

Primjena ekstrakcijskih tehnika u izolaciji medicinski aktivnih tvari iz biljaka

Prišćan, Dominik

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:055234>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Dominik Prišćan

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Primjena ekstrakcijskih tehnika u izolaciji medicinski aktivnih tvari iz biljaka

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zagreb, 2021.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

6. svibnja 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

10. rujna 2021.

Mentor rada: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD	1
§ 2. PRIMJENA EKSTRAKCIJSKIH TEHNIKA ZA IZOLACIJU MEDICINSKI AKTIVNIH TVARI IZ BILJAKA.....	3
2.1. Ekstrakcija	3
2.2. Priprava ljekovitih biljaka prije ekstrakcije	3
2.2.1. Sušenje	4
2.2.2. Usitnjavanje biljnog materijala	4
2.2.3. Filtracija	5
2.3. Važni parametri pri ekstrakciji medicinski aktivnih tvari iz biljaka	5
2.4. Ekstrakcijske tehnike.....	6
2.4.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće	6
2.4.2. Maceracija.....	7
2.4.3. Maceracija različitih dijelova biljke	10
2.4.4. Ekstrakcija u više koraka	10
2.4.5. Primjena maceracije u industriji	11
2.4.6. Perkolacija	14
2.4.7. Metode perkolacije.....	14
2.4.8. Vrste perkolatora	15
2.5. Ekstrakcija superkritičnim fluidom	18
2.5.1. Primjena ekstrakcije u superkritičnim uvjetima	20
2.6. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.....	20
2.6.1. Načelo ekstrakcije potpomognuta mikrovalovima	21
2.6.2. Ekstrakcijski spremnici	22
2.7. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	24
2.7.1. Ekstrakcijski mehanizmi izazvani ultrazvukom.....	24
2.7.2. Postupak ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.....	25
2.7.3. Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.....	26
2.8. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi	28
2.9. Zaključak	30
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXXII

§ Sažetak

Ljekovite biljke koriste se kao tradicionalni, narodni i prirodni lijekovi, u modernoj medicini, te kao dodaci prehrani. Industrijska obrada ljekovitih biljaka započinje ekstrakcijom biološki aktivnih tvari iz biljka pri čemu se koriste različite metode. Cilj ekstrakcije je koncentriranje aktivnih tvari i odvajanje od onih koje su manje važne za ljekovito djelovanje. Najčešće metode ekstrakcije uključuju maceraciju, perkolaciju, dekokciju, infuziju, ekstrakciju superkritičnim fluidom, ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima i/ili ultrazvukom i mikroekstrakciju na čvrstoj ili tekućoj fazi.

Ekstrakcija je najčešće prvi korak u izolaciji biološki aktivnih tvari iz različitih realnih uzoraka. U ovom radu dan je pregled najčešće korištenih ekstrakcijskih tehnika za izolaciju biološki aktivnih tvari iz medicinskih biljaka.

§ 1. UVOD

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) pojam ljekovite biljke odnosi se na biljke koje imaju ljekovita svojstva, a jedan ili više dijelova sadrži biološki aktivnu tvar koja se može koristiti u medicinske svrhe ili za kemijsko-farmaceutske sinteze.¹ Fitoterapija je liječenje ljekovitim biljem. Od 350 tisuća biljnih vrsta, čak se 12 tisuća primjenjuje u fitoterapiji. Veliki broj lijekova koji se danas koriste u medicini neposredno ili u djelomično promijenjenom obliku potječu od ljekovitih biljaka. Lijekovi dobiveni iz biljaka koriste se od drevnih vremena za liječenje i prevenciju određenih bolesti, njihova upotreba je najstariji oblik medicine osobito u Kini, Egiptu, Grčkoj i Indiji.²⁻⁴

Osim u medicinske i farmaceutske svrhe, veliki broj različitih vrsta biljaka koristi se i u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji zbog svojih aromatičnih svojstava.⁵ Aromatične biljke sadrže jednu ili više biološki aktivnih tvari osebujnog mirisa ili okusa koje se iskorištavaju za kao mirisi, kozmetički proizvodi, napitci i arome za prehrambene namirnice. Upotrebljavaju se cijele biljke ili njihovi dijelovi za liječenje bolesti i održavanje dobrog zdravlja. Aktivne biološke tvari ljekovite biljke stvaraju specifičnim biljnim sintezama, a izoliraju se iz biljke ili iz njenih dijelova biljke što su sjeme, korijen, list, plod, kora i cvijeće. Jedna od prednosti ljekovitih biljaka je sinergijsko djelovanje tvari iz biljke pri kojem one međusobno djeluju jedna na drugu što dovodi do pozitivnih i smanjenja negativnih učinaka na organizam. Primjerice, neke tvari imaju stimulirajući, a druge umirujući učinak na organizam. Primarne aktivne biološke tvari, kao što su proteini i šećeri, potrebne su biljci za rast i reprodukciju. Sekundarne tvari ne utječu izravno na razvoj biljke, od kojih su najvažniji alkaloidi, glikozidi, organske kiseline, eterična ulja, biljne ljepljive sluzi, gume, tanini, smole i vitamini.

Za ljekovitost biljke potrebno je zdravu biljku ubrati u godišnjem dobu kada sadrži najviše ljekovitih tvari, na nezagađenom području, bez zagađenog tla ili zraka. Za dobivanje ljekovitih pripravaka iz biljaka potrebno je primijeniti ispravni postupak sušenja i skladištenja. Ekološka proizvodnja ljekovitih i aromatičnih biljaka određena je Zakonom o ekološkoj proizvodnji poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda (NN 12/01. i NN 79/07.) i Pravilnikom o ekološkoj proizvodnji u uzgoju biljaka i proizvodnji biljnih proizvoda (NN 1/13. i NN 10/07.).

Biljni se materijal može prerađivati na različite načine ovisno o vrsti biljke i daljnjoj primjeni, odnosno ovisno o tome što je ciljani konačni proizvod.⁶ Jedan od načina prerade je sušenjem, no koriste se i za proizvodnju biljnih ekstrakata, izolaciju eteričnih ulja i sl.

Ekstrakcija je najčešće prvi korak u izolaciji biološki aktivnih tvari iz biljaka. Cilj ekstrakcije je koncentriranje biološki aktivnih tvari i odvajanje od onih koje se smatraju balastnima ili manje važnim za ljekovito djelovanje. Svrha je ovog rada dati pregled najčešće korištenih ekstrakcijskih tehnika u izolaciji aktivnih tvari iz biljaka koje se zatim koriste proizvodnji lijekova te u kozmetičke ili prehrambene svrhe.

§ 2. PRIMJENA EKSTRAKCIJSKIH TEHNIKA ZA IZOLACIJU MEDICINSKI AKTIVNIH TVARI IZ BILJAKA

2.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija je prijenos tvari iz krute ili tekuće faze u drugu fazu, u kojoj je tvar topljivija nego u polaznoj fazi. Tvar mora biti bolje topljiva u drugoj fazi, najčešće otapalu, nego u uzorku iz kojeg se izdvaja, pa se odvajanje tvari prvenstveno temelji na različitoj topljivosti u pojedinim fazama. U ekstrakciji tekuće-tekuće dolazi do raspodjele tvari između dvije tekuće faze (otapala) koje se ne miješaju, a u ekstrakciji čvrsto-tekuće tvar iz čvrste faze prelazi u tekuću fazu ili obrnuto. Pri ekstrakciji čvrsto-tekuće odvajanje analita od uzorka temelji se najčešće na selektivnom vezanju analita (adsorpcijom ili absorpcijom) na kruti sorbens ili se iz krutog uzorka analit odvaja u tekuću fazu.

Odvajanje tvari iz uzorka može biti potpuno ili djelomično, a učinkovitost njihove ekstrakcije najviše ovisi o polarnosti otapala ili smjese otapala. Organski se spojevi uglavnom bolje otapaju u organskim otapalima nego u vodi pa se iz vodenih otopina ili suspenzija tvari učinkovito ekstrahiraju u organsku fazu.

Izbor tehnike ekstrakcije ovisi o strukturi, polarnosti, topljivosti i drugim svojstvima tvari koje se želi odvojiti. Nove ekstrakcije tehnike razvijaju se iz klasičnih tehnika ekstrakcije u svrhu povećanja produktivnosti, ubrzavanja i olakšavanja njihovog korištenja te smanjenja cijene i pojednostavljenja postupka, koji bi trebalo dati kvantitativne analitičke rezultate bez gubitaka ili razgradnje analita. Konačno, odvojena tvar u ekstraktu trebala bi biti dovoljno koncentrirana da se izravno može mjeriti instrumentima analitičkim metodama bez potrebe za dodatnim koncentriranjem.^{7,8}

2.2. Priprava ljekovitih biljaka prije ekstrakcije

Prije ekstrakcije većine aktivnih tvari iz biljnog materijala potrebna je prethodna obrada i priprava uzorka, često od nekoliko koraka. Većina realnih uzoraka zahtjeva dodatnu obradu (npr. usitnjavanje, sušenje, drobljenje, dispergiranje, sijanje...), a svaka dodatna obrada utječe

na učinkovitost ekstrakcije. Kako bi ekstrahirali tvari iz biljnog materijala potrebno je provesti sljedeće korake:

- 1) sušenje,
- 2) usitnjavanje biljnog materijala,
- 3) ekstrakcija,
- 4) filtracija.

2.2.1. *Sušenje*

Voda sprječava kontakt analita i nepolarnog organskog otapala u ekstrakciji tekuće-tekuće ili vezanje analita na nepolarni sorbens u ekstrakciji čvrsto-tekuće pa je većinu uzoraka prije ekstrakcije potrebno osušiti. Za sušenje biljaka najčešće se koristi sušenje pri sobnoj temperaturi na suhom i tamnom mjestu, no ovisno o količini i vrsti biljke te njezinoj daljnjoj upotrebi koriste se i različiti uređaji za sušenje zrakom. Navedeni uređaji omogućuju sušenje uzorka na različitim temperaturama pri čemu treba osobito paziti na hlapljive analite.⁹ Sušenje raspršivanjem jedna je od najstarijih metoda sušenja, a osim koristi se i mikrovalno zračenje ili postupak liofilizacije (sušenje uzorka u zamrznutom stanju). Sušenje se može provesti i dodatkom različitih sredstva za sušenje, a njihov izbor ovisi o vrsti uzorka. Sredstva za sušenje su anorganske bezvodne soli poput natrijeva sulfata, koje imaju veliki afinitet za vezanje vode.

Pri sušenju uz raspršivanje filtrat se pomoću visokotlačne pumpe pri određenoj temperaturi suši, dok se ne dobije praškasti uzorak. Veličina čestica uzorka može se prilagoditi mijenjanjem temperature i tlaka pumpe. Suhi prah se često miješa s prikladnim razrjeđivačima i pomoćnim tvarima pri čemu se dobije homogeni prah koji se može koristiti za daljnju uporabu.

