Utjecaj postupka ekstrakcije na iskorištenje i kemijski sastav eteričnog ulja konopljike (Vitex agnus castus L.)

Komušanac, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:153610

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek







SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Komušanac

Utjecaj postupka ekstrakcije na iskorištenje i kemijski sastav eteričnog ulja konopljike (*Vitex agnus castus* L.)

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnološko projektiranje
Tema rada je prihvaćena na V. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 22. veljače 2016.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Stela Jokić*
Komentor: doc. dr. sc. *Maja Molnar*

UTJECAJ POSTUPKA EKSTRAKCIJE NA ISKORIŠTENJE I KEMIJSKI SASTAV ETERIČNOG ULJA KONOPLJIKE (*VITEX AGNUS CASTUS* L.)

Ivana Komušanac, 300-DI

Sažetak:
Ekstrakcija pomoću superkritičnog CO_2 kao nova zelena tehnologija razmatra se intenzivno posljednjih godina jer se CO_2 pokazao kao vrlo poželjno otapalo u separacijskim procesima budući da je neotrovan, nezapaljiv, bez okusa i mirisa, jeftin i lako dostupan u većim količinama, kao i zbog toga što je ekološki prihvatljivo otapalo. Stoga su ciljevi ovoga rada sljedeći: (1) proizvodnja ekstrakata iz ploda konopljike (*Vitex agnus castus* L.) pomoću superkritičnog CO_2 pri različitim procesnim parametrima (tlak, temperatura, protok otapala, veličina čestica), (2) dobivanje eteričnog ulja konopljike postupkom vodene destilacije, (3) ispitivanje kemijskog sastava dobivenih ekstrakata primjenom plinske kromatografije, (4) proizvodnja suhih ekstrakata postupkom liofilizacije i formuliranje tableta. Promjena uvjeta ekstrakcije značajno utječe na prinos ekstrakta. Najveći prinos ekstrakta 12,27% ostvaren je pri tlaku od 225 bar, temperaturi od 60°C, protoku CO_2 od 1,95 kg/h i veličini čestica 0,393 mm. Utvrđeno je da ekstrakt ploda konopljike ima veoma kompleksan kemijski sastav. Sastav eteričnog ulja se bitno razlikuje od sastava ekstrakta dobivenog superkritičnim CO_2, posebice u količini pojedinih spojeva poput viridiflorola, koji je glavni sastojak eteričnog ulja i α-humulena, koji također dominira u eteričnom ulju, dok je u superkritičnom ekstraktu zastupljen u znatno manjoj količini. Pronađena je i potencijalna primjena dobivenog ekstrakta u farmaceutske svrhe budući da sadrži brojne bioaktivne komponente.

Ključne riječi: konopljika, plod, superkritična CO_2 ekstrakcija, hidrodestilacija, GC-MS, tablete

Rad sadrži:
47 stranica
30 slika
8 tablica
47 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	prof. dr. sc *Mate Bilić*	Predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Stela Jokić*	član-mentor
3.	doc. dr. sc. *Maja Molnar*	član-komentor
4.	doc. dr. sc. *Dajana Gašo-Sokač*	zamjena člana

Datum obrane: 28. rujna 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process Engineering
Subdepartment of Process Design and Construction Materials
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia
Graduate program Food Engineering
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Technology Design
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. V. held on February 22, 2016.
Mentor: *Stela Jokić*, PhD, associate prof.
Co-Mentor: *Maja Molnar*, PhD, assistant prof.

Influence of the extraction technique on yield and chemical composition of *Vitex agnus castus* L. essential oil

Ivana Komušanac, 300-DI

Summary:
Supercritical CO_2 extraction as a new green technology is discussed extensively in recent years and it has proven that CO_2 is highly desirable solvent in the separation process since it is non-toxic, non-flammable, odorless, tasteless, it is cheap and readily available in large quantities, thus being an environmentally friendly solvent. The aims of this work were as follows: (1) production of extracts from *Vitex agnus-castus* fruit by supercritical CO_2 extraction, under different process parameters (pressure, temperature, solvent flow rate, particle size), (2) production of essential oil of *Vitex agnus-castus* fruit by hydrodistillation, (3) investigation of chemical composition of obtained extracts applying gas-chromatography, (4) production of dry extracts using freeze drying and formulation of tablets. Extraction conditions change significantly affects the extraction yield. The highest extraction yield of 12.27% was achieved at pressure of 225 bar, temperature of 60 °C, CO_2 flow rate of 1.95 kg /h and particle size of 0.393 mm. It was found that an extract of the fruit of *Vitex agnus castus* L. has a very complex chemical composition. Obvious differences were found between the composition of essential oil and extracts obtained by supercritical CO_2 in the amount of certain compounds such as viridiflorol, which is the main component of essential oil and α-humulene, which also dominates in essential oil, while in supercritical extract it is present in much lower quantities. Resulting extracts have found potential application as a pharmaceuticals since they contain a number of bioactive components.

Key words: *Vitex agnus-castus* fruit, supercritical CO_2 extraction, hydrodistillation, GC-MS, tablets

Thesis contains:
47 pages
30 figures
8 tables
47 references

Original in: Croatian

Evaluation committee:

1.	*Mate Bilić,* PhD, full prof.	Chair person
2.	*Stela Jokić*, PhD, associate prof.	Supervisor
3.	*Maja Molnar*, PhD, assistant prof.	Co-supervisor
4.	*Dajana Gašo-Sokač*, PhD, assistant prof.	Stand-in

Evaluation date: September 28, 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Veliku zahvalnost pri izradi ovoga rada dugujem mentorici i profesorici Steli Jokić koja je svojim sugestijama i savjetima doprinijela uspješnom završetku ovog diplomskog rada.

Ovaj rad posvećujem svojoj majci i svome ocu koji su uvijek bili uz mene.

Zahvaljujem svim članovima komisije, prof. dr. sc. Mati Biliću, komentorici doc. dr. sc. Maji Molnar te doc. dr. sc. Dajani Gašo-Sokač i doc. dr. sc. Mirni Habudi Stanić koje su me tijekom studija motivirale i ohrabrivale pri raznim izazovima.

Zahvaljujem svima koji su mi na bilo koji način pomogli pri izradi ovoga rada.

Hvala mojim prijateljima na ljubavi, ohrabrenju i veselju tijekom nezaboravnih studijskih dana.

Sadržaj

1. UVOD……1

2. TEORIJSKI DIO……3

2.1. KONOPLJIKA (*VITEX AGNUS CASTUS* L.)……3

2.2. AKTIVNE KOMPONENTE U PLODU KONOPLJIKE……3

2.2.1. Eterična ulja……4

2.3. TERPENI……4

2.4. MONOTERPENI……7

2.5. SESKVITERPENI……8

2.6. DITERPENI……9

2.7. FENILPROPANI……9

2.8. FENOLNE KOMPONENTE……10

2.9. KUMARINI……11

2.10. LJEKOVITO DJELOVANJE PLODA KONOPLJIKE……12

2.11. DOBIVANJE ETERIČNIH ULJA PRIMJENOM RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE.14

2.11.1. Vodena destilacija……14

2.11.2. Vodeno-parna destilacija……14

2.11.3. Parna destilacija……15

2.11.4. Ekstrakcija superkritičnim fluidima……16

2.11.4.1. Superkritični ugljični dioksid……18

2.12. GC-MS ANALIZA……20

2.13. PROIZVODNJA SUHIH EKSTRAKATA PROCESOM LIOFILIZACIJE……22

2.14. TABLETE S EKSTRAKTOM KONOPLJIKE……23

3. EKSPERIMENTALNI DIO……25

3.1. ZADATAK RADA……25

3.2. MATERIJALI……25

3.2.1. Plod konopljike……25

3.2.2. Reagensi……25

3.2.3. Uređaji……26

3.3. METODE RADA……26

3.3.1. Određivanje vlage u uzorku……26

3.3.2. Usitnjavanje uzorka……26

3.3.3. Vodena destilacija……27

3.3.4. Soxhlet ekstrakcija……28
3.3.5. Ekstrakcija ploda konopljike superkritičnim CO_2……29
3.3.6. Određivanje kemijskog sastava dobivenih ekstrakata……30
3.3.7. Dobivanje suhog ekstrakta konopljike postupkom liofilizacije……31
3.3.8. Proizvodnja tableta……32
4. REZULTATI I RASPRAVA……..33
4.1. ODREĐIVANJE UDJELA VLAGE U PLODU KONOPLJIKE……34
4.2. ODREĐIVANJE SREDNJEG PROMJERA ČESTICA……34
4.3. EKSTRAKCIJA PLODA KONOPLJIKE PRIMJENOM RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE……..35
4.4. UTJECAJ RAZLIČITIH PROCESNIH PARAMETARA SUPERKRITIČNE EKSTRAKCIJE NA PRINOS EKSTRAKATA PLODA KONOPLJIKE…..……36
4.5. GC-MS PROFIL DOBIVENIH EKSTRAKATA……..39
4.6. TABLETE NA BAZI EKSTRAKTA KONOPLJIKE……42
5. ZAKLJUČCI……43
6. LITERATURA……44

1.UVOD

Ljekovite biljke su vrlo vrijedna sirovina u proizvodnji lijekova, a koriste se u tradicionalnim medicinskim pripravcima, kao i za izradu suvremenih lijekova i dijetetskih suplemenata, za potrebe farmaceutske industrije ili kao polazne sirovine za sintetske lijekove.

Jedna od takvih biljaka je i konopljika, koja pokazuje pozitivan učinak na rad žlijezde hipofize koja utječe na kontrolu menstrualnog ciklusa, te pomaže začeću kod žena koje imaju slabu menstruaciju. Konopljika se koristi kao začin, te ima negativan učinak na potenciju ali pozitivno utječe na stvaranje sperme i pomaže povećanju plodnosti.

Kako bi se ekstrahirale bioaktivne komponente iz biljnog materijala koriste se različite tehnike ekstrakcije među kojima se u novije vrijeme sve češće koristi ekstrakcija superkritičnim fluidima (engl. Supercritical Fluid Extraction-SFE) koja pokazuje niz prednosti u odnosu na tradicionalne metode, kao što je korištenje niskih temperatura, smanjena potrošnja energije i visoka kvaliteta proizvoda zbog odsutnosti otapala u ekstraktu. U SFE procesu najčešće se kao otapalo koristi CO_2 jer je netoksičan, nezapaljiv, bez mirisa, okusa, jeftin i lako dostupan u velikim količinama, i zato što je ekološki prihvatljivo i GRAS (engl. Generally Recognized as Safe) otapalo.

Tablete su jedan od najčešće primjenjivanih ljekovitih oblika koji mogu sadržavati različite bioaktivne komponente ekstrahirane iz određenih biljnih materijala.

Iz svega navedenog, ovaj rad obuhvatio je sljedeće: proizvodnju ekstrakata iz ploda konopljike primjenom superkritičnog CO_2 pri različitim parametrima ekstrakcije (tlak, temperatura, protok otapala, veličina čestica) kao i postupkom vodene destilacije, te ispitivanje kemijskog sastava dobivenih ekstrakata primjenom plinske kromatografije. Nadalje istraživanja su uključila i proizvodnju suhih ekstrakata postupkom liofilizacije i u konačnici formuliranje tableta koji u svom sastavu sadrže ekstrakt ploda konopljike.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KONOPLJIKA (*VITEX AGNUS CASTUS* L.)

Konopljika (*Vitex agnus castus* L.) je listopadni grm porijeklom iz mediteranske Europe i središnje Azije. Listovi biljke koriste se kao začin. Grm je visok s dlanasto razdijeljenim listovima i ljubičastim cvjetovima u vršnim cvatovima (**Slika 1**). Cvate od lipnja do kolovoza i aromatičnog je mirisa, dok joj je okus sjemena pikantno ljut. Tradicionalno, ekstrakt ploda konopljike koristi se u liječenju crijevnih nametnika, za regulaciju mjesečnice i smirivanje menstrualnih grčeva (Lesinger, 2006).

Uzgaja se kao ukrasna biljka u cijelom svijetu i obično raste na vlažnim staništima, kraj potoka i dolina, u primorju, uglavnom na pjeskovitim tlima i stjenovitim područjima u blizini mora, ponekad vapnenačkim obroncima (Dogan i sur., 2011).

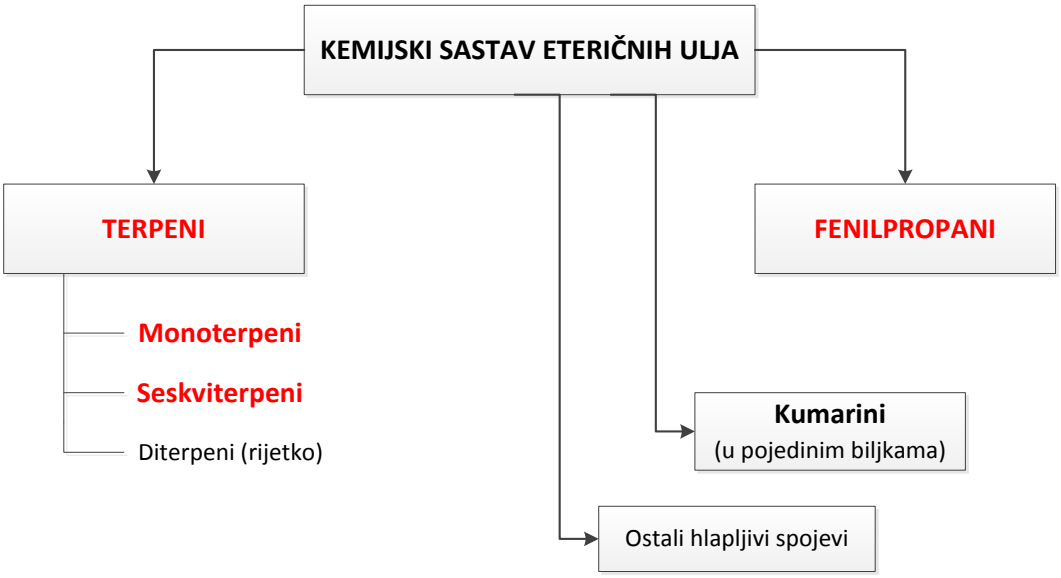


Slika 1. Konopljika - *Vitex agnus castus* L., Verbenaceae (Web 1)

2.2. AKTIVNE KOMPONENTE U PLODU KONOPLJIKE

2.2.1. Eterična ulja

Plod konopljike sadrži brojne bioaktivne komponente: flavonoide (kasticin, penduletin i kempferol), iridoidne glikozide (npr. aucubin i agnusid), terpenoide (rotundifuran), eterična ulja (limonen i pinen). U sastav eteričnih ulja ulaze lakohlapljivi kemijski spojevi, koji vrlo brzo ispare u toploj i vjetrovitoj okolini. Određeno eterično ulje može sadržavati nekoliko stotina kemijskih spojeva, od kojih se većina nalazi u koncentraciji manjoj od 1%. Kemijski spojevi koji ulaze u sastav eteričnog ulja sačinjavaju skupine složenih supstancija poznatih kao terpeni, te njihovi spojevi ili derivati koji u ljekovitom djelovanju imaju važnu funkciju (**Slika 2.**) (Sell, 2010). U eteričnim uljima bornil acetat, limonen i pinen pokazuju antifungalna, antimikrobna i antiinsektna djelovanja (Cossuta, 2008).



