

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Aleksandra M. Bogdanović

**DOBIJANJE, KARAKTERIZACIJA I
OPTIMIZACIJA HIPOLIPEMIJSKIH
EKSTRAKATA MATIČNJAKA (*Melissa
officinalis*) I GRČKOG SEMENA (*Trigonella
foenum-graecum*) NATKRITIČNIM
UGLJENIK (IV)-OKSIDOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Aleksandra M. Bogdanović

**OBTAINING, CHARACTERIZATION AND
OPTIMIZATION OF HYPOLIPIDEMIC
EXTRACTS OF LEMON BALM (*Melissa
officinalis*) AND FENUGREEK (*Trigonella
foenum-graecum*) USING SUPERCRITICAL
CARBON DIOXIDE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Mentor:

dr **Slobodan Petrović**, profesor emeritus
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr **Irena Žižović**, redovni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr **Vanja Tadić**, naučni savetnik
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“

dr **Jasna Ivanović**, naučni saradnik
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Kandidat:

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za organsku hemijsku tehnologiju i Katedri za organsku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Želela bih da izrazim veliku zahvalnost i poštovanje svom mentoru, dr Slobodanu Petroviću, profesoru emeritusu Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na sveobuhvatnom angažovanju i podršci, stručnoj pomoći i korisnim savetima tokom izrade ove doktorske disertacije.

Sa posebnim zadovoljstvom želim da zahvalim dr Vanji Tadić, naučnom saradniku Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, na aktivnom učestvovanju u analizi dobijenih rezultata, kao i svim drugim segmentima naučno-istraživačkog rada.

Takođe se zahvaljujem dr Ireni Žižović, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na dobronamernim sugestijama i značajnim savetima koji su značajno poboljšali završnu verziju ove disertacije.

Od srca i najiskrenije se zahvaljujem dr Dejanu Skali, redovnom profesoru u penziji Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na svesrdnoj pomoći i nesebičnom trudu tokom tumačenja rezultata i analizi, koji je svojim neizmernim iskustvom i znanjem značajno doprineo realizaciji ovog naučno-istraživačkog rada, njegovom kvalitetu, kao i celokupnom kvalitetu i realizaciji disertacije. Pre svega se zahvaljujem na velikoj prijateljskoj podršci, razumevanju i nesebičnom prenetom znanju, koje sam stekla tokom zajedničke saradnje na naučno-istraživačkom radu tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svim kolegama na Katedri za organsku hemijsku tehnologiju i Katedri za organsku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na svakoj pomoći i prijateljskoj atmosferi tokom naučno-istraživačkog rada na ovoj disertaciji.

Veliko hvala brojnoj porodici i prijateljima čija podrška i ljubav su uvek bili podsticaj u svakom napredovanju, kao što je i izrada ove doktorske disertacije.

Neizmernu zahvalnost od sveg srca dugujem mojim najbližima, roditeljima Vladanki i Miroslavu, koji su mi usadili životne vrednosti i uvek verovali u mene i bili neizmerna podrška i oslonac, koji su me sve vreme podržavali da istrajem u svojim ciljevima tokom života, celokupnog školovanja i tokom izrade ove disertacije.

Izvod

Sintetski hipolipemici danas se sve više zamenjuju prirodnim hipolipemicima, usled utvrđenih nedostataka, nus-pojava i sporednih efekata sintetičkih lekova. Shodno tome, podstaknuta je povećana upotreba biljaka, odnosno njihovih aktivnih komponenata- sa hipolipemijskom aktivnošću. Zamena sintetskih jedinjenja prirodnim aktivnim komponentama usmerava istraživanja u pravcu ispitivanja različitih biljnih materijala i identifikovanja novih jedinjenja sa hipolipemijskim dejstvom koji se mogu iz njih izolovati. Zbog toga se veliki napori ulože u cilju dobijanja i izolovanja prirodnih hipolipemika, kao i za razvoj efikasnih i selektivnih tehnika ekstrakcije. Ekstrakciju konvencionalnim rastvaračima karakterišu niska selektivnost i visoke temperature, što može dovesti do degradacije željenih jedinjenja. Primenom natkritične ekstrakcije (NKE) koja se odvija na nižim temperaturama, sprečava se degradacija jedinjenja i dobija na kvalitetu ekstrakata shodno većoj koncentraciji komponenata sa željenim farmakološkim dejstvom. NKE je mnogo selektivnija od konvencionalnih načina ekstrakcije. Selektivnost prema pojedinim grupama jedinjenja se postiže podešavanjem uslova ekstrakcije (temperature i pritiska). Usled lake i potpune separacije natkritičnog fluida smanjenjem pritiska, ovaj vid ekstrakcije omogućava dobijanje ekstrakata bez tragova rastvarača (npr. za primenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji).