2.2.2. *Usitnjavanje biljnog materijala*

Suhi biljni materijal se drobi i usitjava do najmanje veličine čestica u mlinu, drobilici (mehaničkoj ili električnoj) ili tarioniku. Svrha usitnjavanja je razoriti organe, tkiva i staničnu strukturu biljke kako bi otapalo lakše došlo do aktivnih tvari jer se ujedno povećava površina čestica čime se povećava prijenos aktivnih tvari u otapalo. Čestice dobivenog biljnog praha ne smiju biti premale jer mogu uzrokovati probleme u daljnjoj ekstrakciji i filtraciji. Stoga se provodi i prosijavanje uzorka, najčešće suhim ili mokrim postupkom pomoću sita različitih dimenzija otvora ili dispergiranje uzorka, obično pomoću inertnog pijeska.^{10,11}

2.2.3. Filtracija

Filtracija je postupak odvajanja krute od tekuće faze neke heterogene smjese. Za filtraciju se koriste različiti postupci ovisno o volumenu filtrata i veličini čestica taloga te svrsi filtriranja - odvaja li se željena kruta faza (produkt) ili se iz otopine žele ukloniti neke krute nečistoće ili sredstvo za sušenje (npr. magnezijev sulfat, MgSO_4). Najjednostavniji oblik je filtriranje kroz lijevak u kojeg je umetnut filtar papir. Postoje i složeniji načini filtriranja, primjerice uz pomoć vakuuma u Büchnerovom lijevku koji je gumenim prstenom pričvršćen na bocu (ili epruvetu) za odsisavanje (pod sniženim pritiskom). Za male količine krutog produkta umjesto Büchnerova lijevka obično se upotrebljava Hirschov lijevak. Za filtriranje pri sniženom tlaku upotrebljavaju se stakleni i lijevci s poroznim dnom („sinter” lijevci).

2.3. Važni parametri pri ekstrakciji medicinski aktivnih tvari iz biljaka

- 1) Prije ekstrakcije potrebno je provjeriti nalazi li se aktivna tvar u biljnom materijalu i odrediti njezina fizikalna i kemijska svojstva:
 - a) Ako je aktivna tvar termički nestabilna koriste se ekstrakcijske tehnike poput hladne maceracije, perkolacije, ekstrakcije superkritičnim fluidom, ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi. Za termički stabilne tvari koristi se Soxhletova ekstrakcija, dekokcija i ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima.
 - b) Potrebna je dodatna zaštita kada se aktivne tvari, poput flavonoida i fenil propanoida, razgrađuju stajanjem u organskom otapalu. Primjerice, neki glikozidi se raspadaju pri kontinuiranom izlaganju previsokim temperaturama ili odmah pri previsokoj temperaturi.
- 2) Za kontrolu kvalitete važno je zabilježiti starost biljke te vrijeme, godišnje doba i mjesto sakupljanja biljke.
- 3) Uvjeti sušenja biljnog materijala ovise o prirodi sastojaka, a biljni materijal se najčešće suši toplim ili hladnim strujanjem zraka. Pri sušenju ekstrakta treba osigurati uvjete pri kojima su aktivne tvari stabilne, a često se koristi sušenje pod sniženim tlakom. Za pripravu ekstrakta mogu se koristiti i svježije biljke, no ukoliko se koriste takve biljke potrebno je odrediti udio vode kako bi se dodao optimalan volumen otapala.
- 4) Metoda usitnjavanja biljnog materijala uvelike ovisi o odabranoj ekstrakcijskoj tehnici. U pravilu se izbjegavaju metode usitnjavanja u kojima se generira toplina. Usitnjavanjem

biljnog materijala dobije se prah raznih veličina čestica. Prije ekstrakcije potrebno je prah propustiti kroz sito kako bi se dobio biljni prah podjednake veličine čestica.

- 5) Važno je optimizirati vrijeme ekstrakcije: kada je vrijeme ekstrakcije prekratko ekstrakcija nije potpuna, a kada je predugo dolazi do ekstrakcije neželjenih tvari. Broj potrebnih ekstrakcija za potpunu ekstrakciju željenih tvari jednako je važan kao vrijeme svake ekstrakcije.
- 6) Za praćenje kvalitete pojedinih serija ekstrakta provode se analitički postupci poput tankoslojne kromatografije i tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC). Potrebno je kontrolirati kvalitetu i čistoću otapala.¹⁰

2.4. Ekstrakcijske tehnike

Biljni ekstrakti dobivaju se različitim postupcima ekstrakcije iz svježeg ili sušenog bilja, ili dijelova biljaka kao što su: lišće, cvjetovi, plodovi, sjemenke, korijen i kora. Cilj ekstrakcije je koncentriranje biološki aktivnih tvari i odvajanje od balastnih ili manje važnim za ljekovito djelovanje. U većini ekstrakcijskih postupaka biljke su u kontaktu s otapalom (najčešće voda, etanol ili smjesa etanola i vode, ulja i sl.), a postupak se provodi u odgovarajućem spremniku ili uređaju (ekstraktor). Nakon određenog vremena tekući ekstrakt se odvaja od biljnog ostatka koji se može dalje sušiti na odgovarajući način pri čemu se dobiva suhi ekstrakt. Ekstrakti se obično dijele prema uporabi, tehnici, odnosno vrsti otapala (npr. vodeni ekstrakti, tinkture, maceracija, dekocija...) i prema konzistenciji (tekući i tinkture, polučvrsti (meki) i čvrsti ili suhi ekstrakti.

2.4.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Pri ekstrakciji tekuće-tekuće, tvar se raspodjeli između dviju tekućih faza koje se ne miješaju, od kojih je jedna obično vodena, a druga organsko otapalo. Omjer koncentracija (množinskih ili masenih) tvari u fazama stalan je i dan je Nernstovim zakonom razdijeljena:

$$K = c_1 / c_2$$

pri čemu je K koeficijent razdijeljena ili distribucije (konstantan pri određenoj temperaturi), a c_1 , c_2 su koncentracije tvari u dvjema fazama (otapalima).

Nernstov zakon vrijedi samo pri idealnim uvjetima, za niske koncentracije i kad otopljena tvar u obje faze ima jednak stupanj disocijacije. Osim toga, pri izboru organskog otapala za ekstrakciju treba voditi računa da je vrijednost koeficijenta razdijeljena treba biti što veća,

otapalo kemijski inertno odnosno da ne reagira s tvarima koje se ekstrahiraju te da ima što veću razliku u gustoći od polazne faze, a prednost se uvijek daje otapalima koja su jeftinija, manje štetna i opasna.

2.4.2. Maceracija

Postupak maceracije je najstariji način dobivanja ekstrakata tehnikom ekstrakcije čvrsto-tekuće. Provođa se tako da se usitnjena biljka, njezini dijelovi ili grubo usitnjeni biljni prah stave u začepljeni spremnik s otapalom. Smjesa se ostavi stajati na sobnoj temperaturi, najčešće sedam dana uz često miješanje, zatim se profiltrira te se talog preša. S filtratom se pomiješa i tekućina istisnuta iz taloga te se nakon stajanja ponovno profiltrira. Tijekom maceracije otapalo sporo difundira kroz staničnu stijenku i otapa tvari unutar stanica pa se maceracija često provodi uz miješanje ili blago zagrijavanje. Miješanje ubrzava difuziju otapala i pritom raspršuje koncentriranije dijelove otopine uz biljku te dovodi svježije otapalo na površinu biljke. Zatvoreni spremnik koristi se kako bi se spriječilo isparavanje otapala i hlapljivih produkata.

Najpoznatiji i najčešće pripravljeni macerati su od smilja, nevena, kantariona i lavande, a mogu se macerirati i stolisnik, kamilica, kadulja, matičnjak, ružmarin, bršljan, mrkva, lipa, orah, tratinčica... U tradicionalnoj fitoterapiji za pripravu čajeva, maceracija hladnom vodom preko noći koristila se za biljke kao što su: list breze, maline ili koprive, preslicu, medvjetu i slične biljke. Biljka se potopi u vodu i ostavi stajati od 30 minuta do dva sata. To je uobičajen postupak za ekstrakte biljaka koje sadrže tvari koje se lako otapaju u vodi, a kojima bi povišena temperatura naškodila. Korišten bijelog sljeza (*Althaea officinalis, radix*) koristi se za dobivanje lijeka protiv infekcije grla, pluća i nosa te je najtipičniji primjer hladne maceracije. On sadrži sluzi koje se lako otapaju u vodi, a koje se raspadaju na povišenoj temperaturi od 65 °C. Zato se ekstrakt bijelog sljeza nikada ne priprema u vrućoj vodi. Macerati od biljaka koje sadrže termički nestabilne tvari pripravljaju se ekstrakcijom biljaka u mlakoj vodi. Primjeri takvih macerata su osim iz korijena bijelog sljeza i macerat iz sjemenki lana, biljke također poznate po aktivnim tvarima - sluzima osjetljivim na toplinu. Treba napomenuti da se pri maceraciji hladnom i toplom vodom ne uništavaju mikroorganizmi, a njihov broj u vodenom mediju može i porasti. Stoga se je potrebno pridržavati se smjernica za pripravu biljnih čajeva Europske farmakopeje za čajeve koji se ekstrahiraju bez zagrijavanja (Mikrobiološka kvaliteta biljnih medicinskih proizvoda za oralnu upotrebu 04/2010:50108).

Iako su vodeni ekstrakti najstariji ljekoviti oblici koji se primjenjuju u liječenju bolesti dišnog, probavnog ili mokraćnog sustava, imaju svoja ograničenja. Poznato je kako neke biljke sadrže aktivne tvari koje se pri sobnoj temperaturi ne mogu ekstrahirati vodom, a primjeri za to su list ginka (*Ginkgo biloba*) i plod sikavice (*Silybum marianum*) čije se aktivne tvari ne mogu u dovoljnoj količini otopiti u vodi, pa vodeni ekstrakti navedenih biljaka nemaju ljekovito djelovanje.^{10,12}

Primjer maceracije etanolom je izolacija fenola i antocijanina iz aronije, pri čemu je korišten 50% etanol, a omjer krutine i otapala je 1:20 (w/v), a veličina čestica je 0,75 mm.¹²

Maceracija ljekovitih biljaka može se provesti pri povišenoj temperaturi čime se pospješuje topljivost tvari u otapalu kao što je to primjerice u pripravi infuzija (čajeva ili oparaka). Infuzije se spravljaaju najčešće od listova (npr. kadulja, breza, kopriva...), cvjetova (npr. kamilica) te plodova (npr. crveni i bijeli glog, šipak).

Najjednostavniji način priprave čaja koji svakodnevno koristimo je da biljni materijal prelijemo vrućom vodom i ostavimo stajati 5 – 15 minuta. Infuzije se često pripremaju tako da se grubo usitnjena biljka prelije s hladnom vodom i ostavi stajati u zatvorenom spremniku petnaestak minuta. Zatim se u spremnik doda kipuća voda, spremnik se ponovno zatvori i ostavi stajati 30 minuta. Prije upotrebe smjesa se filtrira.

Dekokcija je vrsta maceracije, metoda pogodna za ekstrakciju termički stabilnih tvari topljivih u vodi iz tvrdih dijelova biljke, poput korijena i kore. Spravljaaju se kuhanjem biljke u kipućoj vodi pri čemu se biljka zagrijava s vodom određeno vrijeme, obično 5-15 minuta, a zatim hladi, cijedi ili filtrira. Početni omjer biljke i vode je određen (npr. 1:4 ili 1:16 w/v), a zagrijavanje se zaustavlja kada je volumen vode četvrtina početnog. Ekstrakt se zatim filtrira i koristi kao takav ili dalje obrađuje. Primjeri dekokta ili uvaraka su ekstrakti dobiveni kuhanjem korijena čička, koprive, poljske preslice ili maslačka te kore krkavine.^{10,12}

Kako bi se povećao prinos željenih tvari maceracija se može ponoviti više puta. Dvostruka maceracija se koristi u slučaju u kojem je željena tvar jako vrijedna ili jako hlapljiva. U slučaju kada se talog ne može prešati koristi se trostruka maceracija. Budući da je ukupan volumen otapala velik, filtrati druge i treće maceracije se obično zagrijavaju kako bi višak otapala ispario, a nakon zagrijavanja se pomiješaju s filtratom iz prve maceracije.

