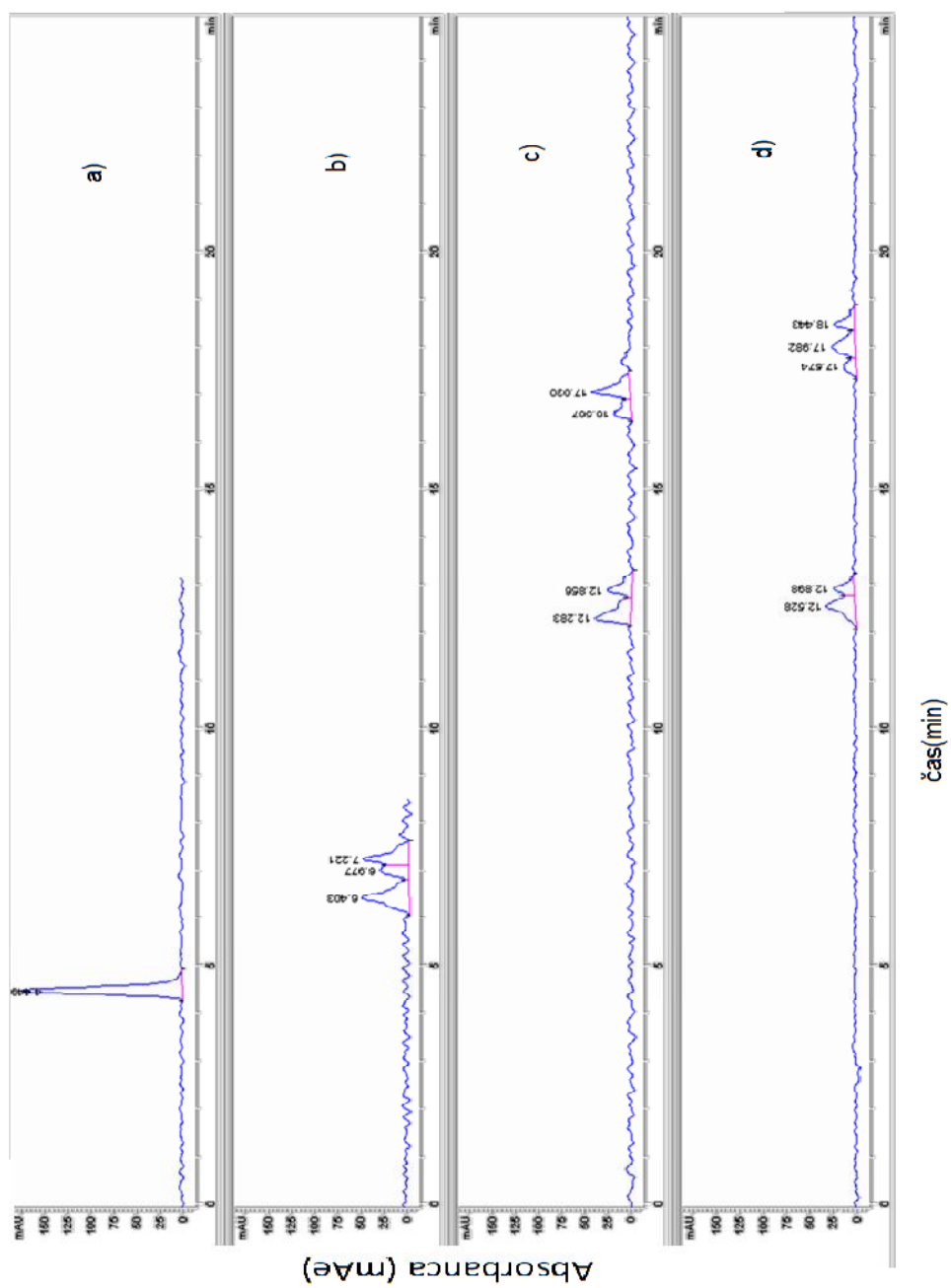
	$m_{\text{ekstrakta}}$	Pe%	Pi%	Pc%		
Ekstrakt60	15,010	11,40	2,48	43,27		
OSTANEK60	31,480	16,69	28,16	13,28		
Vzorec	$m_{\text{frak. V 5 gramih [g]}}$	$m_{\text{fra v cel. ekst. [g]}}$	$m_{\text{frak.}}/m_{\text{ekst.}} (\%)$	Pe%	Pi%	Pc%
ABCD	2,290	6,85	45,62	18,20	3,86	18,96
EF	0,589	1,76	11,73	13,45	1,55	52,85
GHIj	0,693	2,07	13,80	3,99	0,00	73,14
JKLMNOP	0,785	2,35	15,64	0,00	0,00	81,45