Cilj ovog rada je bilo proučavanje frakcija ekstrakata matičnjaka (*Melissae officinalis* L., Lamiaceae) i grčkog semena (*Trigonella foenum-graecum* L., Fabaceae) bogatih supstancama sa hipolipemijskom aktivnosti, izolovanih primenom različitih metoda ekstrakcije, kao i optimizacija procesa njihovog dobijanja. Za dobijanje ekstrakata bogatih supstancama sa hipolipemijskim dejstvom, primenjena je subkritična (SKE) i NKE sa ugljenik (IV)-oksidom, hidrodestilacija i ekstrakcija etanolom. Na osnovu hemijskog profila dobijenih ekstrakata, identifikovane su supstance koje su u literaturi okarakterisane kao nosioci hipolipemijske aktivnosti i određivan je njihov sadržaj. Za identifikaciju i kvantifikaciju aktivnih komponenti u dobijenim ekstraktima korišćene su gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC/MS) i tečna hromatografije (HPLC). Cilj disertacije je bio ispitivanje kinetike izolacije ekstrakata bogatih komponentama nosiocima hipolipemijskog dejstva, kao i analizi i optimizaciji različitih procesa ekstrakcije, pri čemu je glavni naglasak dat analizi kinetike procesa NKE, ispitivanjem

uticaja variranja procesnih parametara (pritiska i temperature) subkritične i NKE i odgovarajućeg predtretmana biljnog materijala na prinos totalnog ekstrakta i u njemu sadržaj komponenata nosilaca hipolipemijskog dejstva.

Dvostepenom frakcionom ekstrakcijom matičnjaka prvo su izolovana etarska ulja NKE, a zatim je izolovana druga frakcija bogata supstancama nosiocima hipolipemijske i antioksidantne aktivnosti subkritičnom i natkritičnom ekstrakcijom. Analizirana je kinetika procesa ekstrakcije i u cilju njenog opisivanja primenjen je pseudo kinetički model. Uočena je brža ekstrakcija prve frakcije u procesu natkritične ekstrakcije, što je objašnjeno lakom dostupnošću etarskog ulja. Najsporija je bila natkritična ekstrakcija druge frakcije, ukazujući na težu dostupnost i sporiju difuziju supstanci nosilaca antioksidantne aktivnosti. Dobijeni ekstrakti prve i druge frakcije ekstrakcije su determinisani po antioksidativnoj aktivnosti skladištenja slobodnih radikala po DPPH metodi, pokazujući najveći antioksidativni kapacitet za ekstrakte druge frakcije, dobijenim na uslovima NKE 30MPa/40 °C i NKE 30MPa/100 °C.

Natkritičnom ekstrakcijom grčkog semena, sa prethodno primenjenim predtretmanom biljne sirovine odmaščivanjem i hidrolizom, omogućeno je izolovanje ekstrakta bogatog diosgeninom, prekursorom u polusintezi steroidnih hormona, poznatog po svom hipolipemijskom dejstvu. Primenjeni predtretman biljne sirovine imao je za cilj dobijanje ekstrakata sa većim sadržajem diosgenina, bez većih količina lipidnih komponenata uklonjenih odmaščivanjem, sa svrhom efikasnije primene dobijenog ekstrakta kao hipolipemika. Analiza uticaja procesnih parametara: pritiska, temperature i količine utrošenog natkritičnog ugljenik(IV)-oksida (NK CO₂), kao i vremena ekstrakcije na prinos diosgenina, izvršena je RSM (Response Surface Methodology-metodologija odzivnih površina) i CCRD (Central Composite Rotatable Design- centralno kompozitni rotabilni dizajn) analiza uticaja procesnih parametara na prinos diosgenina u dobijenim ekstraktima, koja je omogućila određivanje optimalnih uslova NKE za postizanje dobijanja maksimalnih količina diosgenina u ekstraktu iz grčkog semena pri uslovima: 24,6 MPa, 43,5°C, i 20,87 gCO₂/g_{bm} (količina utrošenog NKCO₂), pri gustini NKCO₂ od 863 kg/m³.

Metode analize procesnih parametara RSM i CCRD su, takođe, uspešno primenjene za predviđanje optimalnog prinosa totalnog ekstrakta, bogatog sterolima, vitaminom E i vitaminom D tj. za definisanjem uslova NKE za njihov maksimalan prinos. Određivanje molarne rastvorljivosti totalnog ekstrakta u ugljenik(IV)-oksidu je omogućilo bolje razumevanje i

objašnjenje dobijenih rezultata RSM i CCRD analize. Određivanjem molarne rastvorljivosti sterola, vitamina E i vitamina D u NK CO₂ je omogućilo bolje razumevanje postignutih maksimalnih prinosa različitih grupa jedinjenja pri različitim uslovima NKE. Rezultati su pokazali da su pritisak od 20-25 MPa i temperatura u opsegu 310-320 K, (gustina NK CO₂ u opsegu od 830-890 kg/m³) optimalni uslovi za dobijanje maksimalnog prinosa ekstrakta i najvećih količina sterola, vitamina E i vitamina D u njemu.

NKE i subkritična ekstrakcija grčkog semena su omogućile dobijanje ekstrakata bogatih masnim kiselinama i u cilju njihove identifikacije derivatizacijom su dobijeni metil estri nezasićenih masnih kiselina kao i zasićenih masnih kiselina, pri čemu je identifikovano 10 metil estara nezasićenih masnih kiselina. U najvećoj količini su bili zastupljeni metil linoleat (~40%), metil linolenat (40%) i metil palmitat (10%), dok je količina ostalih metil estara nezasićenih masnih kiselina bila u znatno manjem procentu (0,09-2,4%). Primenom različitih uslova subkritične i NKE ekstrakcije nije primećena znatna razlika u ostvarenim prinosima ekstrakata kao ni u profilu nezasićenih masnih kiselina.