Za pripravu ekstrakta mogu se koristiti i svježe biljke što ponekad nije najjednostavniji postupak jer ovisi o udjelu biljnog soka u biljci. Pri tome je najvažniji korak određivanje udjela vode u biljci kako bi se dodao optimalan udio otapala kao što je primjerice volumen etanola za

pripravu tinktura. To se najčešće provodi gravimetrijski, sušenjem 2,00-5,00 g svježeg biljnog materijala pri 105 °C kroz 2 sata. Maceracija se odvija uglavnom tijekom deset dana, no u pojedinim slučajevima koristi se maceracija do 60 dana ili vrlo dugotrajna maceracija od 180 i više dana.

Tinkture su odavnina vrlo popularan ljekoviti oblik biljaka. Kao ekstrakcijsko sredstvo koristi se alkohol (etanol), danas uglavnom pročišćeni etanol, a nekoć su se puno koristile rakije i vina. Temeljni postupak je potapanje točno određene količine ljekovite biljke, najčešće suhe, u točno određeni volumen alkohola određenog postotka. Homeopatske tinkture se pripremaju prema smjernicama homeopatske farmakopeje *Homöopathischen Arzneibuch* (HAB) čiji je sustav preuzela i Europska farmakopeja (01/2011:2371).¹³

Za svaku biljnu vrstu postoje upute za pripremu tinkture. Primjerice za pripremu tinkture iz cvijeta bazge (*Sambucus nigra*), hmelj (*Humulus lupulus*) i gorki pelin (*Artemisia absythium*) koristi se postupak iz homeopatske farmakopeje HAB 3A 62, za list breze (*Betula sp.*) HAB 3C 30, a za plod komorača (*Foeniculum vulgare*), korijandera (*Coriandrum sativum*) i kima (*Carum carvi*) HAB 4A 86.

Ljekovita svojstva korijena anđelike (*Angelicae radix*) protiv želučanih tegoba poznata su još u srednjovjekovnoj Europi, a koristila su se za pripravu napitka protiv svih bolesti – theriaksa. Recept za theriaksa zapisao je liječnik Eucator (111. - 63. g. pr. Kr.), a pripremao se kuhanjem korijena anđelike, maka, šafrana, cimeta, odoljena, kardamoma i rujevine u crnom vinu. Gorki likeri sadrže macerate arnike – brđanke (*Arnicae radix*), iđirota (*Calami rhizoma*) ili ljupčaca (*Levestici radix*) koji se koristi u većini alpskih likera. Vodeni macerat mediteranske biljke sladić (*Liquiritae radix*) koristi se kao sirup za iskašljavanje, a alkoholni macerat za pripravu gorkih likera i travarica. Za proizvodnju gorkih likera koriste se i neke druge ljekovite biljke poput ginsenga, šafrana, petoprsta i đumbira.

Uljni macerat od ljekovitog bilja koristi se kao ljekoviti pripravak ili začín. Koristi se cijela ili dio ljekovite biljke koja se nakon pranja i sušenja uroni u ulje po mogućnosti hladno prešano nerafinirano biljno ulje, bilo neko od jeftinijih (suncokretovo, maslinovo, sojino, ulje repice, pšeničnih klica, koštica marelice, bademovo, kokosovo) ili skupljih (ulje jojobe, riže ili makadamije, shea maslac-karite), ali može i svinjska mast. Ulje u koje se potapa bilje naziva se bazno ulje.

U praksi se najčešće koristi 10 % biljne mase u odnosu na količinu biljnog ulja. Poznati su ljekoviti uljni macerati od nevena, koji se nanose na kožu ili sluznicu, a u prehrambene svrhe

obično se maceriraju začinske biljke (ružmarin, paprika, mažuran). Uljni macerati se mogu izraditi hladnim i toplim postupkom. Hladni postupak maceracije sastoji se od namakanja biljke u ulju na tamnom mjestu 4-6 tjedana, dok se topli ili brzi postupak provodi namakanjem biljke u ulju prvo 1 sat u parnoj kupelji, a zatim se ostavi 24 sata na sobnoj temperaturi. Nakon maceracije se ulje procijedi i prema potrebi filtrira te čuva u tamnim staklenim posudama.

2.4.3. Maceracija različitih dijelova biljke

Dijelovi biljke koji se koriste za proizvodnju lijekova dijele se na organizirane i neorganizirane. Kod organiziranih dijelova biljke stanična struktura je dobro definirana kao kod kore i korijena, dok kod neorganiziranih dijelova biljaka nema biljnih stanica kao što su guma i smola. Maceracija za organizirane i neorganizirane dijelove biljke se razlikuje (tablica 1).

Tablica 1. Četiri koraka u maceraciji za organizirane i neorganizirane dijelove biljke

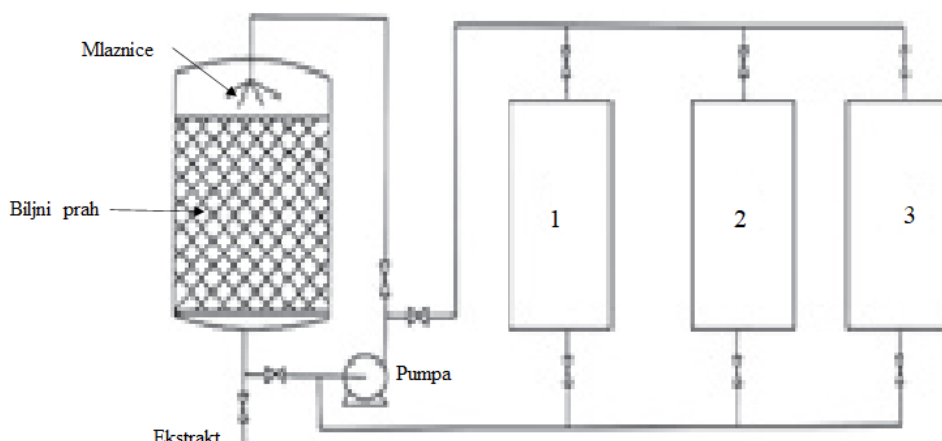
MACERACIJA	
Organizirani dijelovi biljke	Neorganizirani dijelovi biljke
1) Dio biljke + cijeli volumen otapala	1) Dio biljke + četiri petine volumena otapala
2) Miješati često 7 dana	2) Miješati često nakon 24 sata
3) Filtrirati tekućinu i prešati talog	3) Dekantirati tekućinu, talog se ne preša
4) Pomiješati tekućine i filtrirati	4) Filtrirati tekućinu i dodati ostatak otapala

Kod organiziranih dijelova biljke filtratu nakon prve filtracije ne dodaje se otapalo, a talog se preša kako bi se istisnuo sav ekstrakt zaostao u talogu. Dodavanjem otapala udio tvari bi zaostao u talogu.

Kod neorganiziranih dijelova biljke talog se ne preša jer su željene tvari već otopljene u filtratu, a preostali talog je gumen i muljevit. Tijekom posljednje filtracije dodaje se otapalo kako bi se isprao talog čime se odvaja mali dio željenih tvari koje su zaostale na talogu.¹⁰

2.4.4. Ekstrakcija u više koraka

Još jedan način povećanja učinkovitosti ekstrakcije je ekstrakcija u više koraka u kojoj se biljka ekstrahira više puta svježim otapalom (slika 1).



Slika 1. Ekstrakcija u više koraka. Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 10

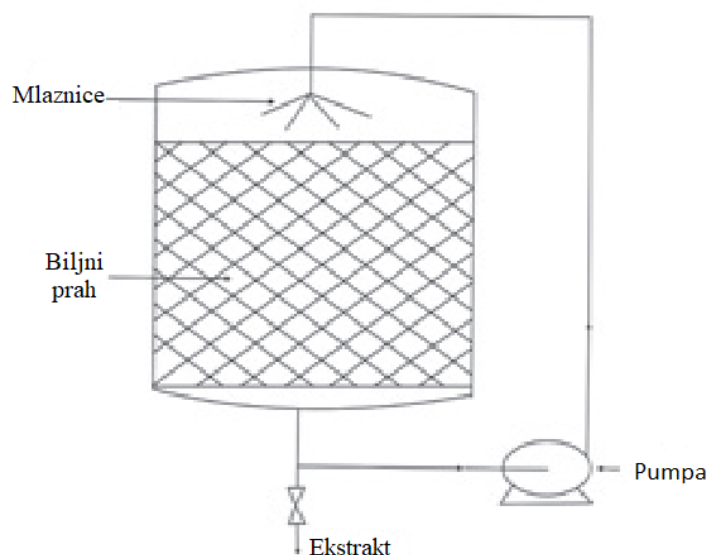
Aparatura potrebna za ovu vrstu ekstrakcije je ekstraktor, pumpa, mlaznice i nekoliko spremnika u koje se sakuplja ekstrakt. Ekstraktor je spojen cijevima na spremnike tako da svaki od spremnika može zasebno dovoditi tekućinu u ekstraktor. Biljka se ekstrahira onoliko puta koliko ima spremnika te se broj ekstrakcija povećava dovođenjem još spremnika u aparaturu.

Postupak za maceraciju u tri koraka je: ekstraktor se napuni sa grubim prahom biljke i otapalom. Ekstrakt se odvodi u spremnik 1, a ekstraktor se nadopunjuje s otapalom. Ekstrakt se odvodi u spremnik 2, a ekstraktor se nadopunjuje s otapalom. Ekstrakt se zatim odvodi u spremnik 3. Preostali talog u ekstraktoru se izvadi i ekstraktor se puni svježim prahom biljke. Otopina iz spremnika 1 se dovodi u ekstraktor. Ekstrakt se odvodi na uparavanje, a otopina iz spremnika 2 se dovodi u ekstraktor. Ekstrakt se odvodi u spremnik 1, a otopina iz spremnika 3 se dovodi u ekstraktor. Ekstrakt se odvodi do spremnika 2 te se u ekstraktor dodaje svježe otapalo. Ekstrakt se odvodi u spremnik 3, a preostali talog se vadi iz ekstraktora. U ekstraktor se dodaje prah biljke te se postupak ponavlja.¹⁰

2.4.5. Primjena maceracije u industriji

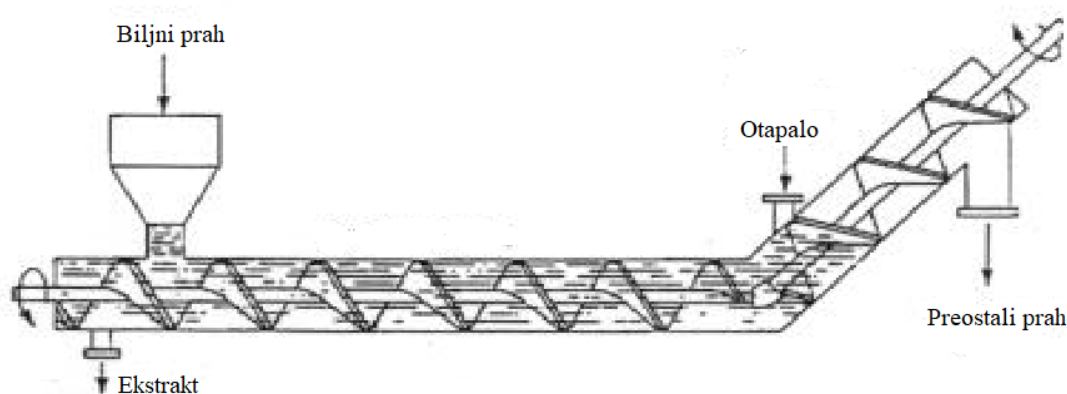
U industrijskoj primjeni maceracije za dobivanje ekstrakta iz medicinskih biljaka volumen korištenog otapala je puno veći, a važan je način miješanja otopine uzorka. Još jedan parametar koji utječe na i primjenu maceracije u industriji je ekonomičnost. Cilj je povećati učinkovitost ekstrakcije korištenjem što manje otapala čime se smanjuje vrijeme uparavanja viška otapala i povećava prinos termički nestabilnih tvari.