Slika 2. Kemijski sastav eteričnih ulja (Sell, 2010.)

Kod terapijskog djelovanja eteričnih ulja bitno je naglasiti da ulju nedostaju tvari koje su topljive u vodi (npr. tanini, kombinacije gorkih tvari, šećeri, želatinozne tvari i pektini), a koje imaju bitnu funkciju u ljekovitom djelovanju biljke (Sell, 2010).

Eterična ulja ploda se sastoje uglavnom od hlapljivih monoterpenskih i seskviterpenskih spojeva. Ponekad se u ulju u manjim količinama nalaze i neterpenski isparljivi spojevi. Često su to veoma složene smjese, kod nekih ulja i preko 100 različitih kemijskih spojeva i s različitim funkcionalnim skupinama. No, bez obzira na podjelu po funkcionalnim skupinama, sastojci eteričnih ulja se dijele na tri glavne skupine, obzirom na biogenezu:

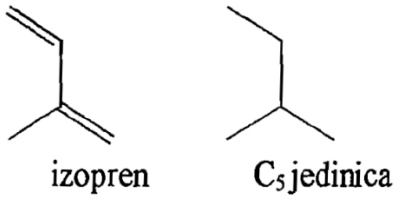
- terpeni
- fenilpropanski derivati
- ostali spojevi (Petričić, 1970).

2.3. TERPENI

Terpeni (izoterpenoidi) su vrsta kemijskih spojeva od kojih potječe miris aromatičnog bilja, a glavni su sastojci eteričnih ulja. Naziv terpeni potječe od terpetina. Terpeni čine veliku i strukturno raznoliku skupinu organskih spojeva koji nastaju međusobnim povezivanjem C_5 izoprenskih jedinica (2-metil-1,3-butadien) po načelu „glava na rep“ (**Slika 3**). Ovo jednostavno „izoprensko pravilo“ objašnjava strukturnu povezanost terpena i bolje razumijevanje skeletne građe (**Tablica 1.**) (Mann i sur., 1994).

Tablica 1. Terpeni prema broju C_5 jedinica (Politeo, 2003)

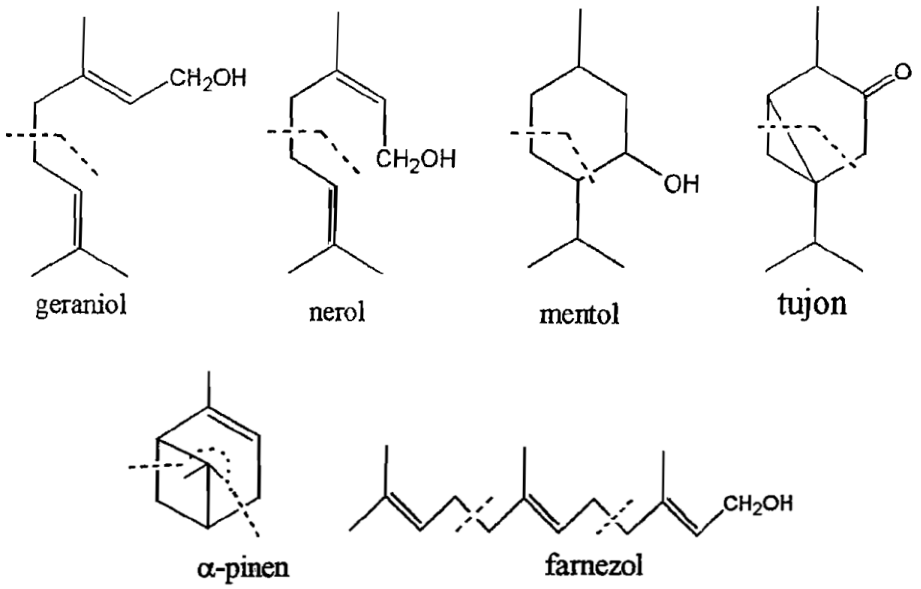
		broj C_5 jedinica
Hemiterpeni	C_5	1
Monoterpeni	C_{10}	2
Seskviterpeni	C_{15}	3
Diterpeni	C_{20}	4
Sesterterpeni	C_{25}	5
Triterpeni	C_{30}	6
Tetraterpeni	C_{40}	8
Politerpeni	$(C_5)n$	N



Slika 3. Struktura izoprena i terpena sa C5 jedinica (Politeo, 2003)

Povezivanjem „glava na rep“ izoprenskih jedinica nastaju pravilni terpeni. Oni su najčešći u prirodi. Drugim povezivanjem izoprena, kao „glava na glavu“ ili „glava na sredinu“ nastaju nepravilni terpeni. Nepravilni terpeni mogu nastati i pregradnjom pravilnih, kao u slučaju fenhan i tropan spojeva (Politeo, 2003).

Sljedeće strukture prikazuju neke pravilne mono- i seskviterpene koji se često nalaze u prirodi:



Slika 4. Strukture nekih pravilih mono- i seskviterpena (Politeo, 2003)

Većina prikazanih spojeva imaju strukturne i stereoizomere (Newman, 1972).

Tako geraniol [(*E*)-3,7-dimetil-2,6-oktadien-1-ol], nerol [(*Z*)-3,7-dimetil-2,6-oktadien-1-ol] i linalool (3,7-dimetil-1,6-oktadien-3-ol)imaju po dva strukturna izomera (α- i β-) s obzirom na položaj dvostruke veze, a farnezol (3,7,11-trimetil-2,6,10-dodekatrien-1-ol) ukupno osam konstitutivnih i stereoizomera. Mentol (1-metil-4-izopropil-cikloheksanol) ima osam stereoizomera, odnosno četri enantiomerna para (Politeo, 2003).

U drugoj polovici 19. stoljeća i početkom 20. stoljeća mnogi poznati kemičari bavili su se istraživanjima mono- i seskviterpena, a u novije vrijeme diterpena i triterpena. Lavoslav Ružička ustanovio je da postoji jedinstveni prekursor u sintezi svake grupe terpena iz kojeg se klasičnim reakcijama pregradnje i ciklizacije izvode poznati sastojci grupe. Ovo je pravilo poznato kao „biogenetsko izoprensko pravilo“ (Ružička, 1953).

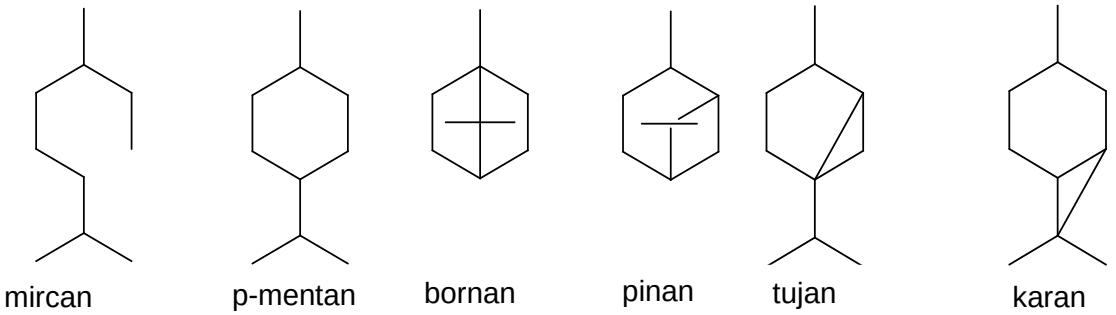
Terpenski spojevi mogu biti aciklički ili ciklički. Ciklički spojevi dalje mogu biti mono-, bi- ili triciklički s prstenovima različitih opsega, a najčešće su to šesteročlani. Do danas je poznato dvadesetak monoterpenskih i preko stotinu seskviterpenskih skeleta. Pojedini skeleti mogu imati i dvostruke veze i različite funkcionalne skupine. Obzirom na funkcionalne skupine sastojci eteričnih ulja su ugljikovodici, alkoholi, eteri, oksid, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline i esteri (Politeo, 2003).

2.4. MONOTERPENI

Monoterpeni se dijele na:

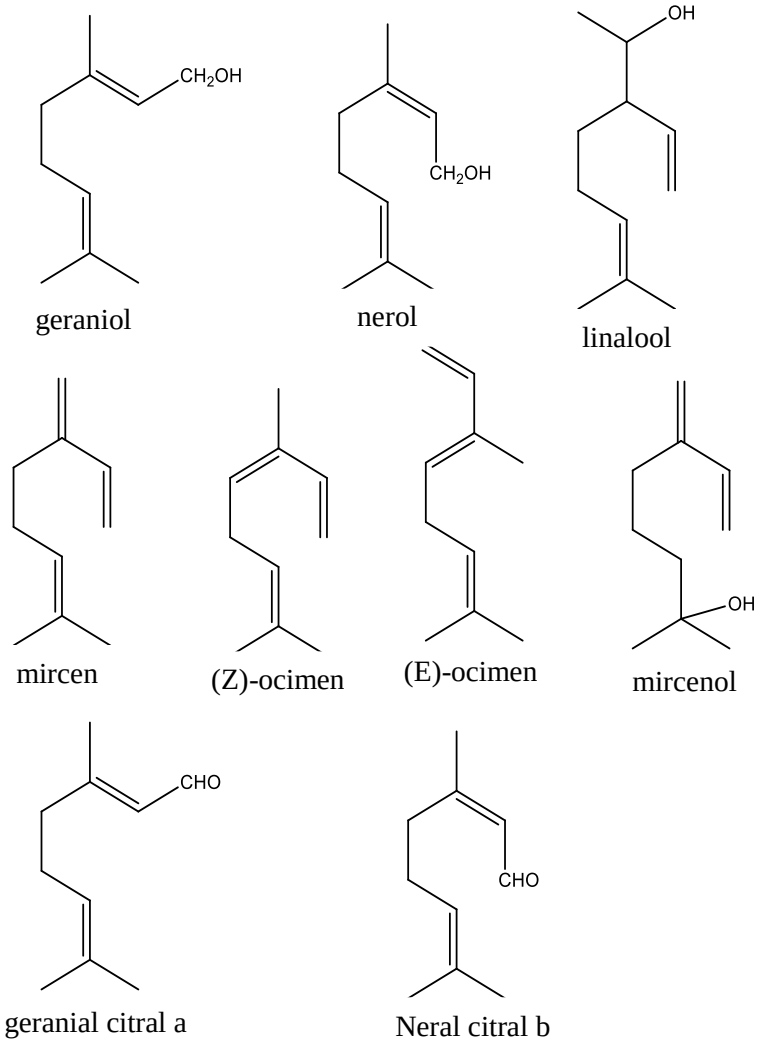
- pravilne (aciklički, monociklički i biciklički) i
- nepravilne terpene (Newman, 1972).

Osnovni tipovi monoterpenskih skeleta prikazani su na **Slici 5**.

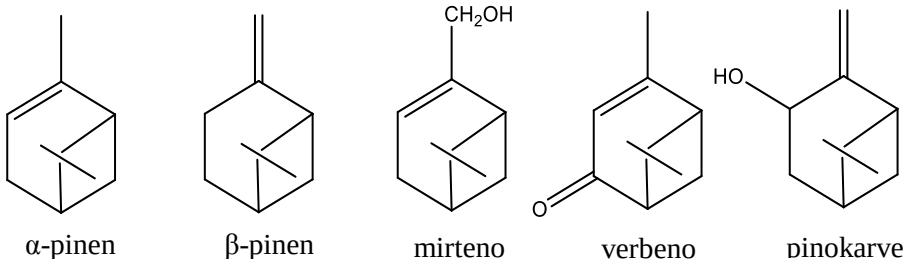


Slika 5. Osnovni tipovi monoterpenskih skeleta (Politeo, 2003)

Aciklički monoterpeni čine relativno malu skupinu terpenskih spojeva koji posjeduju skelet mircana i koji uglavnom nastaju „glava na rep“ povezivanjem C_5 jedinica. Najvažniji predstavnici su mircen, ocimen, mircenol, geraniol, nerol i linalool, te mnogi derivati ovih spojeva. Aciklički spojevi lako podliježu reakcijama ciklizacije. Većina monocikličkih monoterpena derivati su 1-metil-4-izopropilcikloheksana. Najvažniji predstavnici su limonen, α-terpinen, γ-terpinen, terpineolen, α-felandren, β-felandren, p-cimen, karvakrol, timol, terpine-4-ol, mentol, α-terpineol (**Slika 6.**) α- i β-Pinen su najzastupljeniji monoterpeni u prirodi. To su biciklički monoterpeni pinanskog skeleta. Poznati su i njihovi oksidirani derivati mirtenol, verbenon i pinokarveol. Najvažniji biciklički monoterpeni sa skeletom bornana su borneol i kamfor (**Slika 7.**) (Politeo, 2003; Ivanović i sur., 2011; Maksimović i sur., 2013).



Slika 6. Najvažniji aciklički monoterpeni (Politeo, 2003)



Slika 7. Najvažniji biciklički monoterpeni (Politeo, 2003)

2.5. SESKVITERPENI

Seskviterpeni se dijele na

- acikličke i
- cikličke (mono-, bi- i triciklički) seskviterpene (Politeo, 2003).

Farnezol i nerolidol su najpoznatiji primjeri acikličkih seskviterpena. Od monocikličkih seskviterpena izdvajaju se bisabolen, ar-kurkumen i humulen. Među bicikličkim seskviterpenima često se javljaju kadinen, β-selinen, eudesmol i β-kariofilen, dok su najpoznatiji triciklički seskviterpeni kopaen, α-cedren i longifole (Politeo, 2003; Ivanović i sur., 2011; Maksimović, 2013).

2.6. DITERPENI

To su spojevi koji sadrže 20 ugljikovih atoma i vrlo su rijetki u eteričnim uljima, stoga ovdje neće biti puno govora o njima. Izdvojit ćemo diterpenski alkohol sklareol koji je prisutan u niskoj koncentraciji u eteričnom ulju muškatne kadulje. Osim svojeg antibakterijskog djelovanja, sklareol djeluje na tumorske stanice debelog crijeva i dojke. Za estrogeno djelovanje muškatne kadulje mora biti potvrđeno da eterično ulje sadrži sklareol, što ovisi o uvjetima destilacije.