Primenom subkritične ekstrakcije i NKE matičnjaka i grčkog semena u širokim opsezima procesnih parametara, dobijeni su ekstrakti bogati komponentama nosiocima hipolipemijske aktivnosti. Određeni su optimalni procesni uslovi za dobijanje njihovog maksimalnog prinosa.

Ključne reči: matičnjak, grčko seme, natkritična ekstrakcija, karakterizacija, optimizacija, polifenoli, diosgenin, fitosteroli, antioksidansi, hipolipemici

Naučna oblast: Hemijske nauke

Uža naučna oblast: Hemija

UDK broj: 615.22:582.739:582.929.4:546.264-31(043.3)

Abstract

Synthetic hypolipemics nowadays have being replaced by natural ones due to the noticed deficiencies and side effects of synthetic drugs. Great effort is being devoted to the search for alternative and cheaper sources of natural hypolipemics, as well as to the development of efficient, selective and more convenient extraction techniques. Extraction with conventional solvents is characterized by poor selectivity and requires high temperatures, which could result in degradation of the desired compounds, and obtained extracts usually have solvent residues which is not convenient in medicinal use. Supercritical extraction (SCE) shows higher selectivity compared to conventional techniques of extraction. Selectivity of SCE towards some groups of compounds can be tuned by changing extraction conditions (pressure and temperature). According to easy and total separation of supercritical fluid from the extract achieved by lowering pressure, SCE presents type of extraction which allows obtaining extracts without residual solvents (for example for application in pharmaceutical, food and cosmetics industry).

The aim of this study was the isolation of extracts of lemon balm (*Melissae officinalis*) and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) rich in compounds that possess hypolipidemic activity according to literature data, using different extraction processes. The extracts rich in hypolipidemic substances were obtained by supercritical carbon dioxide extraction (SCE-CO₂), hydrodistillation and ethanol extraction from plant material. Characterization and analysis of the obtained extracts as well as determination of contents of the components identified by the literature data as carriers of hypolipidemic activity, were performed. Identification and quantification of the active components in the extracts were performed using gas chromatography mass spectrometry (GC / MS) and liquid chromatography (HPLC). The research was based on the kinetic analysis and optimization of different extraction processes for obtaining extracts rich in components with hypolipidemic activity. Kinetics of subcritical and supercritical extractions were analyzed, whereby, the influence of process parameters (pressure and temperature) as well as appropriate pretreatment of plant material on the yield of total extract and hypolipidemic compounds was examined.

A method of two-step fractional extraction of lemon balm was applied, whereby essential oils were isolated by supercritical fluid extraction as the first fraction, and consequently second

fraction rich in compounds with hypolipidemic and antioxidant activity was isolated using subcritical and supercritical extraction. Analysis of the kinetics of extraction process was performed using pseudo kinetic model. Fast extraction of the first fraction in the supercritical extraction process has been detected, which is explained by high availability of the essential oil. The supercritical extraction of the second fraction was slower, indicating lower availability and slower diffusion in solid phase of components which are the carriers of hypolipemic and antioxidant activities. Antioxidant activity of the obtained extracts was determined by the DPPH method. The results showed the highest antioxidant capacity of extracts of the second fractions obtained at conditions SCE 30MPa / 40 °C and the SCE 30MPa / 100 °C .

SCE of fenugreek seed, with the previously applied pretreatment of plant raw materials in the form of defatting and hydrolysis, enables obtaining extract which contains diosgenin, a precursor in the semisynthesis of steroidal hormones, known for its hypolipidemic activity. Applied pretreatment of plant material was aimed to enable obtaining extracts with higher diosgenin content, refined, without fats, because its effective application as hypolipemic. The analysis of the impact of process parameters (pressure, temperature and quantity of used supercritical carbon dioxide and the extraction time) on the yield of diosgenin was performed applied whereby RSM (response surface methodology) and CCRD (Central Composite Design) analysis with 3-D and 2-D contour diagrams allowed determination of optimal conditions for obtaining maximal yield of diosgenin from fenugreek. The optimal conditions were: pressure of 24.6 MPa , temperature of 43,5°C , and supercritical fluid consumption of 20.87 g CO₂ / g plant mat., at the density of supercritical carbon dioxide (scCO₂) of 863 kg/ m³.

RSM and CCRD methods were successfully applied to predict the optimal yield of total extract , rich in sterols, vitamin E and vitamin D and to define the optimal conditions for the SCE from fenugreek. Determination of the molar solubility of the total extract in scCO₂ has enabled better understanding and explanation of the obtained results with RSM/CCRD analysis. Determined molar solubility of sterols, vitamin E and vitamin D in scCO₂ allowed better understanding of the achieved maximal yields of specific group of compounds obtained at different process conditions of the SCE. The obtained results have shown, that the pressure of 20-25 MPa and temperature in range of 310-320 K , (density of scCO₂ in range of 830-890 kg /m³) present the optimal conditions for obtaining the maximal yield of extract and yield of sterols, vitamin E and vitamin D.