Učinkovitost ekstrakcije se može povećati aparaturom kao što je kružni ekstraktor u kojoj otapalo kruži kroz biljku (slika 2). Otapalo se pumpa s dna spremnika i vodi do mlaznica na vrhu spremnika. Protok otapala smanjuje zadržavanje taloga na stijenkama i povećava ujednačenost otopine.



Slika 2. Kružni ekstraktor. Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 10

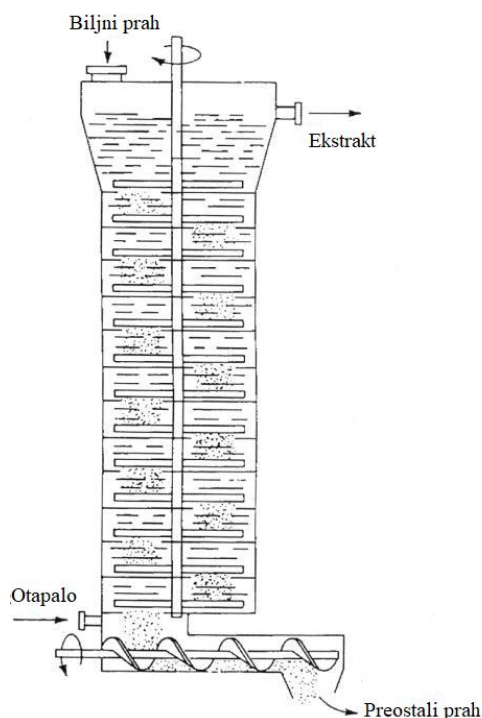
Jedan od ekstraktora koji se koristi u industriji je Hildebrandtov ekstraktor (slika 3). Biljni prah se stavlja na vijčane prijenosnike pomoću kojih prolazi kroz ekstraktor. Otapalo se dodaje s druge strane ekstraktora te teče u suprotnom smjeru od biljnog praha.



Slika 3. Hildebrandtov ekstraktor. Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 10

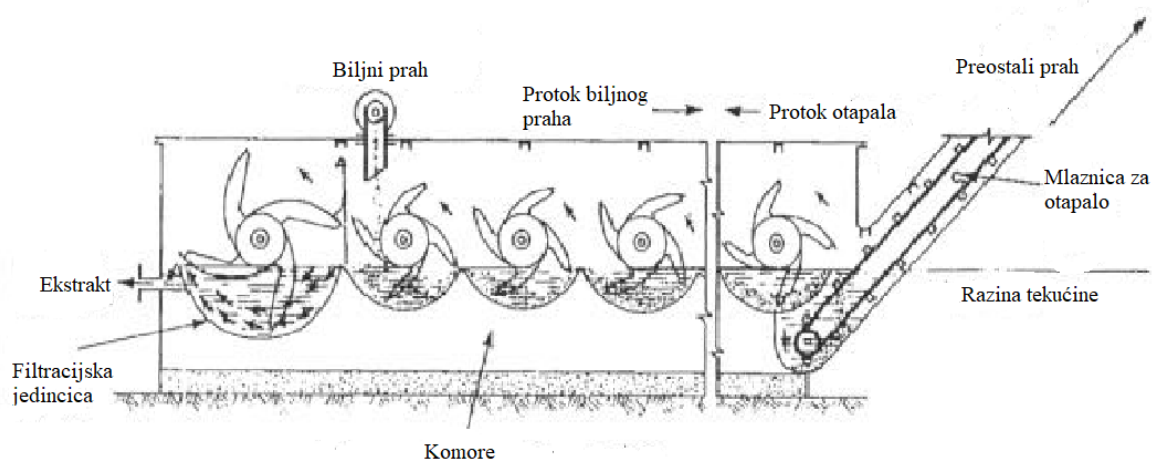
U Bonottovom ekstraktoru biljni prah se prenosi kroz miješalicu na pladnju dok ne dođe do otvorenog dijela gdje pada na sljedeći pladanj (slika 4). Otapalo se pumpa sa dna ekstraktora

prema gore, a ekstrakt izlazi na vrhu ekstraktora. Vijčani prijenosnik na dnu ekstraktora izvlači preostali prah i sprječava isticanje otopine iz ekstraktora.



Slika 4. Bonottov ekstraktor. Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 10

U Kennedyovom ekstraktoru biljni prah se prenosi lopaticama iz jedne komore u sljedeću, u suprotnom smjeru od toka otapala (slika 5). Broj komora se može mijenjati ovisno o potrebnom ekstrakcijskom učinku. Komora iz koje se odvaja ekstrakt koristi se ujedno i kao filtracijski dio u kojoj se sitne čestice odvajaju od ekstrakta.¹⁰



Slika 5. Kennedyov ekstraktor. Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 10

2.4.6. Perkolacija

U ovom postupku fini prah dobiven mljevenjem biljke stavi se u perkolator i otapalo se cijedi kroz prah. Kod nekih materijala dodatkom vodenog otapala prah nabubri što dovodi do sprječavanja protoka otapala kroz perkolator. Taj problem se rješava vlaženjem praha prije uvođenja u perkolator. Proces traje najčešće četiri sata tijekom kojih čestice nabubre do najvećeg volumena. Također, zrak između čestica u prahu zamjenjuje se parama otapala što dovodi do boljeg pakiranja u perkolatoru i ravnomjernijem protoku otapala. Neravnomjerno pakiranje praha dovodi do bržeg protoka otapala pri čemu otapalo ne pokrije sve dijelove perkolatora što rezultira neučinkovitom ekstrakcijom. Nakon pakiranja na vrh praha se stavi filter papir pokriven čistim pijeskom koji sprječava narušavanje gornjeg djela praha tijekom dodavanja otapala. Otapalo se dodaje sporo i ravnomjerno pri čemu se dopušta da zrak između čestica praha izađe na donji dio perkolatora. Kada otapalo krene kapati kroz donji dio perkolatora protok otapala se zaustavi, na vrh perkolatora doda se još malo otapala kako prah ne bi presušio. Perkolator se ostavi stajati 24 sata tijekom kojih otapalo difundira kroz prah i otapa aktivne tvari. Period od 24 sata je zapravo period maceracije tijekom kojeg se povećava učinkovitost ekstrakcije. Nakon maceracije protok otapala se ponovno otvori pri čemu svježije otapalo dolazi na vrh perkolatora. Prikupljeni ekstrakt se zagrijava kako bi se postigla što veća koncentracija aktivnih tvari u otopini. Talog se preša kako bi se sačuvalo otapalo i ponovno iskoristilo, a u talogu, za razliku od maceracije, nalazi se manje zaostalih aktivnih tvari.^{10,12}

2.4.7. Metode perkolacije

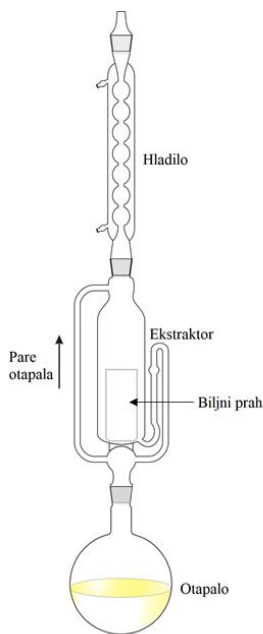
Pri perkolaciji termički nestabilnih tvari problem je što se isparavanjem viška otapala gube i aktivne tvari. U slučaju kada je otapalo smjesa vode i alkohola tijekom isparavanja dolazi do taloženja aktivnih tvari jer otapalo gubi alkoholna svojstva. Navedeni problemi se rješavaju promjenama temeljne metode perkolacije.

U metodi rezervirane perkolacije zagrijavanje je pri sniženom tlaku dok sva voda ne ispari. Ekstrakt se zatim otopi u alkoholnoj otopini čime se sprječava taloženje aktivnih tvari.

U metodi *Cover and Run Down* kao otapalo se koristi metanol. Navlaženi prah se stavi u perkolator i macerira nekoliko sati. Zatim se otopina iz perkolatora skuplja te se u perkolator dodaje svježije otapalo. Postupak se ponavlja više puta te se kasniji ekstrakti sa manjom koncentracijom aktivnih tvari koriste za ekstrakciju sljedeće serije biljnog praha. Otopine koje sadrže više koncentracije aktivnih tvari zagrijavaju se pri sniženim tlakom kako bi se uklonio metanol.¹⁰

2.4.8. Vrste perkolatora

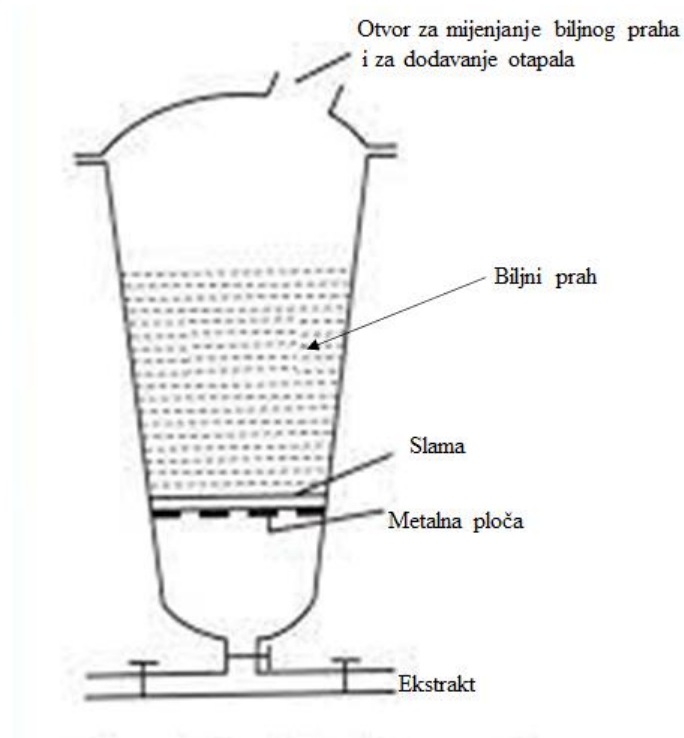
U laboratoriju se tijekom pripreme otopina visokih koncentracija aktivnih tvari koristi kontinuirana ekstrakcija u kojoj su maceracija i perkolacija povezane s isparavanjem otapala. Jedan od najviše korištenih perkolatora je Soxhletov ekstraktor (slika 6).