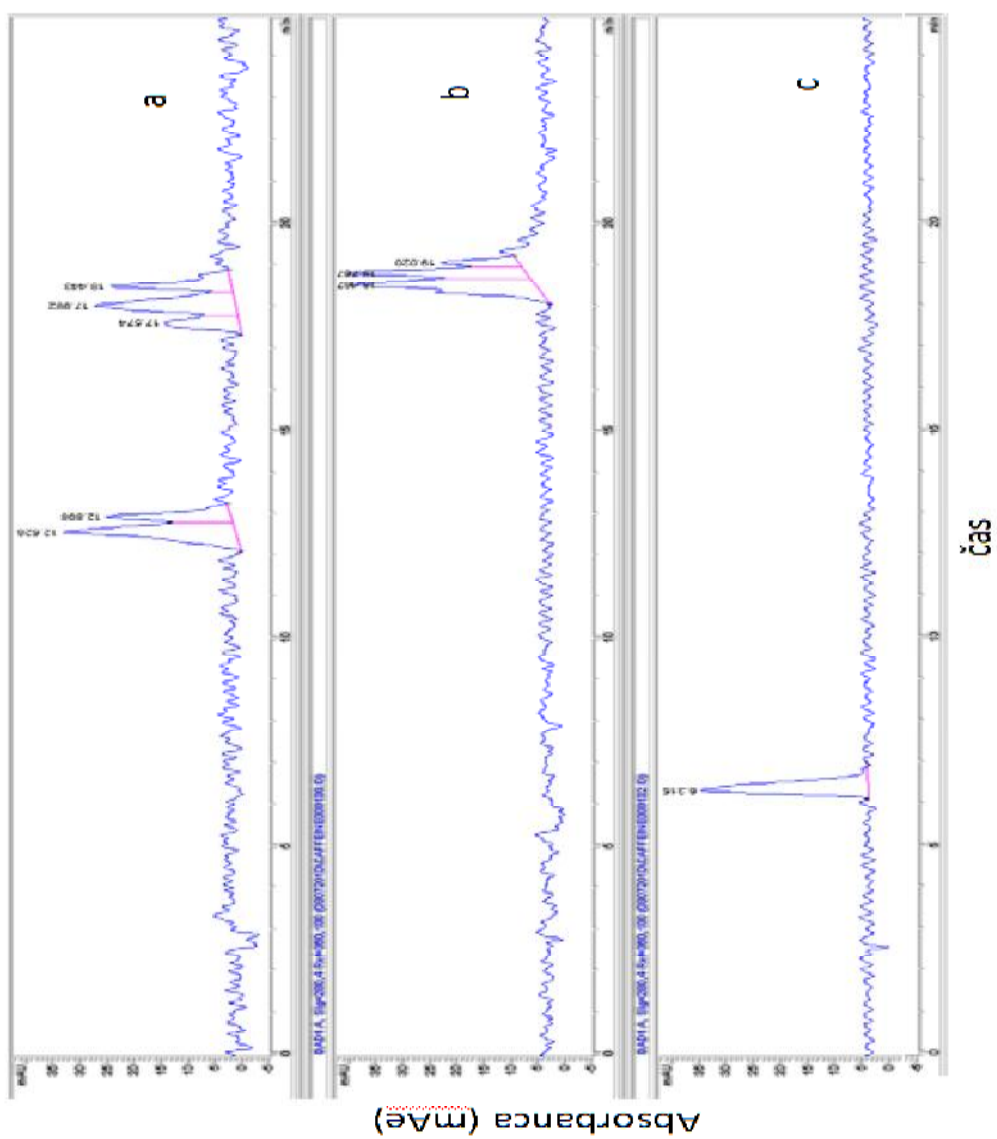
Slika 7-1 SFC: Vpliv pretoka na separacijo benzojske kisline



Slika 7-2 SFC: Vpliv mikro razdelilnega ventila retencijske ase kofeina Ěpove ano



Slika 7-3 SFC: Vpliv pretoka sotopila na separacijo kofeina in tofilina



Slika 7-4 SFC: Kromatogram kofeina in teofilina in i standard - pove ano

8 PIVLJENJEPIS

Ime in priimek:	Miha OMAN
Naslov:	Planinski cesti 40, 2344 Lovrenc na Pohorju
Datum in kraj rojstva:	19.5.1986 v Mariboru
Državljanstvo:	Republike Slovenije
Osnovna zola:	OŠ Fram 1993-2001
Gimnazija:	III. gimnazija Maribor 2001-2005
Družina in socialno stanje:	<ul style="list-style-type: none"> • Oče Jože, mati Terezija, brata David in Rok ter sestra Aleksandra • Oče Jože in mati Terezija sta upokojena; pred tem je oče delal v ribogojstvu, mati pa v proizvodnji • Brata sta oba zaposlena • Sestra dobiva nego v zdravstveno varstveni instituciji
Delovne izkušnje:	Različno delo preko študentskih servisov, vzgojitelj pri ZPM Maribor
Podatki o študiju:	Vpis na FKKT: 2005
	Smer študija: kemijska tehnologija
	Program: univerzitetni, redni