Subcritical and supercritical extraction of lemon balm and fenugreek enabled obtaining extracts rich in unsaturated fatty acids. 10 methyl esters of unsaturated fatty acids were determined. The results indicated the highest amounts of methyl linoleate (~40%), methyl linolenate (40%) and methyl palmitate (10%), while the amount of other present methyl esters of unsaturated fatty acids was in smaller percent (0,09-2,4%). Applying various range of process conditions of subcritical and supercritical extraction, difference in obtained yield of extracts either in profile of unsaturated fatty acids was not noticed.

Applying subcritical and supercritical extraction of lemon balm and fenugreek in wide range of process conditions, extracts rich in compounds with hypolipidemic activity were isolated. Optimal conditions of extraction processes for obtaining maximal yields of extracts rich in compounds with hypolipidemic activity were determined.

Keywords: *Melissae officinalis*, *Trigonella foenum-graecum*, supercritical extraction, characterization, optimization, polyphenols, diosgenin, phytosterols, antioxidants, hypolipemics

Scientific field: Chemical Science

Major in: Chemistry

UDC number: 615.22:582.739:582.929.4:546.264-31(043.3)

Sadržaj

Izvod	I
Abstract	IV
Sadržaj.....	VII
Lista oznaka i skraćenica	XI
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO.....	5
2.1. Hipolipemijska aktivnost	5
2.1.1. Mehanizam hipolipemijske aktivnosti prirodnih jedinjenja	7
2.2. Antioksidativna aktivnost	9
2.2.1. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti	11
2.3. Matičnjak (<i>Melissae officinalis</i> L.).....	14
2.3.1. Taksonomija matičnjaka	14
2.3.2. Hemijski sastav matičnjaka.....	15
2.3.3. Farmakološka aktivnost matičnjaka.....	18
2.3.3.1. Hipolipemijski mehanizam delovanja matičnjaka	19
2.4. Grčko seme (<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.).....	21
2.4.1. Taksonomija grčkog semena.....	21
2.4.2. Hemijski sastav grčkog semena	22
2.4.3. Farmakološka aktivnost grčkog semena	23
2.4.3.1. Hipolipemijski mehanizam delovanja grčkog semena	25
2.5. Klasični postupci izolovanja bioaktivnih komponenti.....	27
2.5.1. Presovanje mehaničkim putem	29
2.5.2. Hidrodestilacija	29
2.5.3. Ekstrakcija organskim rastvaračima	31
2.6. Ekstrakcija ugušćenim ugljenik(IV)-oksidom	34
2.6.1. Subkritična ekstrakcija.....	34
2.6.2. Natkritična ekstrakcija (NKE)	35
2.6.2.1. Natkritični fluidi i njihove osobine	36

2.6.2.2. Moć rastvaranja natkritičnih fluida.....	38
2.6.2.3. Prednosti i nedostaci natkritične ekstrakcije.....	39
2.6.2.4. Primena natkritičnih fluida	40
2.7. Mehanizam procesa i matematičko modelovanje NKE.....	42
2.7.1. Matematičko modelovanje procesa NKE	48
2.7.1.1. Empirijsko modelovanje	49
2.7.1.2. Modelovanje zasnovano na analogiji sa prenosom toplote.....	49
2.7.1.3. Modelovanje zasnovano na integraciji diferencijalnog masenog bilansa.....	50
2.8. Optimizacija natkritične ekstrakcije	56
2.8.1. Selektivnost natkritičnog ugljenik(IV)-oksida.....	57
2.8.2. Modelovanje NKE grčkog semena zasnovano na odzivnim površinama.....	58
2.8.2.1. Optimizacija primenom centralnog kompozitnog rotabilnog dizajna (CCRD).....	61
2.8.2.2. Analiza odzivnih površina	62
3. EKSPERIMENTALNI DEO	65
3.1. Sirovine.....	65
3.2. Metode ekstrakcije.....	66
3.2.1. Hidrodestilacija matičnjaka po Klevendžeru	66
3.2.2. Ekstrakcija grčkog semena po Soksletu.....	67
3.2.3. Ekstrakcija ugušćenim ugljenik(IV)-oksidom	69
3.2.3.1. Opis postrojenja	69
3.3. Dobijanje ekstrakata matičnjaka bogatih jedinjenjima sa hipolipemijskim dejstvom.....	71
3.3.1. Frakciona ekstrakcija matičnjaka.....	71
3.3.2. Subkritična ekstrakcija matičnjaka	73
3.3.3. Matematičko modelovanje procesa ekstrakcije matičnjaka.....	74
3.3.3.1. Određivanje parametara modela	74
3.3.4. Obrazovanje i detekcija DPPH radikala u cilju određivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata	77
3.4. Dobijanje ekstrakata grčkog semena bogatih jedinjenjima sa hipolipemijskim dejstvom	78
3.4.1. Dobijanje ekstrakata bogatih diosgeninom NKE grčkog semena.....	78
3.4.1.1. Predtretman grčkog semena u cilju izolovanje diosgenina.....	78
3.4.1.2. Sokslet ekstrakcija grčkog semena	79