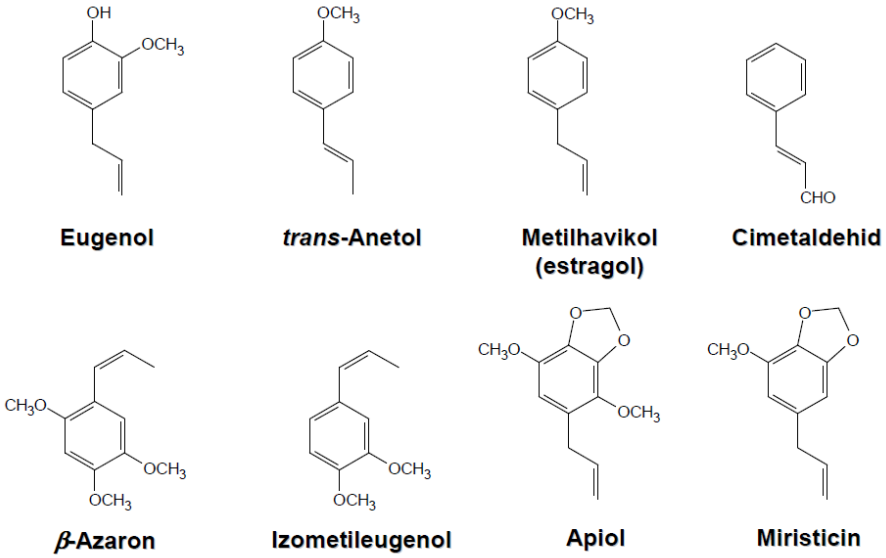
2.7. FENILPROPANI

Osim terpena u sastav eteričnih ulja ulaze i prirodni spojevi koji sadrže fenilni prsten s jednim pobočnim propanskim lancem, fenilpropanski derivati (**Slika 8**).

Eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) je derivat fenil propanoida. To je žuta, masna tekućina, izolirana iz mnogih eteričnih ulja. Djelomično je topljiv u vodi, a potpuno je topljiv u organskim otapalima. Ima ugodnu, ljutkastu aromu. Koristi se u preparatima za privlačenje kukaca, djeluje kao UV-apsorbens, analgetik, antiseptik, antioksidans i kao stabilizator za plastiku i gumu.

Eksperimentalna istraživanja pokazala su da eugenol djeluje i kao anestetik. Primjenjuje se u industriji parfema, a u farmaceutskoj industriji za korigiranje okusa.

Metil-havikol (estragol) je prirodna organska komponenta. To je bezbojna do blijedožuta tekućina. Ispitivanjem na eksperimentalnim životinjama potvrđeno je da estragol ima kancerogeno djelovanje, dok kod ljudi trenutno ne postoje dokazi za kancerogeno djelovanje.



Slika 8. Najpoznatiji fenilpropanski derivati (Politeo, 2003)

2.8. FENOLNE KOMPONENTE

Fenolni spojevi predstavljaju široko rasprostranjenu grupu heterogenih spojeva i jednu od najvažnijih klasa prirodnih antioksidanata. To su supstance koje se sastoje od jednog ili više aromatičnih prstena sa jednom ili više hidroksilnih grupa, pa se mogu svrstati u sljedeće klase spojeva: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene, kumarine i tanine (Liu, 2004). Većina ovih spojeva se u biljkama nalazi u konjugiranim oblicima, najčešće su vezani za šećernu komponentu (glukoza, ramnoza, ksiloza, galaktoza, arabinoza) preko jedne ili više fenolnih grupa, pa su iz tog razloga topive u vodi. Aglikonska komponenta je odgovorna za biološku aktivnost.

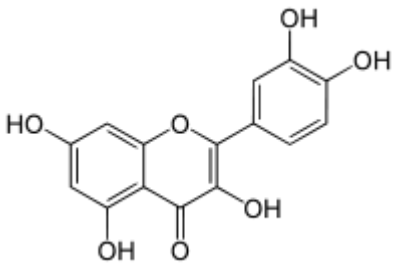
U biljnim organizmima polifenolni spojevi obavljaju niz funkcija: djeluju kao antimikrobni agensi, antioksidanti, fotoreceptori ili kao zaštita biljnih tkiva od prekomjernog UV-zračenja (Heim i sar., 2002). Kao prirodni izvori polifenolnih spojeva najznačajniji su začinsko i ljekovito bilje, međutim, izvori mogu biti i žitarice, sjeme uljarica, voće i povrće (Naczk i Shahidi, 2006).

Polifenolni spojevi se smatraju vodećim spojevima sa antioksidativnim djelovanjem. Djeluju kao reducirajući agensi, i antioksidacijski donori vodika.

Flavonoidi su najveća grupa fenolnih spojeva koja se javlja kod biljaka (Harborne i sur., 1999). Osnovnu strukturu flavonoida čini 15 atoma ugljika u osnovnoj strukturi (C6-C3-C6), od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (**Slika 9**).

Najrasprostranjeniji od svih flavonoida su flavonoli, koji imaju od 200-300 poznatih aglikona, i flavoni. Kvercetin, kamferol i mircetin su najzastupljeniji flavonoli, a od flavona luteolin i apigenin. Poznato je više od stotinu glikozida kvercetina.

Raznovrsnost i veliki broj struktura flavonoida rezultat su brojnih modifikacija njihovih osnovnih struktura, kao što su: hidroksilacije, *O*-metilacije hidroksilnih grupa dimerizacije, vezivanje neorganskog sulfata, i najvažnije, glikolizacije hidroksilnih grupa (nastajanje *O*-glikozida) ili flavonoidnog jezgra (nastajanje C-glikozida).
Zbog svoje strukture flavonoidi su snažni prirodni antioksidansi i svoju aktivnost iskazuju na više načina. Dovode do prekidanja lančanih reakcija slobodnih radikala, pri čemu predaju vodikov atom radikalima i sami prelaze u slobodni radikal, koji se stabilizira putem rezonantnih struktura. Antioksidativne osobine pokazuju i tako što inhibiraju enzime odgovorne za produkciju superoksid aniona i prevencijom peroksidacije (Buhler i Miranda, 2000).

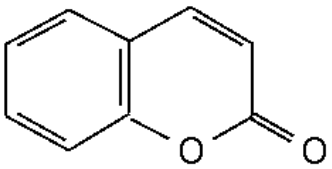


Slika 9. Kemijska struktura biljnih flavonoida (Politeo, 2003)

2.9. KUMARINI

Kumarin (**Slika 10.**) i njegovi derivati pokazuju niz bioloških aktivnosti, međutim njegova upotreba je ograničena, a dopuštena koncentracija u namirnicama određena zakonom. Kumarin je kemijski spoj koji se nalazi u mnogim biljakama, a također ga nalazimo u većim količinama u eteričnim uljima. Kumarini pokazuju mnoštvo bioloških aktivnosti, uključujući antikoagulacijsku, estrogenu, dermalno fotosenzitirajuću, antimikrobnu, vazodilatacijsku, moluskicidnu (ubijanje mekušaca), djeluju kao antihelmintici (paraziti, crvi (helminti) u živim organizmima, najčešće probavnom sustavu), sedativi i hipnotici, a pokazuju i analgetsko i

hipotermičko djelovanje. Biljni ekstrakti koji sadrže derivate kumarina su se u povijesti često koristili kao biljni lijekovi, te se i danas istražuju zbog svojih bioloških svojstava. Istraživanja su pokazala da su kumarini vrlo aktivni pa tako kumarini s fenolnim hidroksilnim skupinama pokazuju sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Molnar, 2011).



Slika 10. Struktura kumarina (Web 2)

2.10. LJEKOVITO DJELOVANJE PLODA KONOPLJIKE

Zbog dugog popisa indikacija na koje biljka konopljika djeluje, vremenom je od fratrovog papra postala ženskom biljkom i više se ne koristi u antiafrodizijačke svrhe kao nekad.

Bez obzira na njenu djelotvornost i činjenicu da je u nekim zapadnim zemljama registrirana kao biljni lijek koji se koristi uz bok sa sintetskim lijekovima, rijetko će koji liječnik u našoj zemlji za liječenje lagane hiperprolaktinemije, povišene razine hormona prolaktina, preporučiti tinkturu konopljike umjesto, recimo, bromergona. I bromergon i konopljika djeluju na komandni most veličine graška smješten na donjoj strani mozga u tzv. turskom sedlu koji kontrolira lučenje svih hormona u našem organizmu-na hipofizu, žlijezdu sa unutarnjim lučenjem.

Uporaba konopljike je indicirana za tretiranje slijedećih tegoba: PMS, polimenoreja, oligomenoreja, bolne mentruacije, endometrioza, mastalgije, PCOS - sindrom policističnih jajnika, fibrocistične promjene u dojkama, ženska neplodnost, akne uzrokovane hormonalnim disbalansom.

Njemačka Komisija E, osnovana od njemačkog Ministarstva zdravstva, preporučuje dnevnu dozu od 30-40 mg suhog ektrakta ili tinkture konopljike, tijekom više mjeseci. Za tretiranje PMS-a, treba ju uzimati tijekom 6 mjeseci, a kod neplodnosti i amenoreje tretman može potrajati i do 18 mjeseci.

Upotreba konopljike smatra se sigurnom i efikasnom, k tome jeftinijom i zdravijom od hormonalne terapije. Negativni efekti su beznačajni. Kod manje od 2% žena prouzročila je lagane probavne smetnje ili iritaciju. Također, konopljika se pokazala efikasnijom nego vitamin B6 (Web 3).

Posljednjih deset godina provedena su brojna znanstvena istraživanja konopljike u kojima su analizirane brojne bioaktivne komponente, a u **Tablici 2.** prikazana su neka od njih.

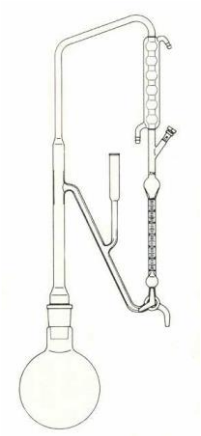
Tablica 2. Odabrana istraživanja na ekstrakciji bioaktivnih komponenata iz konopljike u posljednjih 10 godina

Ekstrahirane komponente	Metoda ekstrakcije	Dio biljke	Referenca
Fenolne kiseline Flavonoidi Iridoidi	Ekstrakcija kruto-tekuće (otapalo: 85%-tna vodena otopina metanola)	List	Abdel-Lateef i sur., 2016.
1,8- Cineol Sabinen Alfa pinen Beta farnesen β-kariofilen oksid β-kariofilen	Vodena ekstrakcija	List	Asdadi i sur., 2015.
Eterično ulje Kasticin Triterpeni Diterpeni	Ekstrakcija pomoću superkritičnog CO_2 Vodena destilacija	Plod	Cossuta i sur., 2008.
Alfa pinen Fenolne komponente	Vodena destilacija	List	Katiraee i sur., 2015.
Fenolne komponente	Ekstrakcija kruto-tekuće (otapala: metanol i etanol)	List, korijen, plod	Latouia i sur., 2012.
Linoleinska kiselina	Ekstrakcija metanolom	Plod	Liu i sur., 2004.
Rotundifuran Kasticin	Ekstrakcija pomoću superkritičnog CO_2 Soxhlet extrakcija	Plod	Mele i sur., 2013.
1,8- cineol Sabinen Alfa pinen Alfa-terpinol acetat B- Farnesen Flavonoidi	Vodena destilacija	Plod	Sarikurkcu i sur., 2009.
Sabinen 1,8- cineol Alfa pinen	Vodena destilacija	List, plod	Stojković i sur., 2011.

2.11. DOBIVANJE ETERIČNIH ULJA PRIMJENOM RAZLIČITIH VRSTA EKSTRAKCIJE

2.11.1. VODENA DESTILACIJA

Ova metoda se najčešće koristi za izolaciju eteričnih ulja, a podrazumijeva postavljanje usitnjenog biljnog materijala u vodu uz zagrijavanje do ključanja, najčešće na atmosferskom tlaku. Pare eteričnog ulja i vode se kondenziraju u hladilu i sakupljaju. Postoje različite izvedbe aparatura, a među ostalima se mogu razlikovati ovisno da li se koriste za izolaciju eteričnih ulja lakših ili težih od vode. Na vrh nastavka stavlja se hladilo, a na bočnu cijev tikvica s biljni materijalom i vodom (**Slika 11**) (Jerković, 2008).



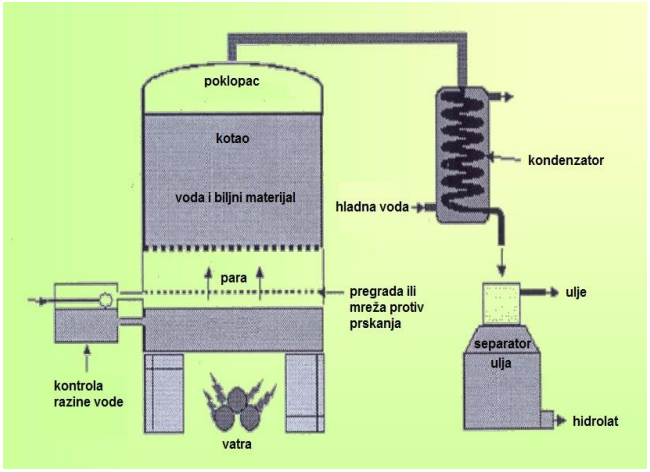
Slika 11. Nastavak po Clevengeru za destilaciju eteričnih ulja:
A – za ulja manje gustoće od vode, B – za ulja veće gustoće od vode (Jerković, 2008)

2.11.2. VODENO-PARNA DESTILACIJA

Destilacija vodenom parom najčešća je metoda izolacije ulja iz biljaka. Njena uporaba seže daleko u povijest, gotovo 5000 godina. Dok se u nekim krajevima i dalje pribjegava tradicionalnom načinu destilacije, industrijski razvijene zemlje sve više uključuju računalnu analizu samog procesa kao i gotovog proizvoda. Pravilnim korištenjem, bez obzira na metodu dobiju se ulja neupitne kvalitete. Uspjeh tradicionalnog načina ovisi o iskustvu i sposobnostima izvođača, dok druga metoda počiva na superiornoj tehnologiji i skupocjenoj opremi (Baser i sur.,2009).

Biljni materijal postavlja se na perforiranoj podlozi na određenoj udaljenosti od dna posude koja je ispunjena vodom (biljni materijal se nalazi neposredno iznad vode). Voda se grije kao i kod vodene destilacije. Zasićena, u ovom slučaju vlažna para podiže se kroz biljni materijal. Biljni materijal je u kontaktu samo sa parom, a ne sa kipućom vodom (**Slika 12**). Ova metoda se pretežito koristi u industriji, a rjeđe u laboratoriju (Jerković, 2008).

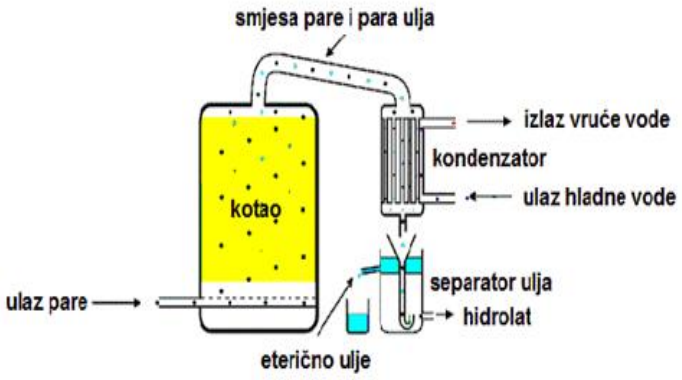
Kotao gdje se stvara vodena para odijeljen je od kotla s biljnim materijalom kako bi se spriječio direktan kontakt vode i materijala te kako bi se izbjeglo hidrolitičko djelovanje vode na estere. Vodena para prolazi kroz biljni materijal stavljen na mrežicu te odnosi čestice eteričnog ulja sa sobom, prolazi kroz cijev koja je hlađena vodom, prilikom čega dolazi do kondenzacije vode i eteričnih ulja. Oni se zajedno skupljaju u posebnu posudu, a s obzirom da se eterično ulje ne otapa u vodi, slojevi se odjeljuju. Eterična ulja su uglavnom lakša od vode, pa se skupljaju na površini, a voda ispod eteričnog ulja se također skuplja i naziva se *hidrolat* ili cvjetna vodica (Krešić, 2014).