Slika 6. Soxhletov ekstraktor. Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 10

Soxhletova aparatura za ekstrakciju sastoji se od okrugle tikvice, Soxhletovog ekstraktora i hladila. Biljni prah u filter papiru stavi se u Soxhletov ekstraktor, u tikvicu se doda otapalo i zagrijava. Kako otapalo isparava prolazi kroz cijevi aparature i dolazi do hladila na kojem se kondenzira i pada na biljni prah. Kada se Soxhletov ekstraktor napuni s otopinom do kraja, cijeli volumen otopine izlije se u tikvicu. Tijekom ekstrakcije Soxhletovim ekstraktorom svježe otapalo više puta dolazi u kontakt sa biljnim prahom čime se povećava učinkovitost ekstrakcije. Prednost korištenja Soxhletovog ekstraktora je što se filtracija vrši tijekom same ekstrakcije i nije odvojena kao kod većine ekstrakcijskih tehnika. Postoji nekoliko nedostataka ekstrakcije po Soxhletu: nije moguće miješanje otopine tijekom ekstrakcije, za potpunu ekstrakciju potrebnu je puno vremena, ekstrakcija se odvija pri temperaturi vrelišta otapala što može dovesti to termičkog raspada željenih tvari osjetljivih na toplinu.^{10,12}

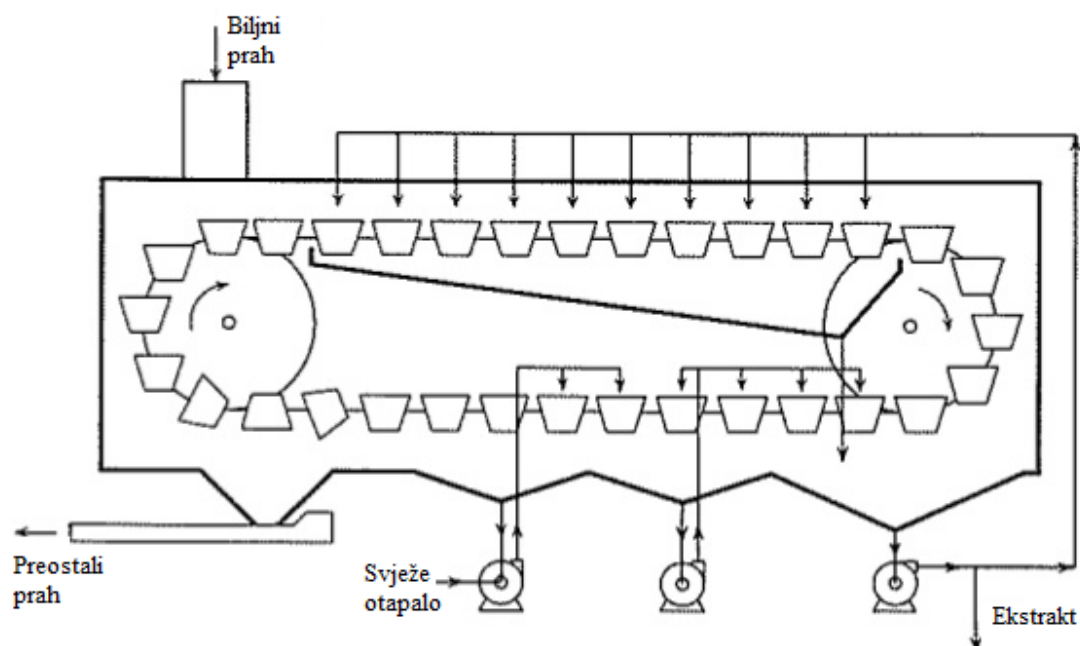
U industriji perkolatori su veći i spajaju se u serije. Biljni prah se stavi na metalnu ploču s rupama koja je pokrivena slamom (slika 7).



Slika 7. Industrijski perkulator. Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 10

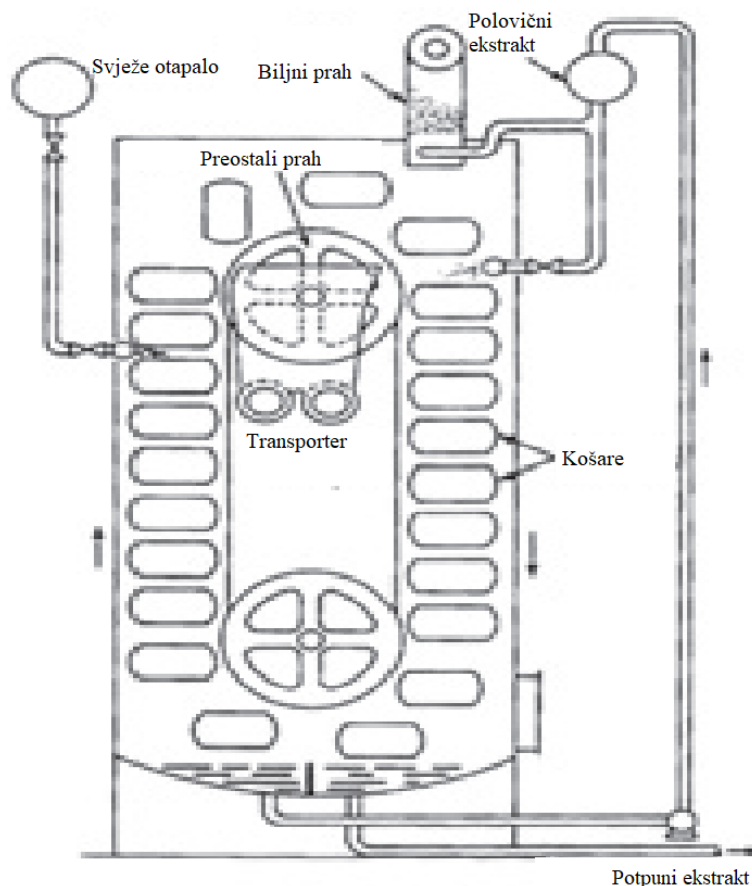
Perkulator ima pomični poklopac kroz kojeg dolazi otapalo. Na izlaz perkulatora postavljaju se cijevi koje služe za odvođenje ekstrakta na daljnju obradu ili se ekstrakt koristi kao otapalo u drugom perkulatoru spojenom u seriji. Perkulatori se izrađuju od stakla i nehrđajućeg čelika, stožastog su oblika kako bi otapalo prodrlo do praha u svim dijelovima perkulatora.

Za kontinuiranu perkolaciju u industriji koristi se kontinuirani horizontalni ekstraktor (slika 8). Biljni prah ulazi u košaru, a otapalo prolazi kroz prah i izlazi na donjem dijelu košare. Protok otapala je obrnut smjeru prolaska biljnog praha.



Slika 8. Kontinuirani horizontalni ekstraktor Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 10

U Bollmannovom ekstraktoru biljni se prah dodaje u košare s otapalom (slika 9). Košara ima propusno dno te dolazi do filtracije. Otapalo u košarama s lijeve strane ekstraktora je svježe, a otapalo u košarama s desne strane ekstraktora je filtrat koji je izašao iz košara. Ekstrakt se skuplja na dnu ekstraktora. Preostali prah pada na vijčani prijenosnik te se kontinuirano uklanja.¹⁰



Slika 9. Bollmanov ekstraktor Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 10

2.5. Ekstrakcija superkritičnim fluidom

Fluid postaje superkritičan povišenjem temperature i tlaka iznad kritične točke fluida. Pri određenim uvjetima svaki fluid može postati superkritičan. U ekstrakciji superkritičnim fluidom koristi se više vrsta otapala, većinom ona kojima se kritična temperatura ne razlikuje puno od sobne temperature. Podešavanjem temperature, tlaka i polarnosti otapala postiže se selektivna ekstrakcija analita. Niže temperature fluida omogućuju ekstrakciju hlapljivih i termički nestabilnih analita pa se koristi se za odvajanje komponenata koje nije moguće odvojiti klasičnim ekstrakcijskim tehnikama.

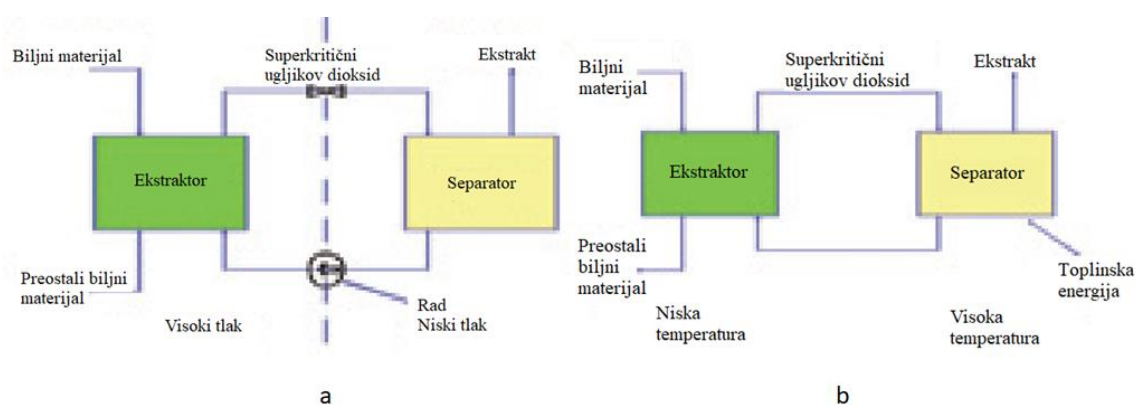
Ugljikov dioksid se najviše koristi kao otapalo jer ima nisku kritičnu temperaturu i tlak, nije otrovan te mu je velika primjenjivost za različite uzorke. Kritična točka za ugljikov dioksid je pri temperaturi od 31 °C i tlaku od 72 bara. Ugljikov dioksid pri superkritičnim uvjetima pogodan je za ekstrakciju jer ima visoku difuznost, a pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku prelazi u plin pri čemu se olakšava skupljanje ekstrakta. Nadalje, ugljikov dioksid se može

lako reciklirati jer otopljene tvari u ugljikovom dioksidu pri superkritičnim uvjetima talože tijekom smanjivanja tlaka. Nedostatak ekstrakcije s fluidom ugljikova dioksida je mala selektivnost, tvari slične polarnosti se podjednako ekstrahiraju. Selektivnost ugljikovog dioksida pri superkritičnim uvjetima može se povećati dodatkom organskog otapala koje djeluje kao kootapalo koje mijenja kemijske interakcije između ugljikovog dioksida i otopljene tvari.¹⁴

Primjer selektivne ekstrakcije ugljikovim dioksidom pri superkritičnim uvjetima je izolacija terpena (bilobalidi i ginkgolidi) iz listića ginka (*Ginkgo biloba*) pri 100 °C i 350 atm, uz dodatak modifikatora smjese etanola i octene kiseline (9:1 v/v). Također se koristi u izolaciji aliklamida iz uskolisne rudbekije (*Echinacea angustifolia*) pri 60 °C i 550 bara.^{9,15}

Aparatura za ekstrakciju superkritičnim fluidom sastoji se od dva glavna dijela. U ekstraktoru otopina koja sadrži biljni materijal dolazi u kontakt sa superkritičnim fluidom pri odabranoj temperaturi i tlaku. Superkritični fluid odlazi do separatora gdje se tvar odvaja od superkritičnog fluida podešavanjem temperature i tlaka u separatoru pri kojima se ekstrahira što više tvari.

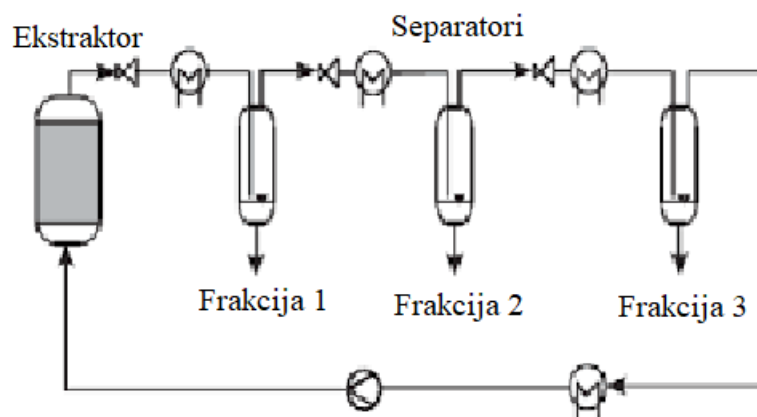
Odvajanje tvari od superkritičnog fluida provodi se pri konstantnoj temperaturi te tada potrebno smanjiti tlak, a nakon odvajanja potrebno je uložiti rad kako bi se ugljikov dioksid vratio u plinovito stanje. Drugim postupkom tlak ostaje isti, a temperatura se povisuje pri čemu je potrebno uložiti toplinsku energiju (slika 10). Kompleksniji postupci odvajanja uključuju mijenjanje temperature i tlaka ili separator sadrži krutinu te se odvajanje vrši uz adsorpciju.