3.4.1.3. NKE dobijanja ekstrakata bogatih diosgeninom iz grčkog semena.....	80
3.4.1.4. Izbor procesnih parametara za dobijanje ekstrakata bogatih diosgeninom	80
3.4.1.5. RSM/CCRD optimizacija dobijanje ekstrakata bogatih diosgeninom.....	81
3.4.2. Dobijanje ekstrakata bogatih sterolima, vitaminom E i D iz grčkog semena NKE.....	84
3.4.2.1. Izbor procesnih parametara NKE sterola, vitamina E i D iz grčkog semena	84
3.4.2.2. RSM/CCRD optimizacija dobijanje ekstrakata bogatih sterolima, vitaminom E i D.....	85
3.4.2.3. Određivanje molarne rastvorljivosti ekstrakta, sterola, vitamina E i D	86
3.4.3. Dobijanje ekstrakata bogatih FAME postupcima SKE i NKE iz grčkog semena	87
3.4.3.1. Izbor procesnih parametara SKE i NKE u cilju izolovanja FAME.....	87
3.4.3.2. Derivatizacija ekstrakata grčkog semena.....	88
3.5. Određivanje hemijskog sastava ekstrakata matičnjaka i grčkog semena.....	89
3.5.1. Određivanje hemijskog sastava komponenata potencijalnog hipolipemijskog dejstva iz ekstrakata matičnjaka.....	89
3.5.1.1. Gasna hromatografija (GC/FID).....	89
3.5.1.2. Gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC/MS)	89
3.5.2. Određivanje hemijskog sastava komponenata potencijalnog hipolipemijskog dejstva iz ekstrakata grčkog semena	90
3.5.2.1. Određivanje aktivne komponente diosgenina iz ekstrakata grčkog semena tečno masenom hromatografijom visokih performansi (HPLC)	90
3.5.2.2. Određivanje aktivnih komponenti totalnih sterola, vitamina E i D iz ekstrakata grčkog semena gasnom (GC/FID) i gasno-masenom hromatografijom (GC/MS).....	90
3.5.2.2.1. Gasna hromatografija (GC/FID).....	90
3.5.2.2.2. Gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC/MS)	91
3.5.2.3. Određivanje aktivnih komponenti FAME iz ekstrakata grčkog semena gasnom (GC/FID) i gasno-masenom hromatografijom (GC/MS)	91
3.5.2.3.1. Derivatizacija ekstrakata grčkog semena.....	91
3.5.2.3.2. Gasna hromatografija (GC/FID).....	92
3.5.2.3.3. Gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC/MS)	93
4. REZULTATI I DISKUSIJA	94
4.1. Dobijanje potencijalnih hipolipemičnih ekstrakata matičnjaka	95
4.1.1. Etarsko ulje i ekstrakti matičnjaka.....	95

4.1.2. Hemijski sastav matičnjaka.....	98
4.1.3. Rezultati modelovanja procesa ekstrakcije sa ugušćenim ugljenik(IV)-oksidom	110
4.1.4. Određivanje DPPH antioksidativne aktivnosti ekstrakata matičnjaka.....	116
4.2. Dobijanje potencijalnih hipolipemičnih ekstrakata iz grčkog semena	118
4.2.1. Dobijanje ekstrakata bogatih diosgeninom iz grčkog semena.....	118
4.2.1.1. Značaj predtretmana grčkog semena	118
4.2.1.2. Preliminarna analiza procesnih parametara na prinos ekstrakta i diosgenina.....	119
4.2.1.3. Definisanje optimalnih parametara NKE grčkog semena za dobijanje ekstrakata bogatih diosgeninom.....	122
4.2.1.4. RSM/CCRD analiza procesnih parametara NKE na prinos ekstrakta i sastav diosgenina.	125
4.2.1.5. Definisanje optimalnih procesnih uslova NKE za dobijanje ekstrakata sa visokim sadržajem diosgenina	131
4.2.2. Dobijanje ekstrakata bogatih sterolima, vitaminom E i vitaminom D iz grčkog semena.....	131
4.2.2.1. Preliminarna analiza uticaja procesnih parametara na prinos ekstrakta i sastav sterola, vitamina E i vitamina D	132
4.2.2.2. RSM/CCRD analiza procesnih parametara na prinos ekstrakta i sastav sterola, vitamina E i vitamina D	136
4.2.2.3. Definisanje optimalnih procesnih uslova NKE za dobijanje ekstrakata sa visokim sadržajem totalnih sterola, vitamina E i vitamina D.....	144
4.2.2.4. Određivanje molarne rastvorljivosti ekstrakta, sterola, vitamina E i D.....	146
4.2.3. Dobijanje ekstrakata bogatih FAME iz grčkog semena	153
4.2.3.1. Ekstrakti grčkog semena bogati FAME.....	153
4.2.3.2. Sadržaj FAME u ekstraktima dobijenim SKE i NKE grčkog semena.....	154
4.2.3.3. Kinetika SKE i NKE grčkog semena.....	157
5. ZAKLJUČAK	158
6. LITERATURA	162
7. PRILOZI	175
8. BIOGRAFIJA	184