Slika 12. Vodeno-parna destilacija (Dragović-Uzelac, 2013)

2.11.3. PARNA DESTILACIJA

Vodena para iz generatora pare se uvodi sa dna, a biljni materijal je postavljen na rešetku i nije u kontaktu s vodom. Koristi se zasićena ili pregrijana para, najčešće kod povišenih tlakova. Vodena para iznosi eterično ulje iz biljnog materijala u kondenzator gdje se pare kondenziraju, a potom se ulje odjeljuje od vode u separatoru i sakuplja (**Slika 13.**) (Jerković, 2008).



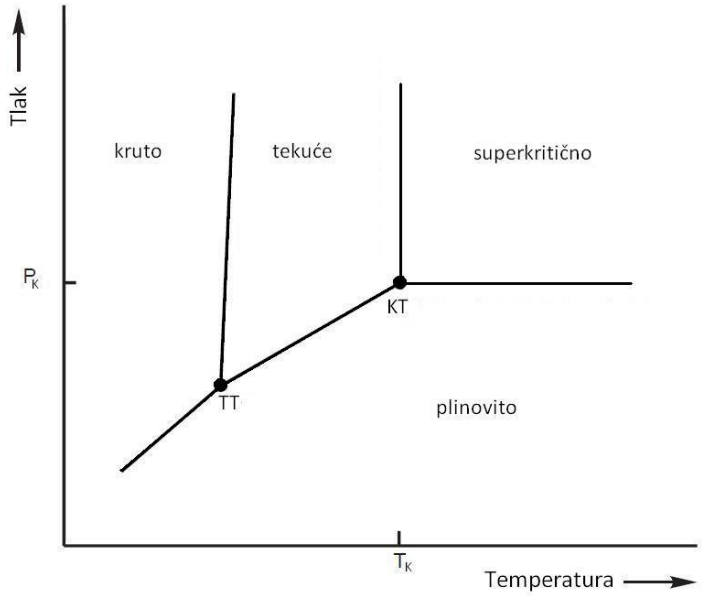
Slika 13. Parna destilacija (Dragović-Uzelac, 2013)

Nedostatak ove metode je povećana mogućnost stvaranja artefakata-spojeva koji nisu izvorno prisutni u biljci, a nastali su zbog termičkih degradacijskih reakcija, osobito hidrolize (Jerković, 2008).

2.11.4. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA

Ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE) je operacija prijenosa tvari bazirana na činjenici da pojedini plinovi postaju izuzetno dobra otapala za određene vrste kemijskih spojeva u blizini svoje kritične točke, ili u superkritičnom području (Aladić, 2015).

U ovom procesu otapalo je plin u uvjetima temperature i tlaka pri kojima ne dolazi do kondenzacije odabranog plina u kapljevinu. Pojedini plinovi posjeduju pojačanu sposobnost otapanja kada su komprimirani iznad kritične točke (temperature i tlaka) (**Slika 14**.):



Slika 14. Fazni dijagram (tlak – temperatura) (Aladić, 2015)

Karakteristika superkritičnog stanja je što postoji samo jedna faza u kojem fluid nije niti plin, niti tekućina. Principi na kojima se bazira ekstrakcija superkritičnim fluidima su direktna korelacija topljivosti i gustoće utvrđene eksperimentima za superkritične fluide. Svaki plin iznad kritične točke pokazuje veliku promjenu gustoće (što osigurava selektivnost u ekstrakciji) povećanjem tlaka. Na taj način superkritični fluid postaje dobro otapalo za kompatibilne supstance. Poslije faze otapanja, superkritični fluid se ponovno dovodi u stanje tlaka nižeg od kritičnog, pri kome djelomično ili u cjelini (selektivnost u raspodjeli) izgubi moć otapala i oslobodi dio ili kompletno otopljenu supstancu (**Tablica 3**.) (Jokić, 2011).

Tablica 3. Fizikalno-kemijska svojstva za plinovito, tekuće i superkritično stanje fluida (Jokić, 2011)

STANJE FLUIDA	Plin	Tekućina	Superkritični fluid
Gustoća ($kgm^{-3)}$	1	300 – 900	1000
Koeficijent difuzije (cm^2s^{-1})	10^{-1}	10^{-3} – 10^{-4}	10^{-5}
Viskoznost (Pa·s)	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}

Prednosti SFE u odnosu na ekstrakciju organskim otapalima:

- Superkritični fluidi kao i organska otapala imaju sposobnost otapanja, ali uz bolju difuziju, nižu viskoznost i manju površinsku napetost,
- Separacija ekstrakta od otapala je brza i laka zbog mogućnosti regulacije topljivosti komponenata promjenom tlaka ili temperature,
- Otapala korištena u SFE su jeftina i sigurna za okoliš. Također, u industrijskim procesima moguće je i recikliranje otapala,
- Bolja ekstrakcija termolabilnih komponenti uz njihovu minimalnu deformaciju,
- Može se primijeniti na sustave različitih kapaciteta od analitičkih, preparativnih, poluindustrijskih do velikih industrijskih postrojenja (Jokić, 2011).

SFE se odvija u pet uzastopnih faza:

- Difuzija superkritičnog fluida do površine čestice kroz film fluida koji je okružuje,
- Prodiranje i difuzija superkritičnog fluida kroz vanjski sloj sfernog omotača, krutog, inertnog materijala,
- Kontakt superkritičnog fluida s otopljenom tvari na površini neizreagirane jezgre i ekstrakcija otopljene tvari,
- Difuzija otopljene tvari u superkritičnom fluidu kroz sloj vanjskog sfernog omotača krutog inertnog materijala na vanjsku površinu čestice,
- Difuzija otopljene tvari u superkritičnom fluidu kroz film superkritičnog fluida koji okružuje česticu u glavnu struju fluida (Jokić, 2011).

Najvažniji čimbenici koji utječu na sam tijek SFE su:

- Tlak, temperatura, vrijeme ekstrakcije i protok otapala,
- Gustoća, viskozitet te difuzivnost otapala i supstance koja se ekstrahira,
- Interakcije između molekula otapala, topljive supstance i netopljivog dijela krutog materijala u kome se nalazi topljiva supstanca, koje utječu na faznu ravnotežu i koeficijente difuzije,
- Dodatak različitih kootapala,

- Oblik, veličina i raspodjela veličina čestica materijala u sloju, poroznost čestica i poroznost sloja (Jokić, 2011).

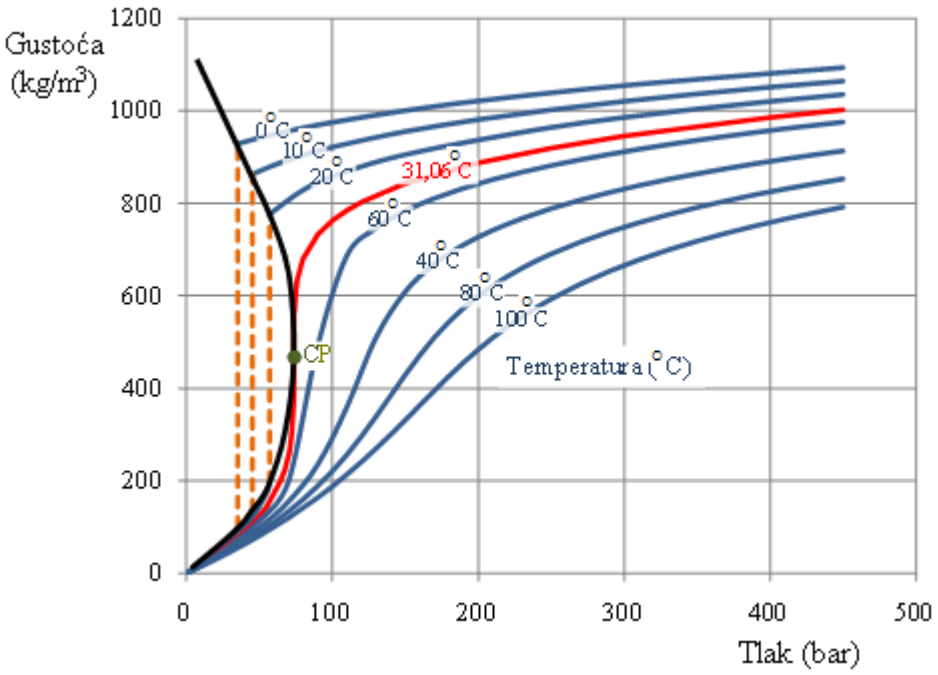
2.11.4.1. SUPERKRITIČNI UGLJIČNI DIOKSID

Ugljični dioksid (CO_2) predstavlja najzanimljiviji fluid za ekstrakciju prirodnih tvari i u tehnologiji pojedinih prehrambenih proizvoda. Relativno je jeftin, lako dostupan, netoksičan, neškodljiv za okolinu, GRAS otapalo i dobrih svojstava otapanja većine sastojaka koji se koriste u proizvodnji hrane, uz nisku kritičnu temperaturu (31,3 °C pri kritičnom tlaku 72,9 bara). Štoviše, u preko 90% slučajeva SFE koristi se superkritični CO_2 kao otapalo upravo zbog svojih prednosti, a osim njega korišteni su etan, propan, butan i neki halogeni ugljikovodici (**Tablica 4.**) (Aladić, 2015; Capuzzo i sur., 2013; Temelli, 2009; Lovrić, 2003; Demirbas, 2001).

Tablica 4. Fizikalno-kemijska svojstva pojedinih superkritičnih fluida (Jokić, 2011)

OTAPALO	T_c (K)	P_c (MPa)	ρ_c (gcm^{-3})
Metan	191	4,06	0,162
Etilen	282	5,03	0,218
Ugljični dioksid	304	7,38	0,468
Dietil-eter	467	3,64	0,265
Heksan	507	3,05	0,23
Aceton	508	4,7	0,287
Metanol	513	8,09	0,272
Amonijak	405	11,3	0,225
Voda	647	22	0,322

Moć otapanja komprimiranog CO_2 može se opisati preko gustoće tekućine. Gustoća CO_2 se kreće od 0,15 do 1,0 gcm^{-3} i ovisi o tlaku i temperaturi (**Slika 15.**). Svojstva CO_2 i superkritičnog CO_2 prikazana su pomoću prikaza ovisnosti gustoće CO_2 o promjeni tlaka pri konstantnoj temperaturi. U superkritičnoj stanju, iznad kritične vrijednosti temperature i tlaka, gustoća se može podešavati promjenom tlaka ili temperature (Aladić, 2015).



Slika 15. Ovisnost gustoće CO_2 o tlaku i temperaturi (Jokić, 2011)

Promjenom tlaka i temperature, omogućeno je da se iz biljnog materijala dobiju eterična i biljna ulja, začini i druge komponente, kao i komponente s antioksidacijskim, antibakterijskim i farmakološki aktivnim djelovanjem (Aladić, 2015).

Snaga otapanja superkritičnog CO_2 može se sažeti u nekoliko pravila (Jokić, 2011; Brunner, 2005):

- Otapa nepolarne ili blago polarne spojeve,
- Velika snaga otapanja za spojeve male molekularne mase, koja se smanjuje povećanjem molekularne mase,
- Kisikovi organski spojevi s niskom ili srednjom molekularnom masom su vrlo topljivi,
- Proteini, polisaharidi, šećeri i mineralne soli, voćne kiseline i glikozidi su netopljivi,
- Superkritični CO_2 ima sposobnost odvajanja spojeva koji su manje isparljivi, imaju veću molekularnu masu i/ili su više polarni, s porastom tlaka,
- Pigmenti su slabo topljivi,
- Voda ima slabu topljivost (<0,5 % m/m) na temperaturama ispod 100 °C.

Superkritični CO_2 ima polarnost usporedivu s tekućim pentanom i stoga je kompatibilan za otapanje lipofilnih nepolarnih spojeva, kao što su lipidi i eterična ulja. Međutim, ovaj niski polaritet čini superkritični CO_2 manje pogodnim za ekstrakciju polarnih komponenti. Praktični pristup rješenju ovoga problema je uporaba kootapala. Dodatkom manjih količina etanola, modifikatora i drugih otapala može se povećati topivost polarnih spojeva i selektivnost procesa (Capuzzo i sur., 2013; Abbas i sur., 2008).

Pored brojnih prednosti, metoda superkritične ekstrakcije ima i neke nedostatke u usporedbi s drugim postupcima ekstrakcije a to su:

- rad pri vrlo visokim tlakovima,
- velik utrošak energije za komprimiranje plinova,
- složena regeneracija korištenih otapala koja vodi do znatnih energetskih troškova,
- veliki investicijski troškovi za procesnu opremu (Jokić, 2011).

Unatoč relativno visokim investicijskim ulaganjima, u mnogim je slučajevima trošak proizvodnje konkurentan tradicionalnim metodama. Također, operativni su troškovi znatno niži zahvaljujući jednostavnoj regeneraciji otapala (Rot, 2015; Ahmed i Rahman, 2012).

2.12. GC-MS ANALIZA

Analiza izoliranih isparljivih spojeva provodi se vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (engl. Gas chromatography–mass spectrometry, GC-MS).
Plinska kromatografija (GC) je najčešća korištena tehnika odjeljivanja smjesa isparljivih spojeva. U plinskoj kromatografiji uzorak se prevodi u isparljivo stanje i nošen plinom nosačem prolazi kroz kromatografsku kolonu pri čemu se vrši razdvajanje. Na izlazu iz kolone nalazi se detektor koji registrira prisutnost supstance u uzorku, pri čemu uređaj automatski bilježi rezultate u obliku plinskog kromatograma (**Slika 16.**) (Tomljanović, 2000).
Spektrometrija masa je metoda u kojoj se molekule ioniziraju, a potom se ioni razdvajaju prema njihovoj masi. Postupak se primjenjuje za određivanje relativnih molekulskih masa, a preko njihovih molekulskih formula. Spektrometrija masa uključuje dva važna postupka, prvi je ionizacija uzorka, a zatim slijedi razdvajanje i određivanje iona.
Osnovni elementi masenog spektrometra su:

- sustav za injektiranje (uvođenje) uzorka,
- ionski izvor u kojemu se proizvodi ionski snop iz ispitivanog uzorka,
- maseni analizator koji razlaže ione prema njihovom odnosu mase i naboja,
- detekcijski sustav, gdje se razloženi ioni detektiraju i gdje se mjeri njihov intezitet (Tomljanović, 2000).