Slika 10. Blok dijagram procesa ekstrakcije superkritičnim fluidom s odvajanjem tvari od superkritičnog fluida promjenom tlaka (a) i promjenom temperature (b)

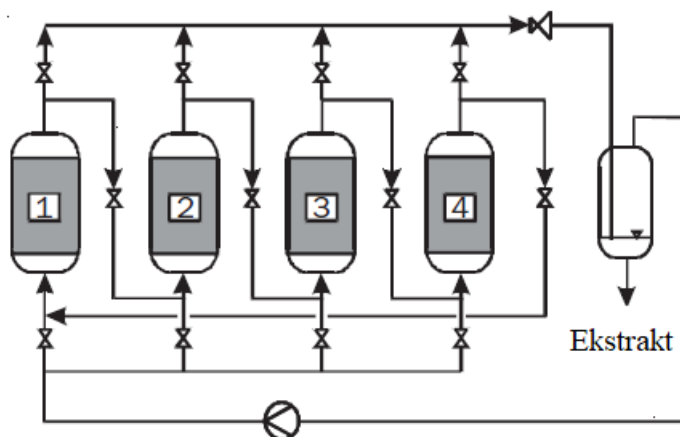
2.5.1. Primjena ekstrakcije u superkritičnim uvjetima

Zbog niske selektivnosti superkritičnog ugljikovog dioksida u ekstraktu se nalazi više tvari. Kako bi odvojili tvari dodaje se više separatora u kojima su drugačiji uvjeti temperature i tlaka čime se tijekom jedne ekstrakcije mogu skupiti više frakcija sa različitim tvarima (slika 11).



Slika 11. Shema ekstrakcije superkritičnim fluidom s jednim ekstraktorom i tri separatora
Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 10

Za pojedine ljekovite biljke kod kojih je otežana ekstrakcija koristi se metoda s više ekstraktora, koji mogu biti spojeni u seriju ili paralelno ovisno o specifičnim zahtjevima (slika 12).^{3,10,16,17}



Slika 12. Shema ekstrakcije superkritičnim fluidom s 4 ekstraktora i jednim separatorom
Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 10

2.6. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Mikrovalovi su neiozinirajući elektromagnetski valovi valne duljine od 1 do 300 nm, a koriste se za komunikaciju i kao energetske vektore. Sastoje se od dva oscilirajuća okomita polja, električnog i magnetskog polja. Za razliku od konvencionalnog zagrijavanja u kojem se većina toplinske energije predaje okolišu, zagrijavanje mikrovalovima je ciljano i selektivno, a budući

da je ekstrakcija u zatvorenom sustavu, nema gubitka toplinske energije. Ovim mehanizmom zagrijavanja vrijeme ekstrakcije smanjuje se za 30 minuta što je značajna prednost u usporedbi s primjerice Soxhletovom metodom ekstrakcije.

Načelo zagrijavanja tvari mikrovalovima temelji se na dva mehanizma, ionskoj provodljivosti i rotaciji dipola. Ionska provodljivost se odnosi na elektroforetsko gibanje iona pod utjecajem promjenjivog električnog polja. Gibanjem iona nastaje trenje koje zagrijava otopinu. Pod utjecajem promjenjivog električnog polja dipoli se rotiraju kako bi ostali u fazi s promjenom električnog polja. Na početku djelovanja električnog polja molekule će se rotirati, ali pri frekvenciji od 2450 MHz brzina mijenjanja električnog polja je veća pa molekule neće moći ući u fazu te će se zbog toga vibrirati. Vibracijom molekule nastaje trenje koje zagrijava otopinu. Pri frekvencijama električnog polja većim od 2450 MHz brzina mijenjanja električnog polja je toliko velika da molekule nemaju dovoljno vremena kako bi započele rotaciju zbog čega ne dolazi do zagrijavanja otopine. Pri frekvencijama električnog polja manjim od 2450 MHz brzina mijenjanja električnog polja je dovoljno mala da molekule budu u fazi s promjenom električnog polja zbog čega ne dolazi do zagrijavanja otopine. Iz gore navedenih mehanizama može se zaključiti da mikrovalovi utječu samo na tvari koje imaju stalne dipole.¹⁸

2.6.1. Načelo ekstrakcije potpomognuta mikrovalovima

Nakon sušenja biljke u stanicama zaostaju tragovi vlage, na koje djeluje mikrovalno zagrijavanje. Zagrijavanjem preostala tekućina ispari te se tlak unutar stanice povisuje. Tlak gura staničnu stijenku iznutra čime se isteže i na kraju puca te aktivne tvari iz stanice prelaze u otapalo. Primjenom visokih temperatura tijekom ekstrakcije dolazi do hidrolize eterskih veza u celulozi, koja je glavni dio stanične stijenke biljaka. Također, pri visokim temperaturama dolazi do dehidracije celuloze čime se smanjuje mehanička uloga celuloze. Tada otapalo lakše prolazi kroz staničnu stijenku biljnih stanica.

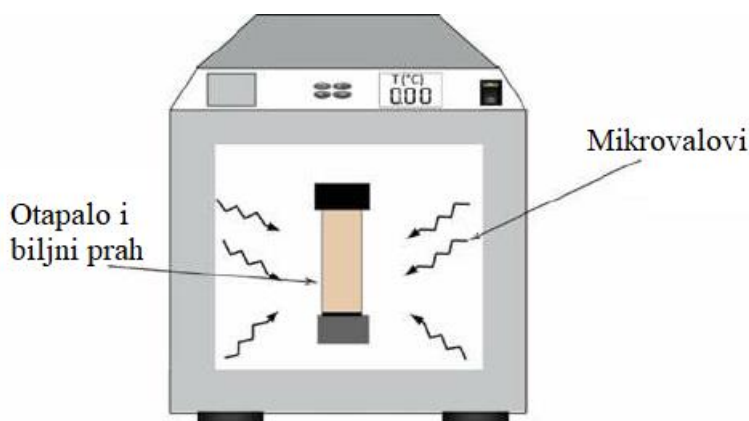
Postoje dvije osnovne metode ekstrakcije uz pomoć mikrovalova. U metodi zatvorenog ekstrakcijskog spremnika ekstrakcija se izvodi pod kontroliranim tlakom i temperaturi te je cijeli spremnik izložen mikrovalovima. U metodi usmjerene mikrovalne pećnice samo dio ekstrakcijskog spremnika u kojem je uzorak prima mikrovalove. Drugi naziv za metodu fokusirane mikrovalne pećnice je Soxhletova ekstrakcija pomoću usmjerenih mikrovalova. U obje metode koriste se dva načina rada: višemodni i jednostruki (fokusirani). U višemodnom načinu rada mikrovalno zračenje se raspršuje nasumično unutar mikrovalne ekstrakcijske šupljine tako da je svaki dio šupljine i uzorka jednako ozračen. U jednostrukom načinu

mikrovalne zračenje je fokusirano samo na uzorak koji se podvrgne puno većem električnom polju nego u višemodnom načinu rada.

Neovisno o načinu rada svi mikrovalni uređaji sadrže četiri glavne komponente. Generator mikrovalova koji generira mikrovalnu energiju, vodič valova koji vodi mikrovalove od izvora do mikrovalne šupljine, aplikator na koji se stavlja uzorak i cirkulator koji omogućuje da se mikrovalovi kreću samo naprijed.

2.6.2. Ekstrakcijski spremnici

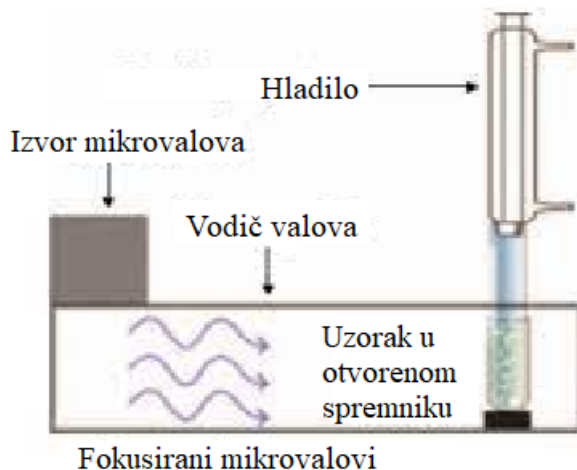
Koristi se dvije vrste spremnika zatvoreni i otvoreni. U zatvorenim spremnicima ekstrakcija se odvija pri višim temperaturama u usporedbi s otvorenim spremnicima jer se ekstrakcija odvija pri povišenom tlaku čime se povisuje temperatura vrelišta otapala (slika13).



Slika 13. Shema zatvorenog ekstrakcijskog spremnika u višemodnom načinu rada. Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 19

Povišena temperatura smanjuje vrijeme ekstrakcije. Ekstrakcija je pogodna za hlapljive tvari jer ne dolazi do gubitaka zbog toga što pare tvari ostaju u zatvorenom spremniku. Volumen potrebnog otapala je manji jer ne dolazi do isparavanja otapala te nije potrebno dodavati otapalo kako bi volumen otopine bio konstantan. Postoji više nedostataka zatvorenih spremnika, a jedan od njih je svakako primjena povišenog tlaka tijekom ekstrakcije koji može izazvati eksploziju. Također, količina uzorka koja se može ekstrahirati je ograničena. Sastavni materijal korišten u zatvorenim spremnicima je politetrafluor etilen koji ne dopušta previsoku temperaturu otopine. Ekstrakcija u zatvorenom spremniku provodi se u jednom koraku što sprječava dodavanje reagensa i otapala. Nakon ekstrakcije spremnik je potrebno ohladiti kako ne bi došlo do gubitka hlapljivih tvari.

Ekstrakcija u otvorenom spremniku, pri atmosferskom tlaku, može biti učinkovitija nego ekstrakcija u zatvorenom spremniku (slika 14).



Slika 14. Shema otvorenog ekstrakcijskog spremnika u fokusiranom načinu rada.

Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 19

Ekstrakcija pri atmosferskom tlaku ima važne prednosti u odnosu na ekstrakciju pri povišenom tlaku. Tijekom ekstrakcije moguće je naknadno dodati reagense. Sastavni materijal može biti politetrafluor etilen, ali i staklo ili kvarc. Lakše se uklanja višak otapala te količina uzorka nije ograničena. Ekstrakcija u otvorenim spremnicima se provodi pri nižim temperaturama pa se može koristiti za odvajanje termički nestabilnih tvari i nije potrebno hladiti spremnik nakon ekstrakcije. Cijena opreme korištene u otvorenim spremnicima je niska te se cijeli proces može automatizirati. Ekstrakcija u otvorenom spremniku može se provoditi u više ciklusa kako bi se uzorak kvantitativno ekstrahirao. Usprkos mnogim prednostima otvoreni spremnici također imaju nekoliko nedostataka. Metode ekstrakcije u otvorenim spremnicima su manje precizne od onih u zatvorenim spremnicima. U većini otvorenih spremnika može se ekstrahirati samo jedan uzorak, dok se u zatvorenim spremnicima istovremeno ekstrahira osam do četrnaest uzoraka. Vrijeme ekstrakcije u otvorenom spremniku je duže nego u zatvorenom spremniku.^{10,14,16,18,19}

Primjer korištenja ekstrakcije potpomognute mikrovalovima je izolacija piperina iz papra (*Piper nigrum* L), pri čemu je izvor mikrovalova modificirana mikrovalna pećnica koja radi na 2,45 GHz s mikrovalnim zračenjem od 750 W, a otapalo jer petroleter. Također se koristi u izolaciji diozgenina iz piskavice (*Trigonella foenum-graecum* L), izvor mikrovalova je

mikrovalna pećnica s mikrovalnim zračenjem od 180 W. Otapalo je 100% aceton, omjer krutine i otapala je 1:5 (w/v), a vrijeme ekstrakcije 6 minuta.^{20,21}

2.7. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

2.7.1. Ekstrakcijski mehanizmi izazvani ultrazvukom

Tijekom ekstrakcije biljnog materijala ultrazvukom u tekućem mediju dolazi do fragmentacije biljnog materijala. Fragmentacija nastaje zbog povećanog broja sudara čestica i udarnih valova nastalih urušavanjem kavitacijskih mjehurića u tekućini. Fragmentacijom se veličina čestica smanjuje čime se povećava površina biljnog materijala. Povećanje površine dovodi do povećane brzine i prinosa ekstrakcije.