Lista oznaka i skraćenica

Model Sovove iz 1994 godine

a_0 - specifična površina sloja po jedinici zapremine ekstraktora m^{-1}

e - udeo ekstrakta, kg ekstrakta / kg nerastvorljive čvrste faze

h - aksijalna koordinata ekstraktora, m

J - brzina prenosa mase, $kg\ m^{-3}\ s^{-1}$

J^* - normalizovana brzina prenosa mase

k_f - koeficijent prenosa mase u fazi rastvarača, $m\ s^{-1}$

k_s - koeficijent prenosa mase kroz čvrstu fazu, $m\ s^{-1}$

K - početna masa teže dostupnog rastvorka, kg

N - masa nerastvorljive čvrste faze, kg

O - početna masa rastvorka u uzorku biljnog materijala, kg

q - specifična količina rastvarača, $kg\ CO_2 / kg$ nerastvorljive čvrste faze

\dot{q} - specifični maseni protok rastvarača u odnosu na nerastvorljivu čvrstu fazu, s^{-1}

r - koncentracija u čvrstoj fazi

t - vreme ekstrakcije, s

U - brzina strujanja ugljenik(IV)- oksida kroz sloj biljnog materijala, $m\ s^{-1}$

W - parametar sporog perioda ekstrakcije

x - kg rastvorljivih supstanci po kg nerastvorljive čvrste faze, bezdimenziona veličina

y - kg rastvorljivih supstanci po kg rastvarača, bezdimenziona veličina

y_r - ravnotežna rastvorljivost rastvorka u ugljenik(IV)- oksidu, kg rastvorka/ $kg\ CO_2$

Y - normalizovana koncentracija

z - bezdimenziona koordinata

Z - parametar brzog perioda ekstrakcije

Grčka slova

ε - poroznost sloja

ρ - gustina natkritičnog fluida, rastvarača, $kg\ m^{-3}$

ρ_s - gustina biljnog materijala, nasipna gustina, $kg\ m^{-3}$

τ - bezdimenziono vreme

δ – parametar rastvorljivosti (MPa)^{1/2}

$\rho_{r,SF}$ – redukovana gustina CO₂ (g/cm³)

$\rho_{r,L}$ – redukovana gustina CO₂ u tečnom stanju (g/cm³)

(ΔE)_i- suma kohezivnih energija (cal/mol)

(Δv)_i- suma molarnih zapremina (cm³/mol)

Subskripti

k - teže dostupan rastvorak

m - početak ekstrakcije iz unutrašnjosti čestica

n - kraj ekstrakcije lako dostupnog rastvoraka

p - lako dostupan rastvorak

0 - inicijalna koncentracija

w - koordinata granice između brze i spore ekstrakcije

Skraćenice

LDL holesterol niske gustine lipoproteina

VLDL holesterol veoma niske gustine lipoproteina

HMG-CoA 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A-reduktaze

HPLC tečna hromatografija visokih performansi

GC/FID gasna hromatografija

GC/MS gasno-masena hromatografija

DAD diodni detektor

RSC% kapacitet skladištenja radikala

DPPH (1,1-difenil-2-5-pikril-hidrazil)

Asp apsorbanca DPPH radikala slepe probe

As apsorbanca uzorka DPPH radikala sa ekstraktom

Pc kritični pritisak

SP parametar rastvorljivosti (MPa)^{1/2}

ΔT_i - suma kritičnih temperatura kontributornih grupa

T _c -	kritična temepratura
T ₁ -	temperatura na kojoj je definisan parametar rastvorljivosti δ
T ₂ -	temperatura na kojoj se određuje parametar rastvorljivosti δ
Si	molarna rastvorljivost totalnog ekstrakta/sterola/vitamina E/vitamina D
KI	Kovačevi indeksi
RSM	metodologija odzivnih površina
CCRD	centralno kompozitni rotabilni dizajn
NKE	natkritična ekstrakcija
NK CO ₂	natkritični CO ₂
SKE	subkritična ekstrakcija
subCO ₂	subkritični CO ₂
m _{co2} /m _s	količina utrošenog CO ₂ po količini biljne sirovine za eksperiment (g/g)
bm	biljna sirovina
Y	prinos, mg diosgenin/ g suve materije grčkog semena (%)
Y	prinos totalnog ekstrakta, g ekstrakta/ 100 g grčkog semena
Y	prinos, totalni steroli/vitamin E/ vitamin D, udeo u ekstraktu (%)
X ₁	nezavisna promenljiva pritiska
X ₂	nezavisna promenljiva temperature
X ₃	nezavisna promenljiva količine utrošenog CO ₂ (vreme ekstrakcije)
R ²	koeficijent determinacije
R ² adj	prilagođen koeficijent determinacije
β	regresioni koeficijent

1. UVOD

Upotreba i primena biljaka i njihovih ekstrakata u medicinske svrhe je poznata od davnina, ali njihova detaljnija ispitivanja u pogledu karakterizacije, optimizacije i farmakološkog dejstva nisu bila sveobuhvatnija i zastupljenija, kako se prednost uvek davala sintetičkim lekovima, dok je alternativna medicina uzimana sa rezervom usled nepouzdanosti i nepoznavanja dejstva. U poslednje vreme usled utvrđenih nedostataka, nus pojava i sporednih efekata sintetičkih lekova podstaknuta je povećana upotreba biljaka odnosno njihovih aktivnih komponenata u medicini, poznatoj kao fitoterapija, a samim tim i istraživanja o karakterizaciji, dejstvu i primeni kako bi se omogućila njihova što efikasnija delotvornost.