Kombinacijom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom stvorena je jedna od najmoćnijih instrumentalnih metoda, koja se danas koristi u analitičkoj kemiji. Ona omogućava dobivanje maksimuma podataka uz korištenje minimalne količine materijala (Idžojtić, 2000).
Ove dvije metode se savršeno nadopunjavaju. Dok plinska kromatografija omogućava vrlo efikasno razdvajanje komponenata iz najsloženijih smjesa organskih spojeva, maseni spektrometar posjeduje izuzetne osobine u pogledu specifičnosti, osjetljivosti i brzine kod

detekcije i identifikacije pojedinih komponenata koje je plinski kromatograf razdvojio. Plinska kromatografija je uspješna metoda za separaciju i kvantizaciju, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje, gdje je spektrometrija masa gotovo savršena.

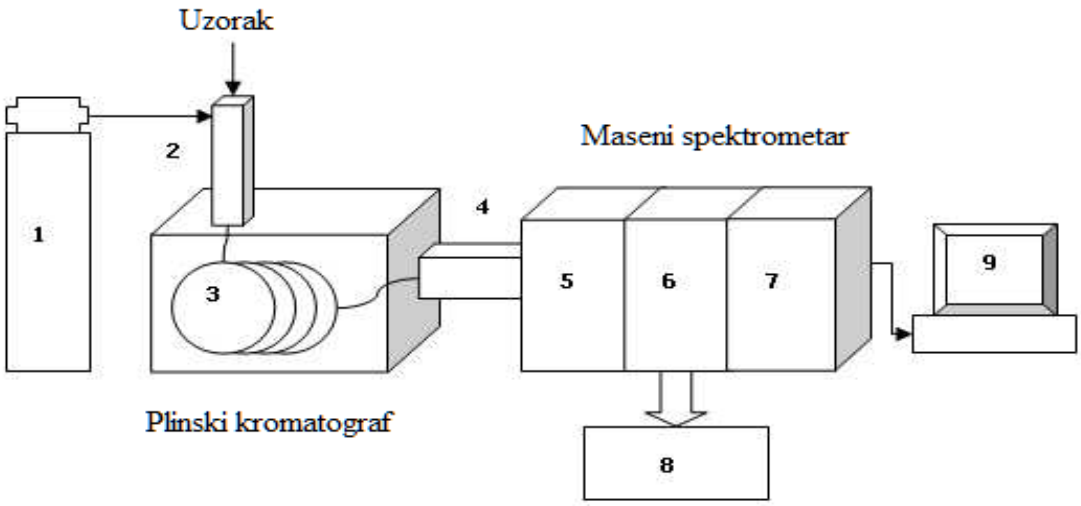
Kombinacijom ovih dviju metoda se može postići visoka osjetljivost te se mogu analizirati smjese s velikim brojem komponenti relativno velikom brzinom.

Osnovne komponente GC-MS sustava su:

- kromatograf,
- maseni spektrometar,
- prijelaz (interface) koji povezuje oba instrumenta.

Plinski kromatograf omogućuje razdvajanje smjese, prijelaz (interface) smanjuje tlak uzorka prije njegovog uvođenja u maseni spektrometar, dok maseni spektrometar daje potrebne podatke za identifikaciju komponenata (Tomljanović, 2000).

Na **Slici 16.** prikazana je opća shema GC-MS uređaja.



Slika 16. Opća shema uređaja za GC-MS (Ivanov, 2015)

1. boca s plinom nosačem
2. injektor
3. kapilarna kolona
4. veza između GC i MS
5. ionski izvor
6. maseni analizator
7. detektor
8. vakuum sustav
9. računalo

2.13. PROIZVODNJA SUHIH EKSTRAKATA PROCESOM LIOFILIZACIJE

Liofilizacija se zove još i sušenje zamrzavanjem (engl. *Freeze drying*) ili sublimacijsko sušenje. To je proces dehidratacije kod kojega se voda iz namirnice uklanja u smrznutom stanju u dvije faze, sublimacijom i izotermnom desorpcijom.

Sastoji se iz dva osnovna postupka:

1. namirnica se najprije zamrzne na temperaturu od -30 °C do -40°C;

2. zamrznuta namirnica se suši (vrši se sublimacija leda pri sniženom tlaku i desorpcija).

Proces liofilizacije ima dvije osnovne karakteristike:

- odsustvo zraka pri provođenju procesa,
- niska temperatura onemogućuje oksidacijsku razgradnju i degradaciju proizvoda (Mujić, Alibabić, 2005).

Liofilizacija je proces koji se sastoji od sublimacije (primarni stadij) i desorpcije (sekundarni stadij). Primarni stadij je neposredna sublimacija kristala leda iz prethodno zamrznutoga materijala, bez da se i u jednom trenutku pojavi voda u tekućem stanju. Kontrola procesa se provodi održavanjem ravnoteže između količine dovedene topline i one potrebne za sublimaciju, pa se zbog ove ravnoteže temperatura mora održavati konstantno niskom i proizvod mora biti konstantno smrznut. U ovom stadiju oslobađa se uglavnom tzv. "slobodna voda", a velikim dijelom oslobađa se i tzv. „konstitucijska voda".

Kod sekundarne dehidratacije, koja se zove i *stadij izotermne desorpcije*, provodi se zagrijavanje proizvoda na 30-60 °C, ovisno o vrsti proizvoda, ali nakon što su nestali i posljednji komadići leda. Zagrijavanje se provodi u vakuumu kroz određeno vrijeme. Sekundarnom dehidratacijom se iz materijala uklanja tzv. „kapilarna voda" i ostatak vode koji nije uklonjen primarnom dehidratacijom. Faza zamrzavanja i stadij sublimacije leda, odnosno primarno sušenje, imaju svoj završetak i može se odrediti njihovo vrijeme trajanja. Stadij primarnog sušenja završava u trenutku kada nestanu svi kristali leda. Međutim, stadij sekundarnog sušenja nema svoj završetak te je kao takav kontinuiran.

Najvažniji dio procesa liofilizacije je sama sublimacija, a njen tijek ovisi o brojnim faktorima. Jedan od njih su kristali leda, sačinjeni od molekula vode koje su povezane u pravilnu rešetku. Iako je molekula vode ograničena prostorom u svom položaju, ona se do određene vrijednosti može gibati, a to ovisi o temperaturi. Ako se molekula vode nalazi na površini materijala i podvrgne toplini, molekula može svladati okolne međumolekulske sile određenom brzinom i napustiti svoj položaj. Međutim, ako je takvih molekula više, događa se izdvajanje vode koja je u funkciji temperature. Većom temperaturom povećava se mogućnost njihovog izdvajanja. S obzirom da se materijal nalazi u zatvorenom prostoru, molekule vode koje ga napuste ostaju u tom prostoru i koncentriraju se. Napredovanjem sublimacije povećava se koncentracija molekula vode oko leda. Kada je njihova koncentracija dovoljno velika, brzina koncentracije izjednačava se s brzinom sublimacije (Mujić, Alibabić, 2005).

Dok je sama teoretska razrada principa spomenutih procesa i operacija relativno razvijena, dotle njihova primjena zahtijeva poznavanje određenih fizikalnih i fizikalno - kemijskih svojstava materijala (koji se podvrgava liofilizaciji). Među ta svojstva spadaju: toplinska vodljivost, toplinski kapacitet, latentna toplina topljenja i isparavanja, svojstvo sorpcije - uključujući izoterme sorpcije, topline sorpcije kod različitog sadržaja vlage i svojstvo histereze

- zatim permeabilnost prema toku pare i slično. Navedena svojstva su poznata pri primjeni uobičajenih metoda prijenosa topline (Lovrić, 2003).

Proizvodi dobiveni lioflizacijom, ako su pakirani na odgovarajući način, mogu se čuvati neograničeno vrijeme, a njihova fizikalna, kemijska, organoleptička i druga svojstva ostanu, praktično, neoštećena. Minimalan je gubitak vitamina, a topljivost proizvoda u prahu i rehidratacija su visokog stupnja. Također se može primijeniti na proizvode koji su osjetljivi na povišen udio vode i ostalim postupcima se ne mogu dovoljno osušiti. Sadržaj vlage se može sniziti na 2% kod velikog broja namirnica. Osim svih ovih prednosti, liofilizacijom se smanjuje masa proizvoda, što pojeftinjuje korištenje transporta i skladištenja (Mujić, Alibabić, 2005).

2.14. TABLETE S EKSTRAKTOM KONOPLJIKE

Tablete (*Tablettae*) su dozirani čvrsti oblici lijekova pripremljeni komprimiranjem praškastih, kristalnih ili granuliranih ljekovitih komponenti, samih ili pomiješanih sa pomoćnim sredstvima. Primjenjuju se oralno, a resorbiraju se u usnoj šupljini, želucu ili crijevima (*European Pharmacopoei*, 2007).

Proizvodnja tableta sastoji se od niza operacija, kao što su sušenje, aglomeracija, usitnjavanje, komprimiranje, oblaganje i poliranje. Tehnološki postupak proizvodnje tableta ovisi o osobinama farmakološki bioaktivnih tvari, pomoćnih komponenti za tabletiranje, opreme za proizvodnju i od zahtjeva koji se postavljaju za konačni oblik tablete (Zeković, 2004).

Prednosti tableta u odnosu na druge oblike gotovih lijekova su sljedeće:

- vrlo se jednostavno koriste;
- pogodni su za skladištenje i transport;
- bioaktivna tvar se može precizno dozirati u tabletu, a samim time i u terapiji;
- za njihovu izradu mogu se koristiti bioaktivne tvari u čvrstom i/ili tekućem stanju;
- proizvode se pomoću odgovarajućih uređaja u velikim količinama na ekonomičan način;
- dodatkom odgovarajućih pomoćnih tvari uglavnom je moguće utjecati na resorpciju;
- mogu se, kao suhi oblik lijeka, čuvati kroz duži period bez promjene (Senjković, 2003).

Pomoćne komponente za tabletiranje daju specifične osobine prahovima i granulatima koji se komprimiraju. One moraju biti kompatibilne s bioaktivnom tvari, kemijski stabilne, fiziološki

indiferentne i netoksične. Samo mali broj tvari može se direktno komprimirati bez dodavanja pomoćnih komponenti za tabletiranje. Pored pomoćnih komponenti za tabletiranje ponekad se prahovima i granulatima dodaju i puferi (citratni, fosfatni i dr.).

Pomoćne komponente za tabletiranje su, u ovisnosti od namjene i djelovanja, podijeljene u nekoliko grupa:

- sredstva za dopunjavanje,
- sredstva za adsorpciju,
- sredstva za vezanje,
- sredstva za klizanje,
- lubrikanti,
- sredstva za raspadanje,
- antistatička sredstva,
- sredstva za bojanje,
- sredstva za korekciju mirisa i okusa,
- sredstva za poliranje (Senjković, 2003).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovog rada realiziran je na Katedri za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale i Katedri za prehrambeno inženjerstvo na Prehrambeno tehnološkom fakultetu u Osijeku.

3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je:

- ispitati utjecaj različitih procesnih uvjeta ekstrakcije (tlak, temperatura, stupanj usitnjenosti čestica te protok fluida) na ekstraktibilnost eteričnog ulja iz ploda konopljike pomoću superkritičnog CO_2
- provesti proces hidrodestilacije ploda konopljike u cilju dobivanja eteričnog ulja
- pratiti promjenu kemijskog sastava ekstrakata dobivenih različitim tehnikama ekstrakcije i to primjenom plinske komatografije masene spektrometrije *(GC-MS*)
- proizvodnja suhih ekstrakata ploda konopljike procesom liofilizacije i formuliranje tableta prema *European Pharmacopoeia* (*Eur. Ph.*)

3.2. Materijali

3.2.1. Plod konopljike

Kao materijal u ovom radu korišten je osušeni plod konopljike *(Vitex agnus castus* L.) (**Slika 17.**), dobiven iz biljne ljekarne Vextra d.o.o. (Mostar, BiH) u srpnju 2015. godine.



Slika 17. Plod konopljike (Izvor autor)

3.2.2. Reagensi

Korišteni su sljedeći reagensi:

- Za laboratorijsku superkritičnu ekstrakciju korišten je komercijalni CO_2 čistoće 99,97% proizvođača Messer Croatia Plin (Osijek, Hrvatska).
- klasična organska otapala: *n*-heksan, p.a. (J.T. Baker, Milano, Italija), tehnički etanol
- korišteno otapalo za GC-MS analize je bio heksan (HPLC čistoće, BDH Prolabo, UK).

- Za proizvodnju tableta korištena je laktoza monohidrat (Fisher, UK), obični škrob, aerosil, magnezijev stearat.

3.2.3**.** Uređaji

- Sušionik (Instrumentaria, Zagreb)
- Soxhlet (INKO, Poljska),
- Mlin (Janke & Kunkel, IKA labortechnik, Njemačka),
- Analitička vaga (Denver instruments, Njemačka);
- Tehnička vaga (Kern, Njemačka);
- Uređaj za ekstrakciju superkritičnim CO_2 (Osijek, Hrvatska),
- Liofilizator Martin Christ GmbH, tip BETA I (Njemačka)
- Tabletirka, Tablet Press TDP-6s, LFA Machines Oxford Ltd.
- GC – MS uređaj (Agilent Technologies model 7890A, SAD)

3.3. **Metode rada**

3.3.1. Određivanje vlage u uzorku

Udio vlage u plodu konopljike određen je standardnom metodom AOAC 925.40 (2000). U osušenu, izvaganu posudicu odvagalo se 5 g ploda konopljike, te se uzorak u posudica sa podignutim poklopcem sušio u sušioniku na temperaturi 103 °C do konstantne mase. Posudica s uzorkom je zatim ohlađena u eksikatoru do sobne temperature. Udio vode u plodu izračunat je prema sljedećem izrazu:

$$udio\ vode\ (\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \quad \textbf{(1)}$$

gdje je:

m_0 – masa prazne posude (g),

m_1- masa posude s uzorkom prije sušenja (g),

m_2 – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g).

3.3.2. Usitnjavanje uzorka

Prije provođenja eksperimenta ekstrakcije, uzorak se usitnio na laboratorijskom mlinu (Janke & Kunkel, IKA labortechnik, Njemačka). Nakon usitnjavanja uzorka provedena je granulometrijska analiza na standardnoj seriji sita (Retsch AS 200) te je određena prosječna veličina čestica uzorka. 100 g usitnjenog biljnog materijala preneseno je na seriju standardnih sita. Sita su posložena tako da gornje sito ima najveće otvore, a zadnje sito je tzv. „slijepo sito“.