Osim fragmentacije biljnog materijala dolazi i do njegove erozije. Erozijska nastaje zbog implozije kavitacijskih mjehurića na površini biljnog materijala. Erozijom se uklanjaju strukture na površini biljnog materijala poput uklanjanja trihoma sa lišća i povećava površina biljnog materijala dostupna otapalu.

Povećanje dubine i brzine prodiranja otapala u kanale i pore tijekom ekstrakcije objašnjeno je ultrazvučnim kapilarnim utjecajem. Mehanizam utjecaja nije potpuno poznat, ali je dokazan odnos između kavitacija i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Prodiranjem otapala u biljni materijal dolazi do oticanja i rehidracije biljnih tkiva čime se povećava desorpcija i difuzija tvari iz biljnog materijala.

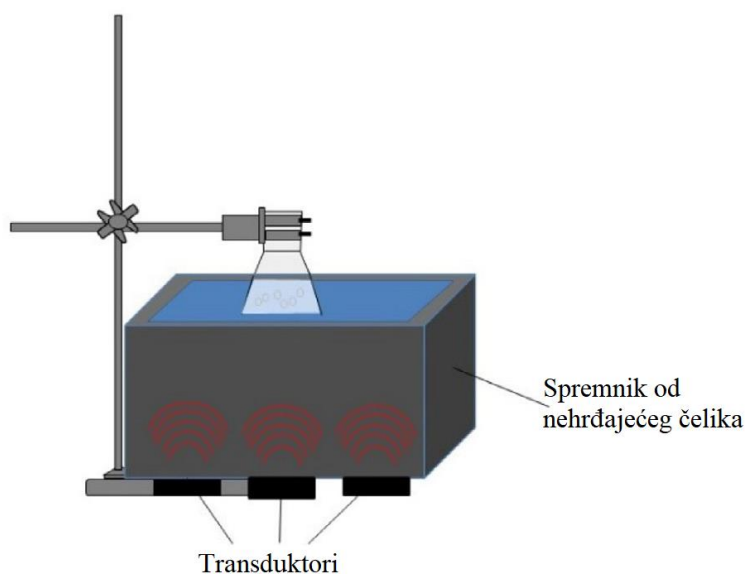
Na razini stanice tijekom ekstrakcije ultrazvukom primijećen je sonoporacijski efekt. Sonoporacija se koristi pri stvaranju reverzibilnih i ireverzibilnih pora u staničnoj membrani. Pore omogućavaju oslobađanje staničnog materijala u otapalo, a u staničnoj membrani nastaju zbog kavitacija.

Opisani mehanizmi djelovanja ultrazvuka na biljni materijal ne djeluju zasebno, već djeluju u kombinaciji. Još jedan mehanizam koji nije detaljno opisan je miješanje tekućine nastalo širenjem ultrazvuka u mediju. Miješanjem se povećava brzina prijenosa otopljenih tvari. Miješanje je posljedica akustičnog strujanja na makro razini i akustičnog mikrostrujanja na mikro razini. Ukupan učinak opisanih mehanizma objašnjava povećanu efikasnost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.²²

2.7.2. Postupak ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

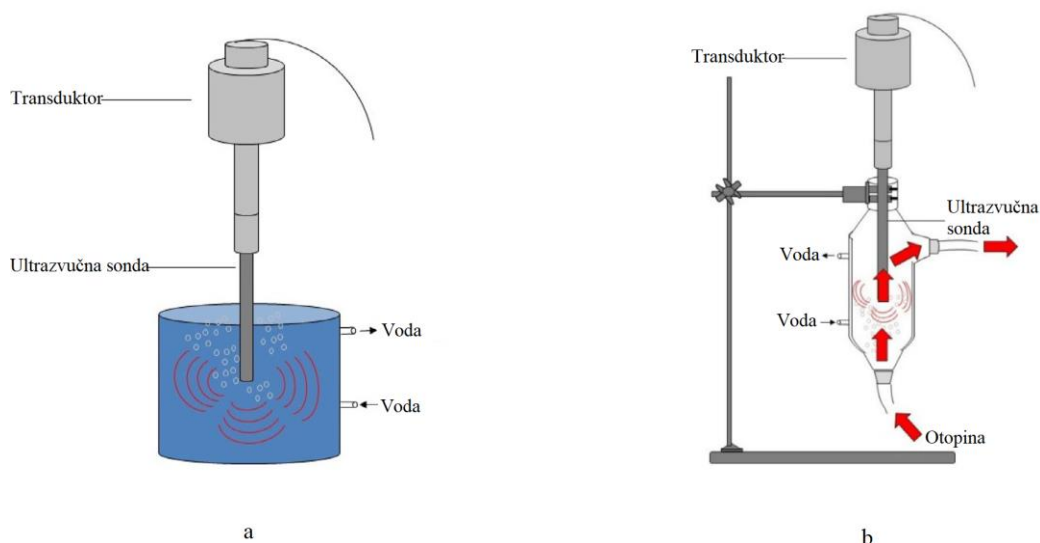
Ultrazvuk velike snage se primjenjuje pomoću dvije vrste uređaja, ultrazvučne kupke i ultrazvučne sonde. Oba uređaja koriste transdudktor kao izvor ultrazvučne snage. Postoje više vrsta transdudktora, a najviše se koristi piezoelektrični transdudktor. Djelovanje ultrazvuka u tekućem mediju povećava temperaturu medija stoga je za provođenje ekstrakcije potrebno hladiti medij.

Ultrazvučna kupka se sastoji od spremnika od nehrđajućeg čelika i jednog ili više ultrazvučnih transdudktora (slika 15).



Slika 15. Ultrazvučna kupka. Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 22

U ultrazvučnoj kupki koristi se ultrazvuk frekvencije od približno 40 kHz. Ultrazvučne kupke su jeftine te se u njima može tretirati više uzoraka istovremeno. Voda u kupki i stakleno posuđe korišteno tijekom ekstrakcije značajno smanjuju snagu ultrazvuka koji dolazi do uzorka.

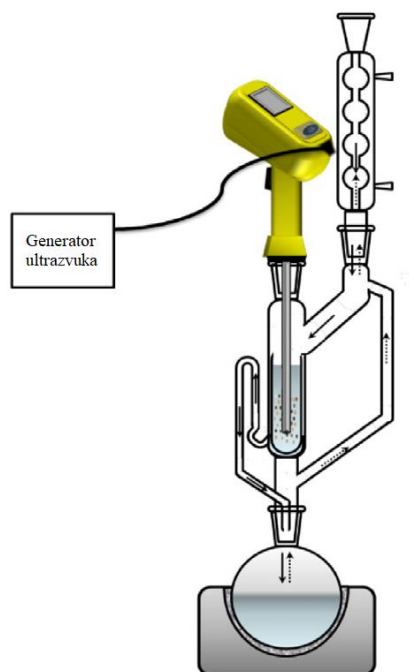


Slika 16. a) Ultrazvučna sonda b) Ultrazvučna sonda sa stalnim protokom. Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 22

Za ekstrakciju se češće koriste ultrazvučne sonde. Za razliku od ultrazvučnih kupki gdje ultrazvuk putuje kroz vodu i posude, ultrazvučne sonde su uronjene u sam uzorak čime se smanjuje gubitak energije (slika 16 a). Ultrazvučna sonda stvara ultrazvuk frekvencije od približno 20 kHz, koristi jedan transdutor vezan na sondu. Sonde mogu biti raznih dužina, polumjera i geometrija. Intenzitet ultrazvuka dobivenog ultrazvučnom sondom inducira povišenje temperature otopine. Za provođenje ekstrakcije je potrebno hladiti otopinu vanjskim spremnikom za hlađenje. Ultrazvučne sonde mogu se koristiti u aparatura sa stalnim protokom (slika 16 b). Aparatura se sastoji od staklenog ili čeličnog spremnika kroz koji se pumpa otopina uzorka pri atmosferskom ili povišenom tlaku.

2.7.3. Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Kombinacijom ultrazvuka i Soxhletove metode ekstrakcije vrijeme potrebno za potpunu ekstrakciju se značajno smanji (slika 17). Ultrazvuk se primjenjuje unutar ili izvan Soxhletovog ekstraktora kako bi povećao migraciju metabolita iz čvrste matrice u otapalo.



Slika 17. Ekstrakcija Soxhletovim ekstraktorom uz ultrazvuk

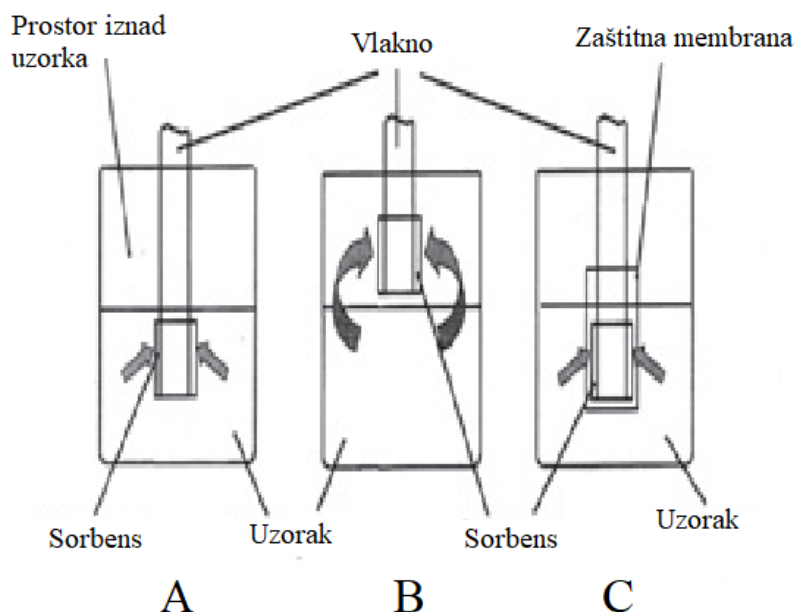
Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom koristi se u izolaciji artemizina iz slatkog pelina (*Artemisia annua* L.). Otapalo je polietilen glikol, krutina i otapalo su u omjeru 1:20 (w/v), smjesa je izložena ultrazvučnom zračenju snage 150 W pri 30 °C u trajanju od 30 min. Također se koristi u izolaciji diozgenina iz piskavice (*Trigonella foenum-graecum* L.). Otapalo je 80% etanol, krutina i otapalo su u omjeru 1:5 (w/v), smjesa je izložena ultrazvučnom zračenju snage 180 W pri 30 °C u trajanju od 60 min.^{15,21}