Poslednjih godina sve zastupljeniji problem današnjeg društva kao posledica bržeg i nezdravog načina života je sve aktuelniji zbog izraženog porasta hiperholesterolemije koja se manifestuje prisustvom visokog nivoa holesterola u krvi i niza metaboličkih poremećaja koje on uzrokuje po zdravlje ljudi širom sveta i koji mogu biti sekundarni za mnoge bolesti, naročito kardiovaskularna oboljenja. Hiperholesterolemija kao svakidašnja boljka današnjeg sveta zahteva efikasna i delotvorna rešenja. Obzirom da su hipolipemici lekovi koji snižavaju visok nivo holesterola u krvi i regulišu uzročno- posledične metaboličke poremećaje, imaju veliki značaj i primenu u farmaceutskoj industriji. Nekoliko tipova sintetičkih lekova se koriste za redukciju holesterola, ali je tokom njihove primene primećeno više nedostataka, nepoželjnih pojava i sporednih efekata.

Fitopreparati nemaju toliko nedostataka kao sintetički lekovi i njihova priprema i primena su mnogo jednostavnije i jeftinije. Primena fitopreparata u lečenju hiperholesterolemije nema sporednih efekata, relativno je jeftina i lako dostupna. Sa velikom količinom prirodnih sastojaka kao što su vlakna, amino kiseline, izoflaponoidi, fitosteroli, proteini i ostali, fitopreparati imaju veliki potencijal u snižavanju holesterola (Jungmin i sar., 2013).

Dalja istraživanja vode do novih fitofarmaceutika i otkrivanja intenziteta njihovog delovanja na snižavanje holesterola, njihove karakterizacije i njihove primene (Atoui i sar, 2005). U tom smislu, cilj našeg istraživanja će biti biljke sa potencijalnom hipolipemičnom aktivnošću: matičnjak (*Melissa officinalis*) i grčko seme (*Trigonella-foenum-graceum*).

Hidrodestilacija kao najstariji i najjednostavniji postupak za dobijanje etarskih ulja iz lekovitih biljaka je najviše i najčešće korišćen za analizu sastava i dejstva određenih aktivnih

komponentata, ali kako usled visoke temperature dolazi do termičke razgradnje i hidrolize pojedinih komponentata, analiza sastava i dobijanje aktivnih komponentata nisu odgovarajući. S toga se sve učestalije pribegavalo ekstrakciji organskim rastvaračima kao pogodnijom za izolovanje većeg broja komponentata iz biljaka sa ostvarivanjem većeg prinosa. Analiza sastava tako dobijenih ekstrakata je bila potpunija, ali je njihova primena usled prisustva toksičnih i štetnih organskih rastvarača bila ograničena usled potrebe za prečišćavanjem ekstrakata što je postupak činilo složenijim i neefikasnim, utoliko što je u toku samog procesa prečišćavanja i uparavanja dolazilo do gubitka aktivnih komponentata. U ekstrakciji organskim rastvaračima problem predstavlja i velika cena organskih rastvarača, kao i njihova regeneracija, što samo otežava i produžava proces i troškove.

Poslednjih decenija dobijanje biološki aktivnih ekstrakata pomoću natkritičnih fluida, pre svega, natkritičnog ugljenik(IV)-oksida (NK CO₂) sve više dobija na značaju imajući u vidu brojne prednosti ove tehnologije u odnosu na konvencionalne metode dobijanja frakcija iz biljnog materijala koje sadrže bioaktivne komponente (Bakkali i sar, 2008; Tajkarimi i sar, 2010). Proces ekstrakcije sa NK CO₂ omogućava dobijanje ekstrakata na umereno niskim temperaturama, čime se sprečava termička degradacija lako isparljivih i termolabilnih jedinjenja koja se smatraju glavnim nosiocima antibakterijske i antioksidativne aktivnosti. Promenom pritiska i temperature (gustine CO₂) moguće je koncentrisati željene frakcije jedinjenja u ekstraktu i vršiti jednostavno, brzo i potpuno uklanjanje CO₂ od rastvorka bez dalje potrebe za prečišćavanjem čime se dobija potpuno čist ekstrakt za kliničku upotrebu.