Prosijavanje se provodilo 30 minuta te se potom ponovno vagalo svako pojedino sito i izračunao srednji promjer čestica usitnjenog biljnog materijala prema jednadžbi **(2)**:

$$\frac{\mathbf{100}}{\mathbf{d}} = \sum \frac{\mathbf{m1}}{\boldsymbol{d1}} \quad (\%) \qquad \textbf{(2)}$$

gdje je:

d – promjer veličine čestica (mm)

mi - maseni udio *i-te* frakcije (%)

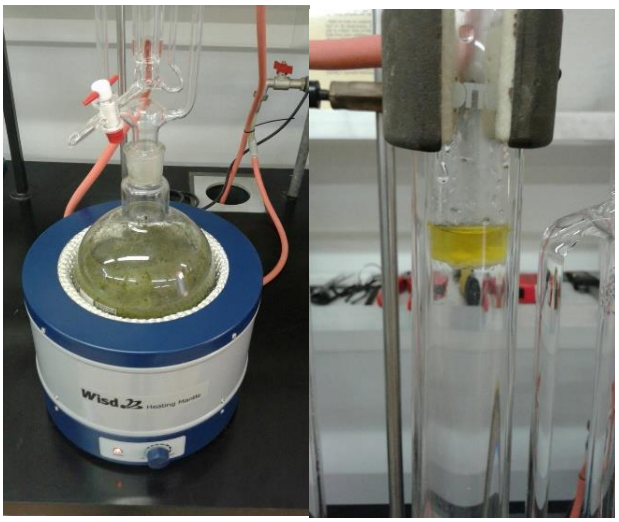
di - srednji promjer *i*-te frakcije (mm)

Tablica 5. Oznaka i veličina otvora sita

Broj sita	Veličina otvora sita (mm)
0	3,15
1	1,4
2	0,63
3	0,5
4	0,315
5	0,2
6	0,1
7	0,08
8	0,05
9	„slijepo sito“

3.3.3. Vodena destilacija

Na **Slici 18.** prikazana je aparatura korištena za laboratorijsko dobivanje eteričnog ulja postupkom vodene destilacije, tj. hidrodestilacije po Clevengeru. Usitnjeni plod konopljike (100 g) i 500 ml destilirane vode dodano je u tikvicu s okruglim dnom. Proces destilacije trajao je 4 h, tijekom kojeg je eterično ulje skupljano u gornjem graduiranom dijelu cijevi za mjerenje predestiliranog ulja. Nakon očitanja volumena, izdvojeno eterično ulje osušeno je s bezvodnim $MgSO_4$ i čuvano pri temperaturi 4-6 °C nekoliko dana. Nakon sušenja, uzorak je analiziran pomoću GC-MS.



Slika 18. Vodena destilacija ploda konopljike (Izvor autor)

3.3.4. Soxhlet ekstrakcija

Početni sadržaj ulja u usitnjenom plodu konopljike određen je ekstrakcijom organskim otapalima (*n*-heksan) u aparaturi po *Soxhlet*-u (**Slika 19**). Odvagano je oko 30 g usitnjenih uzoraka ploda konopljike u tuljak od filtar-papira koji je potom stavljen u ekstraktor. U tikvicu je dodano 250 mL *n*-heksana i provedena je ekstrakcija na sobnoj temperaturi 16 sati, nakon čega je dobiveni ekstrakt uparen na rotacijskom uparivaču. Svaki eksperiment s pojedinačnim otapalom proveden je u tri ponavljanja.



Slika 19. Soxhlet- ova aparatura za ekstrakciju (Izvor autor)

3.3.5. Ekstrakcija ploda konopljike superkritičnim CO_2

Superkritična ekstrakcija provedena je na novokonstruiranom uređaju za ekstrakciju superkritičnim fluidima (**Slika 20.**) čija je shema dana na **Slici 21**.

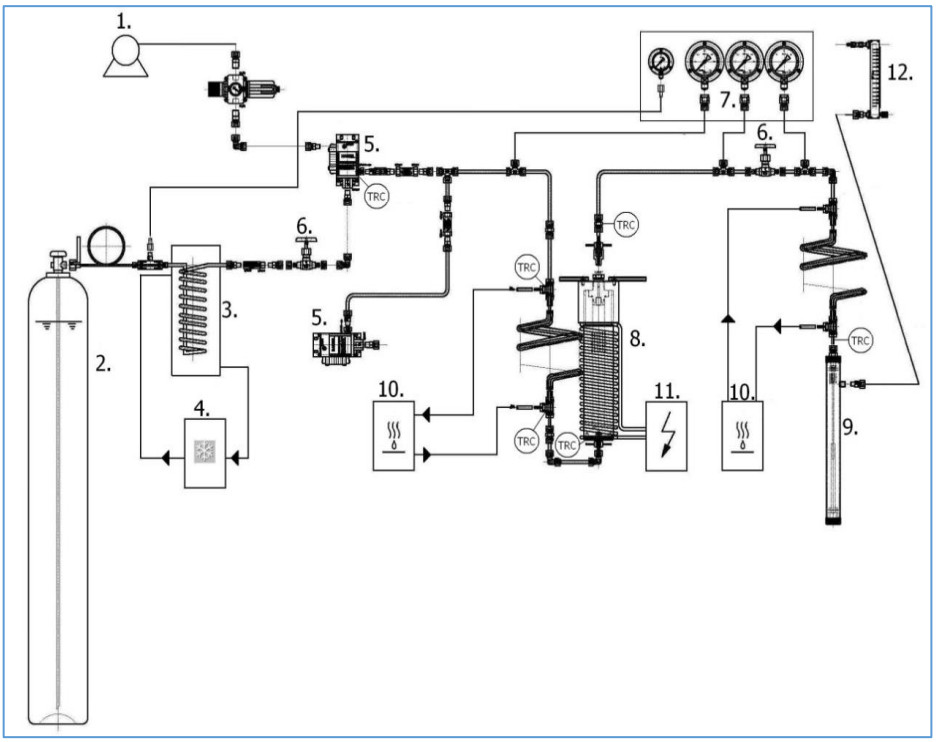
Dobivanje ekstrakata iz sjemenki konopljike superkritičnim CO_2 provelo se pri sljedećim procesnim uvjetima:

- tlak (100, 225, 350 bar),
- temperatura (40, 50, 60 °C),
- protok fluida (0,70, 1,94, 3,35 kg/h),
- veličina čestica (0,297, 0,393, 0,506 mm).

Prinos ekstrakta pratio se u određenim vremenskim intervalima (svakih 15 min) sve dok promjena mase dobivenog ekstrakta u dva uzastopna ciklusa nije izgubila statistički značaj, odnosno do konstantne mase ekstrakta. Razdvajanje CO_2 i ekstrakta provelo se u separatoru pri tlaku 15 bara i temperaturi 25 °C.



Slika 20. Uređaj za ekstrakciju superkritičnim CO_2 (Aladić, 2015)



Slika 21. Shematski prikaz novokonstruiranog uređaja za ekstrakciju superkritičnim CO_2

1. Kompresor; 2. CO_2 spremnik; 3. Izmjenjivač topline od nehrđajućeg čelika; 4. Rashladna kupelj; 5. Zrakom pogonjena hidraulična pumpa Haskel MS-71; 6. Ventili (B-HV); 7. Manometri; 8. Ekstraktor; 9. Separator; 10. Vodena kupelj; 11. Centralizirani sistem grijača od staklenih vlakana; 12. Mjerač protoka

3.3.6. Određivanje kemijskog sastava dobivenih ekstrakata

Dobiveni ekstrakti konopljike (*Vitex agnus castus* L.) ispitani su u odnosu na kvalitativni i kvantitativni sastav primjenom GC-MS analize. Za analizu isparljivih komponenti korišten je plinski kromatograf (Agilent Technologies, SAD), model 7890A u kombinaciji s Agilent Technologies (SAD) masenim detektorom, model 5975C, spojenim na računalo (**Slika 22**).



Slika 22. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) (Izvor autor)

Separacija komponenti provedena je na kapilarnim kolonama H5-5MS (dužine 30 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm, debljine sloja stacionarne faze 0,25 μm, J&W, SAD).
Korišteni su sljedeći uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS kolonu:

- temperaturni program kolone: 2 min izotermno na 70 ˚C, zatim porast temperature od 200 ˚C,
- energija ionizacije: 70 eV,
- temperatura ionskog izvora: 230 ˚C,
- interval snimanja masa: 45-450 masenih jedinica.

Za svaki analizirani uzorak, kao rezultat GC-MS analize dobiveni su sljedeći podaci:

- kromatogram ukupne ionske struje,
- naziv spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najsličniji spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje; sličnosti spektara koji se uspoređuju izraženi su vjerojatnošću u postotcima,
- vrijeme zadržavanja pojedine komponente,
- relativni udio pojedine komponente izražen u postotcima.

3.3.7. Dobivanje suhog ekstrakta konopljike postupkom liofilizacije

Za dobivanje tekućeg uzorka ploda konopljike korišteno je 100 g biljke i 500 ml otapala (1:5 omjer prema *Eur. Ph.*). 100.0 g osušenog ploda konopljike preliveno je sa 500 mL 50%-tne vodene otopine etanola. Tako pripremljena otopina je ostavljena 5 dana na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi, te je povremeno protresna. Alkoholni ekstrakt se zatim filtrirao kroz filter papir kako bi se uklonio bilo kakvo kruto onečišćenje.
Određen je udio suhe tvari u tekućem uzorku ploda konopljike koji je iznosio 1,41%.
Uzorak tekućeg ekstrakta ploda konopljike od 100 ml stavljen je u staklenu posudu i zamrznut pri temperaturi od - 45°C. Nakon zamrzavanja uzorak je dehidriran u liofilizatoru GAMMA 2-20, tvrtke Martin Christ (Njemačka) (**Slika 23**). Temperatura sublimacije iznosila je oko -50 °C, a tlak u komori 0,180 mbar. Tijekom procesa izotermne desorpcije maksimalna temperatura u komori bila je 20 °C uz tlak od 0,001 mbar. Proces sušenja ukupno je trajao 36 h.



Slika 23. Liofilizator (Izvor autor)

3.3.8. Proizvodnja tableta

Za izradu tableta korišten je suhi ekstrakt ploda konopljike dobiven procesom liofilizacije. Pojedinačna formulacija tableta imala je sljedeći sastav: laktoza 74,5 g, obični škrob 50,0 g i aerosil 3,0 g, te dodatka suhog ekstrakta u iznosu od 2,0 g i magnezijevog stearata u količini od 1,5 mg. Na ovaj način je pripremljena smjesa za dobivanje tableta. Propuštanjem pripremljene smjese kroz uređaj za tabletiranje (**Slika 24**) dobivene su biljne tablete.



Slika 24. Tabletirka (Izvor autor)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ODREĐIVANJE UDJELA VLAGE U PLODU KONOPLJIKE

Udio vlage u plodu konopljike određen standardnom metodom AOAC 925.40 i izračunat prema izrazu **(1)** iznosio je 11,18%.

4.2. ODREĐIVANJE SREDNJEG PROMJERA ČESTICA

Prosječna veličina čestica usitnjenog uzorka biljnog materijala određena je pomoću izraza **(2)** te je na ovaj način ispitivani uzorak pripremljen za operaciju ekstrakcije.

Tablica 6. Prosječna veličina čestica u usitnjenim uzorcima ploda konopljike

Broj sita	Veličina otvora sita (mm)	Masa uzorka na pojedinom situ (1*)		Masa uzorka na pojedinom situ (2*)		Masa uzorka na pojedinom situ (3*)	
		Uzorak A	Uzorak B	Uzorak A	Uzorak B	Uzorak A	Uzorak B
0	3,15	0	0	0	0	0	0
1	1,4	0,03	0,32	0,83	0,82	36,67	27,11
2	0,63	1,25	0,90	35,34	34,92	11,51	23,63
3	0,5	12,96	12,54	9,47	9,91	7,71	17,28
4	0,315	29,22	27,64	17,31	17,22	5,37	5,06
5	0,2	16,34	16,94	10,6	10,56	13,02	7,1
6	0,1	16,62	14,93	12,35	11,69	10,02	8,02
7	0,08	7,26	6,91	2,97	5,26	5,14	3,01
8	0,05	2,63	2,82	3,93	5,93	2,86	2,05
9	„slijepo sito“	0,73	4	7,2	3,69	3,28	2,32

- (1*) Najmanja veličina čestica
- (2*) Srednja veličina čestica
- (3*) Najveća veličina čestica

Najmanja veličina čestica izračunata prema izrazu (2) dobivena iz dva ponavljanja iznosi 0,2973 mm.

Srednja veličina čestica izračunata prema izrazu (2) dobivena iz dva ponavljanja iznosi 0,3936 mm.

Najveća veličina čestica izračunata prema izrazu (2) dobivena iz dva ponavljanja iznosi 0,5062 mm.

4.3. EKSTRAKCIJA PLODA KONOPLJIKE PRIMJENOM RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE

Provedena je ekstrakcija ploda konopljike superkritičnim CO_2. Usitnjeni biljni materijal (100 g) ekstrahiran je superkritičnim CO_2 pri različitim procesnim parametrima (**Tablica 7)**. Vrijeme trajanja ekstrakcije iznosilo je 150 min po ekstrakciji (bazirano na preliminarnim istraživanjima).

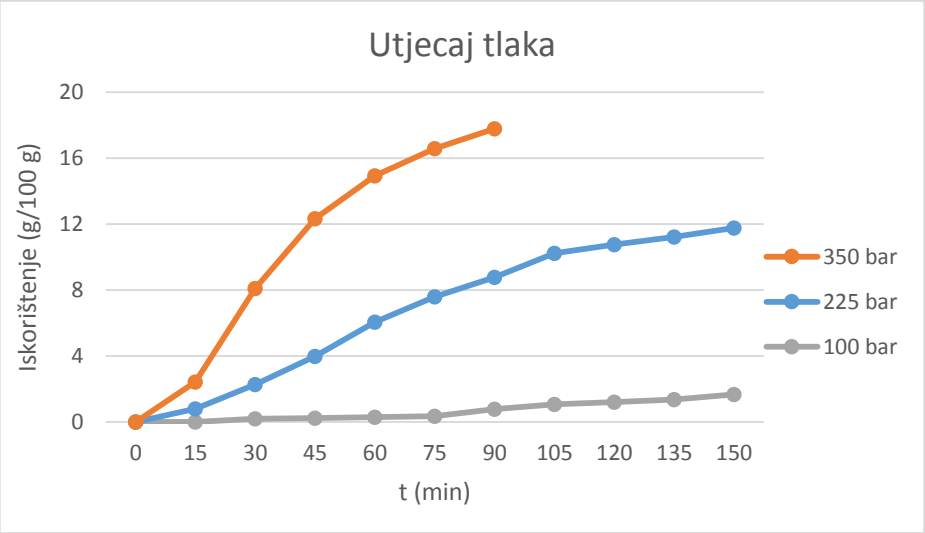
Tablica 7. Prinosi dobivenih ekstrakta primjenom različitih metoda i uvjeta ekstrakcije

Broj eksperimenta	p (bar)	T (°C)	m_f (kg/h)	d_0 (mm)	Ukupan prinos ekstrakta (%)
SFE 1	350	40	1,95	0,393	8,94
SFE 2	225	40	1,95	0,393	10,10
SFE 3	225	50	1,95	0,393	10,89
SFE 4	225	60	1,95	0,393	12,27
SFE 5	225	40	1,95	0,506	5,54
SFE 6	225	40	3,35	0,393	11,22
SFE 7	100	40	1,95	0,393	1,66
SFE 8	225	40	1,95	0,297	9,14
SFE 9	225	40	0,70	0,393	5,84
SOXHLET					9,19
HIDRODESTILACIJA					0,40

Iz rezultata prikazanih u **Tablici 7.** može se zaključiti kako s porastom tlaka i temperature u procesu SFE raste i prinos ekstrakcije, pa tako pri tlaku od 225 bar i temperaturi od 60°C ostvareni prinos iznosi 12,27%, dok je pri tlaku od 100 bar i na temperaturi od 40 °C ostvaren prinos od 1,66%. Prinosi rastu zbog toga što se povećanjem tlaka ekstrakcije povećava i gustoća CO_2, odnosno povećava se topljivost ekstrakta ploda konopljike u superkritičnom CO_2. Prinos ekstrakta dobiven standardnom Soxhlet-ovom metodom iznosi 9,19%, a udio eteričnog ulja dobivenog hidrodestilacijom tek 0,4%.