Kombinacijom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima uz istodobno zračenje dobiva se jedna je od najperspektivnijih tehnika za brzu i učinkovitu ekstrakciju. Ova tehnika nije još u širokoj uporabi, ali zbog učinkovitosti i kratkog vremena ekstrakcije primjenjuje se sve više. Istodobno djelovanje mikrovalova i ultrazvuka daje sinergijske učinke mehanizmu ekstrakcije tvari iz biljnih matrica. Ultrazvuk u ekstrakciji djeluje preko mehanizma kavitacija u kojem se potiče otapanje topljivih tvari iz biljke narušavanjem strukture stanične stijenke. U međuvremenu, mikrovalovi zagrijevaju cijeli uzorak čime se povećava migracija otopljenih tvari. Istodobno zračenje i prodor otapala u stanicu povećavaju topljivost željenih tvari.^{10,22}

2.8. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid-phase microextraction*, SPME) je metoda ekstrakcije koja se temelji na odvajanju analita iz različitih uzoraka na sorbens nanosen na vlakno, najčešće od taljenog silicijeva dioksida sa i bez upotrebe organskog otapala. Količina adsorbiranog analita na vlaknu i vrijeme potrebno da se postigne ravnoteža ovise o debljini i polarnosti aktivnog sloja vlakna, koeficijentu razdijeljena analita i eksperimentalnim uvjetima (način i brzina miješanja uzorka, temperatura, itd.). Za ekstrakciju aktivnih tvari iz medicinskih biljaka koriste se različiti postupci ekstrakcije SPME, kao što je primjerice disperzijska mikroekstrakcija tekuće -tekuće (engl. *liquid-liquid microextraction*, DLLME), disperzijska mikroekstrakcija u tekuću fazu (engl. *dispersive liquid-phase microextraction*, DLPME), mikroekstrakcija u jednoj kapljici (engl. *single-drop microextraction*, SDME) itd. Prednost novih postupaka mikroekstrakcija je što se temelje na načelima Zelene analitičke kemije (engl. *Green Analytical Chemistry*). U usporedbi s klasičnim metodama koristi se manji volumen otapala te je površina između ekstrakcijskog otapala i uzorka veća, čime se postiže bolja učinkovitost i jednostavnost rada.²³

Metoda SPME se izvodi u tri osnovna postupka: direktna ekstrakcija, postupak *headspace* i postupak s zaštitnom membranom. U direktnoj ekstrakciji vlakno se uroni u uzorak te se analiti ekstrahiraju direktno iz matrice na sorbens (slika 18 A). U postupku *headspace* vlakno se postavi iznad uzorka te se analiti ekstrahiraju iz para uzorka (slika 18 B). U postupku sa zaštitnom membranom vlakno i uzorak su odvojeni membranom koja propušta samo analite (slika 18 C). Svrha membrane je zaštititi vlakno od molekula s velikom molekulskom masom koje su prisutne kada je uzorak onečišćen.



Slika 18. Postupci metode SPME A) Direktna ekstrakcija B) Postupak *headspace* C) Postupak s zaštitnom membranom. Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 10

Ekstrakcija analita na aktivni sloj čvrstog nosača (vlakno) iz uzorka je završena kad se postigne ravnoteža. Učinkovitost mikroekstrakcije ovisi o prirodi matrice uzorka, a promjenom matrice može se povećati koeficijenti razdjeljena ciljanih analita. Količina aktivnog nosača, iako mala, ne utječe na brzinu postizanja ravnoteže, a ukoliko se koristi postupak *headspace* gdje nema uporabe otapala odvajanje je brže i jednostavnije (ekološki prihvatljiva metoda).²⁴

Izbor postupka SPME ovisi o sastavu matrice, hlapljivosti analita i afinitetu analita prema matrici. Onečišćeni uzorci sadrže molekule koje mogu štetno utjecati na vlakno te se tada koristi postupak *headspace* i postupak sa zaštitnom membranom. Za čiste uzorke koristi se direktna ekstrakcija i postupak *headspace*. Postupak *headspace* se uvijek koristi za hlapljive analite jer je vrijeme potrebno za uspostavu ravnoteže kraće nego kod direktne ekstrakcije. Postupak ekstrakcije sa zaštitnom membranom se koristi kod onečišćenih uzoraka kada se ostala dva postupka ne mogu upotrijebiti.

Postupci mikroekstrakcije primjenjuju se za veliki broj analita u različitim vrstama medicinskih biljaka, a njihov izbor ovisi o analitu i primjeni aktivnih tvari.^{25,26,27}

2.9. Zaključak

U tablici 2 je radi bolje preglednosti dana usporedba ekstrakcijskih tehnika za izolaciju medicinski aktivnih tvari opisanih u okviru ovog rada.¹²

Tablica 2. Usporedba metoda ekstrakcije medicinski aktivnih tvari

Metoda	Otapalo	Temperatura	Tlak	Vrijeme ekstrakcije	Volumen organskog otapala	Polarnost ekstrakta
Maceracija	Voda, vodeno i bezvodno otapalo	Sobna temperatura	Atmosferski	Dugačko	Velik	Ovisno o otapalu
Perkolacija	Voda, vodeno i bezvodno otapalo	Sobna ili visoka temperatura	Atmosferski	Dugačko	Velik	Ovisno o otapalu
Dekokcija	Voda	Visoka temperatura	Atmosferski	Umjereno	Nikakav	Polarno
Soxhletova ekstrakcija	Organsko otapalo	Visoka temperatura	Atmosferski	Dugačko	Umjeren	Ovisno o otapalu
Ekstrakcija superkritičnim fluidom	Superkritični fluid, uobičajeno SC-CO ₂	Blizu sobne temperature	Visok tlak	Kratko	Nikakav ili malen	Nepolarno do umjereno polarno
Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	Voda, vodeno i bezvodno otapalo	Sobna ili povišena temperatura	Atmosferski	Kratko	Umjeren	Ovisno o otapalu
Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	Voda, vodeno i bezvodno otapalo	Sobna temperatura	Atmosferski ili povišeni	Kratko	Nikakav ili umjeren	Ovisno o otapalu
Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi	Voda i organska otapala, postupak <i>headspace</i> - bez otapala	Sobna ili povišena temperatura	Atmosferski	Kratko do umjereno	Nikakav ili malen	Ovisno o otapalu, postupak <i>headspace</i> - bez otapala

Prema sažetku usporedbi tehnika ekstrakcije u Tablici 2 u može se zaključiti da se koristi velik broj različitih ekstrakcijskih tehnika za odvajanje aktivnih tvari iz medicinskih biljaka. Sam izbor ekstrakcije ovisi o kemijskim i fizikalnim svojstvima analita, količini uzorka i primjeni konačnog proizvoda. Razvojem modernih tehnika ekstrakcije moguće je učinkovito odvojiti i izolirati pojedine tvari koje pokazuju biološku aktivnosti, a koriste se za liječenje

pojedinih bolesti, pripravu lijekova ili samo kao preventiva protiv bolesti ili poboljšanje zdravlja te je stoga razvoj novih ekstrakcijskih tehnika i poboljšanje starih izuzetno važno.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. *Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines*, World Health Organization, Ženeva, 1991. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/58865> (datum pristupa 12. srpnja 2021.)
2. F. Jamshidi-Kia, Z. Lorigooini, H. Amini-Khoei, *J. Her. Med Pharmacol.* **7** (2018) 1-7.
3. S. Maharaj, M. J. Watson, R. Skeene, D. R. McGaw, *JAPETT* **45** (2017) 20-25.
4. M. Pahlow, *Velika knjiga ljekovitog bilja*, Cankarjeva založba Ljubljana - Zagreb, 1989. 1-443
5. *WHO Global Report on Traditional and Complementary Medicine*, World Health Organization, Luksemburg, 2019
<https://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/WhoGlobalReportOnTraditionalAndComplementaryMedicine2019.pdf> (datum pristupa 12. srpnja 2021.)
6. V. Thorat, F. A. Tamboli, N. M. Harinath, A. Jadhav, *IJP* **8(4)** (2021) 138-145.
7. M. S. Mills, E. M. Thurman, *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*, John Wiley & Sons, Inc., New York, SAD, 1998.
8. S. Allegret, E. Horwood, *Developments in Solvent Extraction*, Editor, Limited, Publ. Chichester, Engleska, 1988.
9. P. M. Santana, M. Quijano-Aviles, I. Chóez-Guaranda, A. B. Lucas, R. V. Espinoza, D. Martinez, C. Camacho, M. M. Martinez, *Rev. Fac. Nac. Agron. (Medellin, Colomb.)* **71(3)** (2018) 8617-8622.
10. S. S. Handa, S. P. S. Khanuja, G. Longo, D.D. Rakesh, *Extraction technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, International Center for Science and High Technology, Trst, 2008 str. 7-8, 21-33, 67-82, 93-106, 145-149, 169-180.
https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants_0.pdf (datum pristupa 25. ožujka 2021)
11. L. Duan, L.-L. Dou, L. Guo, P. Li, E.-H. Liu, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **4** (2016) 2405-2411.
12. Q.-W. Zhang, L.-G. Lin, W.-C. Ye, *Chin. Med.* **13** (2018) 1-26.

13. Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, Council of Europe, 2011 (datum pristupa 26. travnja 2021.)
14. T.-H. Nguyen-Vo, L. Nguyen, N. Do, T.-N. Nguyen, K. Trinh, H. Cao, L. Le, *J. Chem. Inf. Model.* **60** (2020) 1101-1110.
15. P. Prawang, Y. Zhang, Y. Zhang, H. Wang, *Ind. Eng. Chem. Res.* **58** (2019) 18320-18328.
16. D. E. Raynie, *Anal. Chem.* **78** (2006) 3997-4003.
17. C. Turner, *Overview of Modern Extraction Techniques for Food and Agricultural Samples*, American Chemical Society, Washington DC, 2006, str. 3-16.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bk-2006-0926.ch001> (datum pristupa 25. ožujka 2021.)
18. V. Mandal, Y. Mohan, S. Hemalatha, *Pharmacogn. Rev.* **1** (2007) 7-12.
19. Y. Li, A.-S. Fabiano-Tixier, M. Vian, F. Chemat u F. Chemat, G. Cravotto (ur), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, Vol. 4, Springer Science+Business Media New York 2013, str. 103-125.
https://www.researchgate.net/publication/278244630_Microwave-Assisted_Extraction_of_Antioxidants_and_Food_Colors (datum pristupa 26. travnja 2021)
20. G. Raman, V. G. Gaikar, *Ind. Eng. Chem. Res.* **41** (2002) 2521-2528.
21. P. Arya, P. Kumar, *Ultrason. Sonochem.* **74** (2021).
22. F. Chemat, N. Rombaut, A.-G. Sicaire, A. Meullemiestre, A.-S. Fabiano-Tixier, M. Abert-Vian, *Ultrason. Sonochem.* **34** (2017) 540-560.
23. M. Tobiszewski, A. Mechlinska, J. Namiesnik, *Chem Soc Rev.* **39(8)** (2010) 2869- 2878
24. A. Diuzheva, M. Locatelli, A. Tartaglia, M. Goga, V. Ferrone, G. Carlucci, V. Andruch, *Phytochem. Anal.* (2020) 1–13.
25. Z. Wang, B. Cao, A. Yu, H. Zhang, F. Qiu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **104** (2015) 97-104
26. C. Deng, N. Yao, B. Wang, X. Zhang, *J. Chromatogr. A.* **1103(1)** (2006) 15-21.
27. J. R. Dean, *Extraction Methods for Environmental Analysis*, John Wiley & Sons; New York, SAD, 1998. str. 63-90.