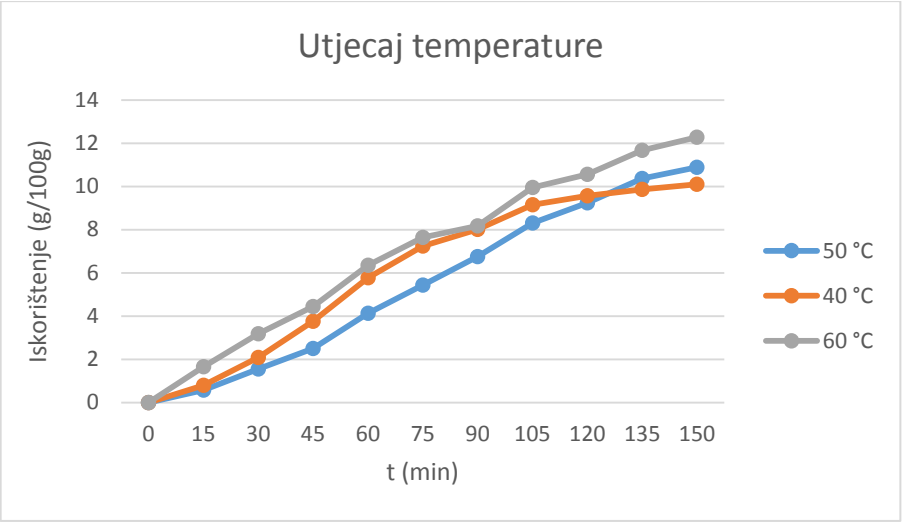
4.4. UTJECAJ RAZLIČITIH PROCESNIH PARAMETARA SUPERKRITIČNE EKSTRAKCIJE NA PRINOS EKSTRAKTA PLODA KONOPLJIKE

Prikazane ekstrakcije provedene su na laboratorijskom uređaju, volumena ekstraktora 0,5 L (**Slika 20**). Korišteni su tlakovi od 100, 225 i 350 bar, dok je temperatura ekstrakcije bila konstantna i iznosila 40 °C. Maseni protok superkritičnog CO_2 iznosio je 1,95 kg/h.



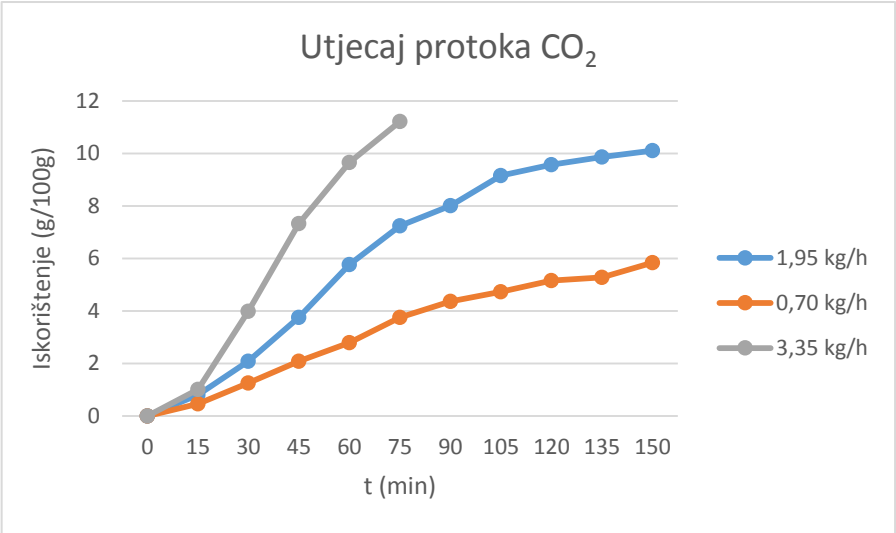
Slika 25. Utjecaj tlaka ekstrakcije na ekstraktibilnost ulja iz ploda konopljike (veličina čestica: 0,506 mm) pomoću superkritičnog CO_2 pri temperaturi ekstrakcije 40°C i protoku CO_2 1,95 kg/h

Pri konstantnom vremenu ekstrakcije, prinos ekstrakta raste sa povećanjem tlaka, zbog veće učinkovitosti otapala na višim tlakovima, što je posljedica povećanja gustoće CO_2, od najmanjeg do najvišeg ispitivanog tlaka. Povećanjem gustoće superkritičnog CO_2 raste njegova moć otapanja, odnosno povećava se topljivost ulja u superkritičnom CO_2. Ispitivane su temperature 40, 50 i 60 °C.



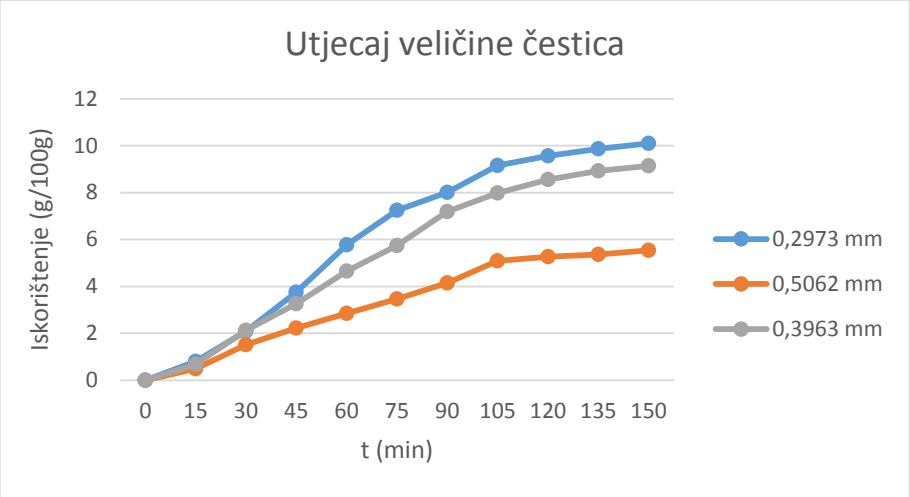
Slika 26. Utjecaj temperature ekstrakcije na ekstraktibilnost ulja iz ploda konopljike (veličina čestica:0,393 mm) pomoću superkritičnog CO_2 pri tlaku ekstrakcije 225 bar i protoku CO_2 0,70 kg/h

Prinosi ekstrakata superkritičnim CO_2 nakon 150 min ekstrakcije pri 40, 50 i 60 °C iznosili su redom 10,10; 10,89 i 12,27%, iz čega je vidljivo da povećanje temperature pri tlaku 225 bara dovodi do povećanja prinosa ulja, ali dobivene razlike u prinosima nisu statistički značajne. Povećanje temperature utjecat će na povećanje topljivosti ulja u superkritičnom CO_2, iako se gustoća superkritičnog fluida smanjuje, zbog većeg utjecaja temperature na porast tlaka pare ulja.



Slika 27. Utjecaj protoka CO_2 na ekstraktibilnost ulja iz ploda konopljike (veličina čestica: 0,393 mm) pomoću superkritičnog CO_2 pri tlaku ekstrakcije 225 bar i temperaturi 40 °C

Na Slici 27. je vidljivo da prinos ulja na početku raste s povećanjem protoka CO_2 (period brze ekstrakcije) te je potrebno kraće vrijeme ekstrakcije pri višem protoku kako bi se dobili isti prinosi ulja. Trajanje perioda konstantne brzine ekstrakcije smanjeno je sa 150 min na 60 min s povećanjem masenog protoka CO_2 od 0,70 kg/h do 1,95 kg/h.



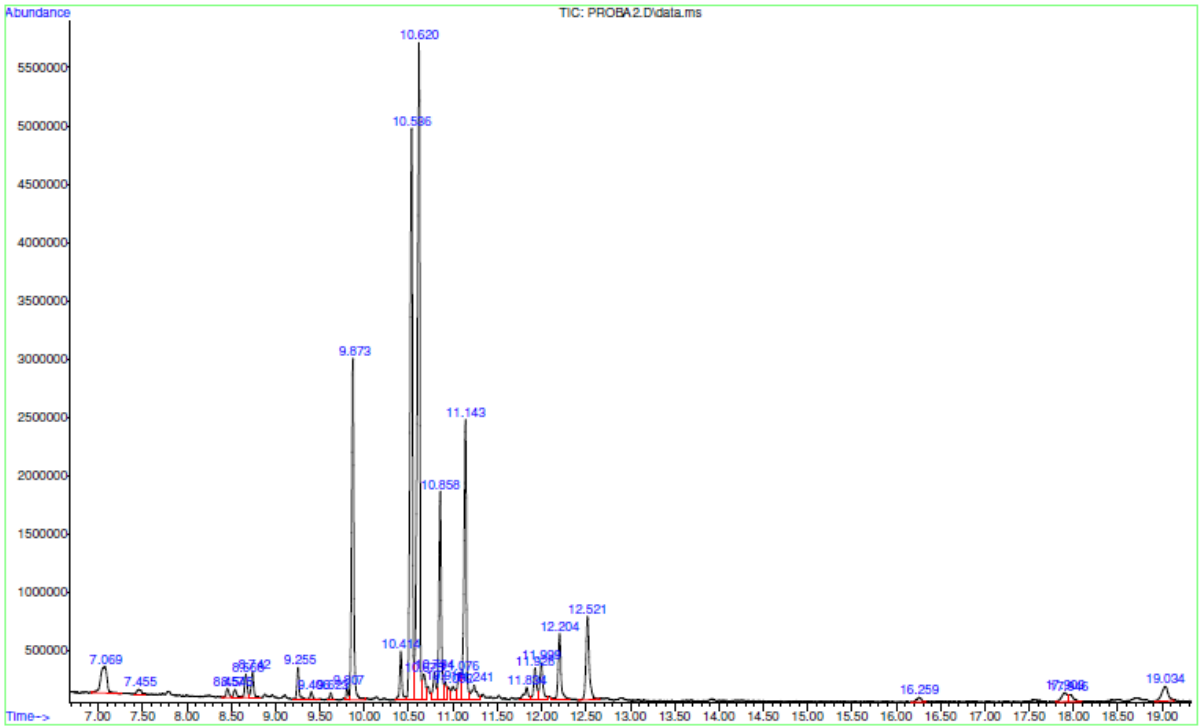
Slika 28. Utjecaj veličine čestica na ekstraktibilnost ulja iz ploda konopljike pomoću superkritičnog CO_2 pri tlaku ekstrakcije 225 bar, temperaturi ekstrakcije 40° C i protoku CO_2 1,95 kg/h

Promjena prinosa ekstrakta, u vremenu ekstrakcije, *t*, praćena je za tri različite klase čestica srednjeg promjera 0,5062 mm, 0,3936 mm i 0,2973 mm (**Slika 28**).

Na samom početku procesa, brzina ekstrakcije ulja iz ploda konopljike ne ovisi o veličini čestica što odgovara pretpostavkama da na brzinu procesa u prvom dijelu utječu fazna ravnoteža i topljivost ulja u superkritičnom fluidu. To je posebno izraženo za čestice veličine 0,3936 mm i 0,5062 mm gdje je i nakon prvih 75 min količina ekstrahiranog ulja gotovo identična. Najveća količina ulja ekstrahirana je iz najmanje klase čestica (0,2973 mm), a najmanja iz najveće klase čestica (0,5062 mm), budući da smanjenje promjera čestica dovodi do povećanja brzine difuzije, odnosno do smanjenja difuznog puta što ubrzava proces ekstrakcije.

4.5. GC-MS PROFIL DOBIVENIH EKSTRAKATA

Primjenom GC-MS analize izvršena je kvalitativna i kvantitativna analiza ekstrakata ploda konopljike, čiji su rezultati prikazani u **Tablici 8**., a odabrani kromatogram je prikazan na **Slici 29**.



Slika 29. Primjer kromatograma za eterično ulje konopljike

Tablica 8. Kemijski sastav dobivenog ekstrakta *Vitex agnus castus* pomoću superkritičnog CO_2 i eteričnog ulja primjenom hidrodestilacije izražen u %

Broj	Komponenta	Rt	Uzorak **SFE 2** 225 bar 40°C 2 kg/h 0,393 mm	Uzorak **SFE 3** 225 bar 50°C 2 kg/h 0,393 mm	Uzorak **SFE 4** 225 bar 60°C 2 kg/h 0,393 mm	Uzorak **SFE 7** 100 bar 40°C 2 kg/h 0,393 mm	**Eterično ulje**
1.	α-Pinen	12,333 940	0,4	1,4	0,5	0,3	0,7
2.	Sabinen	13,7 978	3,1	6,5	2,6	2,2	0,5
3.	β-Pinen	14,118 981	0,1	0,5	0,2	0,2	0,1
4.	α-Terpinen	15,222 1021	0,1	0,1	0,1	0,1	-
5.	*p*-Cimen	15,537 1026	0,1	0,2	0,2	0,1	-
6.	Limonen	15,708 1038	0,9	0,7	0,1	0,4	-
7.	1,8-Cineol	15,897 1033	7,6	10,7	7,8	6,8	4,9
8.	γ-Terpinen	16,801 1063	0,1	0,2	0,3	0,2	-
9.	*cis*-Sabinen hidrat	17,362	0,1	-	-	0,2	-

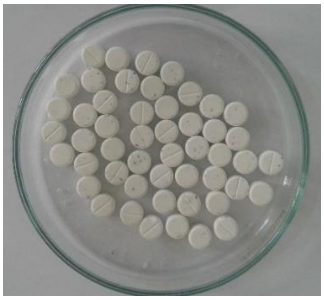
		1070					
10.	*trans*-Sabinen hidrat	18,541 1102	0,1	0,1	0,1	0,3	-
11.	β-Tujon	18,735 1105	-	-	-	-	1,9
12.	α-Tujon	19,165 1102	-	-	-	-	1
13.	Kamfor	20,395 1145	-	-	-	-	3,3
14.	Borneol	21,316 1168	-	-	-	-	3
15.	Terpinen-4-ol	21,78 1181	0,4	0,8	1,1	0,7	0,5
16.	α-Terpineol	22,357 1193	0,7	0,5	0,6	0,5	0,5
17.	Bornil acetat	25,877 1286	0,1	-	-	0,1	1,8
18.	α-Terpinil acetat	28,354 1354	8,9	7,9	8	8,6	6,8
19.	α-Gurjunen	30,797 1409	2,3	2	2,1	2,1	0,9
20.	*trans*-Kariofilen	31,272 1421	16,3	14,5	14,5	15,9	10,7
21.	*trans*-α-Bergamot	31,593 1438	0,2	0,1	0,1	0,4	0,1
22.	α-Humulen	32,491 1456	1,1	0,9	0,9	1	15,6
23.	*trans*-β-Farnezen	32,256 1460	18,4	16,5	16,7	19,3	7,6
24.	Aromadendren	32,789 1441	4,3	3,8	3,9	4,4	2,8
25.	γ-Kurkumin	33,195 1480	-	0,3	-	-	-
26.	α-Kurkumin	33,321 1484	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1
27.	Germakren D	33,51 1481	0,3	0,4	0,4	0,4	-
28.	Biciklogermakren	34,082 1495	9,6	8,8	9,6	9,5	2,4
29.	δ-Kadinen	34,625 1513	0,1	0,3	0,1	0,3	0,5
30.	Palustrol	36,794 1567	0,8	0,6	0,6	0,7	0,3
31.	Spatulenol	37,229 1577	2,9	2,1	6,9	2,5	3,3
32.	Kariofilen oksid	37,338 1581	4,5	3,8	4,2	3,6	7,3
33.	Viridiflorol	37,629 1591	3,5	3,3	3,9	3,3	16,70
34.	α-Humulen oxid	38,184 1601	-	-	-	-	5,2
35.	α-Kadinol	39,312 1652	6,7	5,1	2,5	5,5	1,1
36.	Cembren A	47,103 1941	2,1	0,6	1,9	-	-

RI = Retencijski indeks kod alkana C9-C25 na HP-5MS koloni; - = komponente nisu identificirane

Sastav eteričnog ulja dobivenog postupkom vodene destilacije (**Tablica 8**.) je znatno različit od sastava superkritičnih ekstrakata, što je očekivano. Viridiflorol je pronađen kao glavni sastojak eteričnog ulja (16,7%), dok je u superkritičnom ekstraktu bio prisutan u otprilike 5 puta manjoj količini (3,3% -3,9%), a α-humulen oksid bio je prisutan samo u eteričnom ulju (5,2%). Ovi rezultati pokazuju da se α-humulen oksid i viridiflorol mogu smatrati artefaktima koji su nastali tijekom hidrodestilacije iz odgovarajućih ugljikovodika seksviterpena (α-humulen i biciklo-germakren) koji su pronađeni kao glavni spojevi u ekstraktu, ali u manjom količini u eteričnom ulju. α-Humulen dominira u eteričnom ulju (15,6%), vjerojatno nastao iz trans-kariofilena ili trans-beta-farnezena čiji su postoci niži u eteričnom ulju (10,7%; 7,6%), u usporedbi s ekstraktima. Postoci seskviterpena poput kariofilen oksida i spatulenola također su povišeni u eteričnom ulju, kao i bornil acetat. β-Tujon (1,9%), α-tujon (1,0%), kamfor (3,3%) i borneol (3,0%), pronađeni su samo u eteričnom ulju. Budući da je postotak monoterpena 1,8-cineol bio niži (4,9%) u odnosu na većinu ekstrakata (7,6% -10,7%) na tlaku od 225 bar, moguće je da svi ti monterpeni nastaju tijekom hidrodestilacije nakon *epoksida otvor preko* α-terpeniola, α-terpenil kationa ili terpinen-4-il kationa. Općenito, rezultati potvrđuju da SC-CO_2 spriječava degradaciju termolabilnih i vodotopljivih spojeva ili hidrolizu topljivih ili labilnih spojeva u vodi. Iz **Tablice 8**. vidljivo je da tlak i temperatura imaju značajan utjecaj na količinu dobivenih isparljivih komponenti u ekstraktu. Primjerice pri tlaku od 225 bara i temperaturi od 50°C dobivena je veća količina α-pinena (1,4%) i sabinena (6,5%) dok je pri tlaku od 100 bara i temperaturi od 50°C udio α-pinena 0,3%, a sabinena 2,2%. Međutim, pri tlaku od 100 bara dobivena je veća količina isparljivih komponenti poput trans-β-farnezena (19,3%) i aromadendrena (4,4%), dok je pri tlaku od 225 bara udio trans-β-farnezena 16,5%, a aromadendrena 3,8%.

4.6. TABLETE NA BAZI EKSTRAKTA KONOPLJIKE

Prema metodi opisanoj u poglavlju 4.3.8. dobivene su biljne tablete (**Slika 30**) na bazi ekstrakta ploda konopljike. Daljnja istraživanja trebala bi se odnositi na određivanje standardnih parametara tableta kao što su izgled, masa, topljivost i tvrdoća tableta, te udjela aktivnih komponenata u njima.



Slika 30. Dobivene tablete

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Ispitivani plod konopljike sadrži 11,18% vlage,
- Primjenom standardne Soxhlet-ove metode iz ploda konopljike izolirano je 9,19% ulja,
- Postupkom hidrodestilacije iz ploda konopljike izolirano je eterično ulje u prinosu od 0,40%,
- Dobivene eksperimentalne vrijednosti prinosa ekstrakta iz ploda konopljike dobivenim superkritičnim CO_2 kretale su se u rasponu od 1,66% do 12,27% za ispitane procesne uvjete ekstrakcije,
- Ispitivanjem utjecaja tlaka na prinose ekstrakta vidljivo je da povećanjem tlaka raste i prinos ulja jer povećanjem tlaka ekstrakcije povećava se i gustoća CO_2, odnosno povećava se topljivost eteričnog ulja u superkritičnom CO_2,
- Iz ekstrakcionih krivulja vidljiva su tri perioda ekstrakcije: početni period ekstrakcije (brzi period), zatim drugi period u kojem dolazi do usporavanja brzine procesa ekstrakcije te potom slijedi razdoblje spore brzine ekstrakcije, gdje je glavni mehanizam prijenosa tvari difuzija,
- Primjenom većeg protoka CO_2 vrijeme ekstrakcije se značajno skraćuje,
- Najveća količina ulja ekstrahirana je iz najmanje klase čestica (0,2973 mm), a najmanja iz najveće klase čestica (0,5062 mm), budući da smanjenje promjera čestica dovodi do povećanja brzine difuzije, odnosno do smanjenja difuzionog puta što ubrzava proces ekstrakcije,
- Utvrđeno je da eterično ulje ploda konopljike ima veoma kompleksan kemijski sastav, a identificirani spojevi spadaju u monoterpenske, seskviterpenske i diterpenske spojeve, odnosno njihove ugljikovodike, alkohole, estere, kiseline, karbonilne spojeve i okside,
- Usporedbom sastava eteričnog ulja dobivenog postupkom vodene destilacije i superkritičnih ekstrakata pronađene su očite razlike u količini pojedinih spojeva poput viridiflorola koji je glavni sastojak eteričnog ulja i α- humulena koji također dominira u eteričnom ulju, dok je u superkritičnom ekstraktu zastupljen u znatno manjoj količini.

6. LITERATURA

Abbas KA, Mohamed A, Abdulamir AS, Abas HAA: Review on supercritical fluid extraction as new analytical method. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4:345-353, 2008.

Abdel-Lateef EES, Hammam OA, Mahmoud FS, Atta SA, El-Sayed MM, Hassenein HI: Induction of apoptosis in HepG2 by *Vitex agnus-castus* L. leaves extracts and identification of their active chemical constituents by LC-ESI-MS, Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 6: 539-548, 2016.

Ahmed J, Rahman MS: *Handbook of Food Process Design*. Wiley-Blackwell, Chichester, 2012.

Aladić K: Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis Sativa* L.) ulja superkritičnim CO_2 iz pogače nakon hladnog prešanja. *Doktorska disertacija.* Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.

Asdadi A, Hamdouch A, Oukacha A, Moutaj R, Gharby S, Harhar H, El Hadek M, Chebli B, Idrissi Hassani LM: Study on chemical analysis, antioxidant and in vitro antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L. seeds growing in area of Argan Tree of Morocco against clinical strains of *Candida* responsible for nosocomial infections, *Journal of Medical Mycology*, 25: 118-127, 2015.

Baser KHC, Buchbauer G: Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, *CRC press*, 2009.

Brunner G: Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering* 67:21-33, 2005.

Buhler DR, Miranda C: Antioxidant Activities of Flavonoids. Oregon State University: The Linus Pauling Institute, 2000.

Cossuta D, Simandi B, Vagi E, Hohmann J, Prechl A, Lemberkovics E, Kery A, Keve T: Supercritical fluid extraction of *Vitex agnus castus* fruit. *The Journal of Supercritical Fluids* 47: 188-194, 2008.

Capuzzo A, Maffei ME, Occhipinti A: Supercritical Fluid Extraction of Plant Flavors and Fragrances. *Molecules* 18:7194-7238, 2013.

Demirbas A: Supercritical fluid extraction and chemicals from biomass with supercritical fluids. *Energy Conversion & Managment* 42:279-294, 2001.

Dogan Y, Ugulu I, Durkan N, Unver MC, Mert HH: Determination of some ecological characteristics and economical importance of *Vitex agnus-castus*. *Eurasia Journal of Biosciences* 5: 10-18, 2011.

Dragović-Uzelac V: Eterična ulja, Predavanja, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2013.

European Pharmacopoeia (*Ph. Eur. V*): Agencija za lijekove i medicinske proizvode, Zagreb, 2007.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ: Flavonoid antioxidants: chemistry. Metabolism and structure-activity relationships. *Journal Nutrition Biochemistry* 13, 572-584, 2002.

Ivanov D: Gasna kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS) http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/gasna-hromatografija-masena-spektrometrija-gc-ms (09.05.2015.)

Ivanovic J, Ristic M, Skala D: Supercritical CO_2 extraction of *Helichrysum italicum*: influence of CO_2 density and moisture content of plant material. *The Journal of Supercritical Fluids* 57, 129-136, 2011.

Jerković I: Fitoterapeutski pripravci i spojevi s protutumorskim djelovanjem. Skripta, *Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu*, Split, 2008.

Jokić S: Matematičko modeliranje ekstrakcije ulja iz zrna soje superkritičnim CO_2. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.

Katiraee F, Mahmoudi R, Tahapour K, Hamidian G, Emami SJ: Biological Properties of *Vitex agnus-castus* Essential Oil (Phytochemical Component, Antioxidant and Antifungal Activity), *Biotechnology and Health Science*, 2(2): e26797, 2015.

Krešić M: Idejni tehnološki projekt pogona za proizvodnju eteričnih ulja smilja i lavande. Završni rad, *Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Mostaru*, 2014.

Latouia M, Aliakbarian B, Casazza AA, Seffen M, Converti A, Perego P: Extraction of phenolic compounds from *Vitex agnus-castus* L. *Food and Bioproducts processing*, 90: 748–754, 2012.

Lesinger I: Kućna biljna ljekarna, Rijeka. Adamić, str. 225-228, 649-651, 577-580, 2006.

Liu RH: Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *The Journal of Nutrition,* 3479S-3485S, 2004.

Liu J, Burdette JE, Sun Y, Deng S, Schlecht SM, Zheng W, Nikolic D, Mahady G, Breemen RB, Fong HHS, Pezzuto JM, Bolton JL, Farnsworth NR: Isolation of linoleic acid as an estrogenic compound from the fruits of *Vitex agnus-castus* L. (chaste-berry)**.** *Phytomedicine*; 11: 18-23, 2004.

Lovrić T: Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva. Hinus, Zagreb, 2003.

Maksimovic S, Kesic Z, Lukic I, Milovanovic S, Ristic M, Skala D: Supercritical fluid extraction of curry flowers, sage leaves, and their mixture. *The Journal of Supercritical Fluids* 84, 1-12, 2013.

Mann J, Davidson RS, Hobbs JB, Banthorpe DV, Harborne JB: Natural products: their chemistry and biological significance. *Longman Scientific & Technical*, 10: 60, 1994.

Mele A, Lentz H, Mele A, Feizlmayr E, Abazi S, Bauer R: Extraction of rotundifuran and casticin from chaste tree fruits by near critical liquid carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*, 79: 123-126, 2013.

Molnar M, Čaćić M: Biološka aktivnost derivata kumarina – pregledni rad. *Croatian Journal of Science Technol*ogy 3 (2): 55-64, 2011.

Mujić I, Alibabić V: Tehnološki procesi konzerviranja hrane. Biotehnički fakultet, Bihać, str. 120-126, 2005.

Naczk M, Shahidi F: Phenolics in cereals, fruits and vegetables: ccurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 1523-1542, 2006.

Newman AA: Chemistry of terpenes and terpenoids. *Academic press*, London & New York, 1972.

Petričić J: Farmakognozija I. dio, *Sveučilište u Zagrebu*, 109-144, Zagreb, 1970.

Politeo O: Sezonske varijacije kemijskog sastava i biološka aktivnost eteričnog ulja smilja, Helychrysum italicum (Roth) G.Don., Magistarski rad, *Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu*, 2003.

Rot T: Optimizacija procesa proizvodnje lješnjakovog ulja. *Diplomski rad.* Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.

Ruzicka L: The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia 9*, 10, 357-367, 1953.

Temelli F: Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *Journal of Supercritical Fluids* 47:583-590, 2009.

Tomljanović M: Instrumentalne kemijske metode I. dio.“ *Hijatus*, Zenica, 2000.

Sarikurkcu C, Arisoy K, Tepe B, Cakir A, Abali G, Mete E: Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey, Food and Chemical Toxicology; 47: 2479-2483, 2009.

Sell C: Poglavlje: Chemistry of Essential Oils. U Knjizi: Handbook of essential oils : science, technology, and applications. Uredili: Baser, KHC, Buchbauer G. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2010.

Senjković R: Osnove oblikovanja lijekova. Školska knjiga, Zagreb, 2003.

Stojković D, Soković M, Glamočlija J, Džamić Ćirić A, Ristić M, Grubišić D: Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils, *Food Chem*istry 128(4), 1017–1022, 2011.

Zeković Z, Vidović S, Radojković M, Tepić A, Šumić Z, Jokić S, Rajić M: Dry extracts of *Satureja Montana*, their benefitial compounds and properties, and possible applications. In *International Conference XIV Ružička days. Today Science- Tomorrow Industry*, Vukovar, str. 100, 2012.

WEB – literatura:

WEB 1 - http://www.plantea.com.hr/konopljika/ (Pristupljeno 9.9.2016.)

WEB 2 - https://www.google.hr/search?q=kumarini&espv=2&biw=1366&bih=613&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjSqNX_6JnPAhUBkBQKHe2DCboQ_AUIBigB#imgrc=Q81KBiB5sa-ZHM%3A (Pristupljeno 18.9.)

WEB 3 - http://www.koval.hr/blogeky/ljekovite%20biljke/konopljika.html (Pristupljeno 10.9.2016.)