Na osnovu literaturnih podataka o potencijalnoj hipolipemičnoj aktivnosti navedenih biljaka, vršene su hidrodestilacije, Sokslet ekstrakcije i NKE ekstrakcije sa ciljem optimizacije procesa dobijanja ekstrakata sa izraženijim hipolipemičnim dejstvom u poređenju sa literaturnim podacima. Vršene su analize ekstrakata dobijenih NKE na određenim pritiscima i temperaturama za koje ne postoje podaci u dostupnoj literaturi. Na nekim biljkama primenjivana je i ekstrakcija tečnim CO₂ za koje takođe ne postoje podaci u literaturi. Ekstrakti dobijeni različitim načinima ekstrakcije i pri različitim uslovima su analizirani pomoću gasno-masene hromatografije (GC/MS) i tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC). Dobijeni ekstrakti su sadržali komponente za koje je literaturno potvrđeno njihovo hipolipemijsko dejstvo.

Od posebnog interesa je bila mogućnost dobijanja ekstrakata bogatih diosgeninom iz grčkog semena, koji pokazuju pozitivno dejstvo na metabolizam holesterola, od kojih je

najznačajniji snižavanje koncentracije holesterola u krvi, inhibiranje absorpcije holesterola, kao i smanjenje nivoa holesterola u jetri i pospešivanje izlučivanja holesterola iz žuči (Sauvaire, 1991). Dobijanje ekstrakata bogatih fitosterolima iz grčkog semena, je takođe bio od značaja, shodno njihovoj sposobnosti da redukuju nivo holesterola u krvi. Fitosteroli su strukturno najsličniji sa holesterolom, vezuju se za skladištene rezerve u žuči i podstiču njegovo izlučivanje, a samim tim i redukuju nivo holesterola u krvi (Jong, 2003). Ekstrakti bogati nezasićenim masnim kiselinama (FAME) su dobijeni ekstrakcijama ugušćenim ugljenik(IV)-oksidom iz grčkog semena shodno njihovom potencijalnom hipolipemijskom dejstvu (Kahn i sar, 1963; Yu i sar, 1995).

Dobijanje ekstrakata sa potencijalnim hipolipemičnim dejstvom iz matičnjaka je bio od značaja, sa bogatim sadržajem fenolnih komponenata za koje se vezuje antioksidativna aktivnost (Mimica-Dukic i sar, 2004; Atanassova i sar, 2011; Miron i sar, 2013; Babovic i sar, 2010; Babovic i Petrovic, 2011; Čanadanović-Brunet i sar, 2008), pri čemu je ona pokazala veću izražajnost ukoliko je hemijsku kompoziciju ekstrakta činio veći sadržaj timola i eugenola, većih količina FAME i njihovih alkohola.

Ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije bili su:

- dobijanje ekstrakata iz matičnjaka i grčkog semena u čijem sastavu se nalaze komponente sa potencijalnim hipolipemičnim dejstvom.
- određivanje parametara kinetike izolacije ekstrakata sa jakim antioksidativnim dejstvom iz matičnjaka, primenom različitih postupaka ekstrakcije, a pre svega subkritične i natkritične ekstrakcije sa ugljenik(IV)-oksidom;
- definisanje hemijskog sastava i antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata i etarskih ulja iz matičnjaka;
- simulacija procesa ekstrakcije korišćenjem matematičkog modela u cilju izračunavanja parametara kojima se opisuje prenos mase u posmatranom procesu ekstrakcije;
- dobijanje ekstrakata bogatih diosgeninom, komponentom sa poznatim hipolipemičnim dejstvom, primenom predtretmana odmašćivanja i hidrolize grčkog semena i natkritične ekstrakcije u širokom opsegu procesnih uslova;

- optimizacija procesa NKE primenom metode odzivnih površina, analiziranjem uticaja procesnih parametara na prinos totalnog ekstrakta i diosgenina iz grčkog semena, sa ciljem određivanja optimalnih uslova za postizanje maksimalnih prinosa diosgenina;
- dobijanje ekstrakata bogatih sterolima, vitaminom E i vitaminom D, iz grčkog semena primenom NKE u širokom opsegu primenjenih procesnih parametara;
- Analiziranje uticaja procesnih parametara NKE na prinos totalnog ekstrakta, sterola, vitamina E i vitamina D, primenom metode odzivnih površina sa ciljem određivanja optimalnih uslova za postizanje maksimalnih prinosa sterola, vitamina E i vitamina D;
- dobijanje ekstrakata bogatih nezasićenim masnim kiselinama iz grčkog semena, primenom subkritične i natkritične ekstrakcije na različitim procesnim uslovima.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Hipolipemijska aktivnost

Hiperholesterolemija, kao oblik poremećenog metabolizma, uslovljena današnjim nezdravim načinom života, karakterisana je veoma visokim nivoima lipida u krvi, predstavlja dominantni faktor u nastajanju mnogih hroničnih bolesti kao što su dijabetes, gojaznost i niz kardiovaskularnih oboljenja. Takođe i gojaznost predstavlja posledicu poremećenog metabolizma, čiji je jedan od uzročnika i povećan nivo “loših” lipida u krvi.

Holesterol kao predstavnik sterola i sastavni deo svih ćelijskih membrana, je neophodan za rast i razvoj, ali njegov sadržaj iznad optimalnog nivoa u telesnim tečnostima i tkivima, predstavlja visok rizični faktor za razvoj kardiovaskularnih poremećaja kao što su ateroskleroza, srčani infarkt i cerebralna paraliza (Child i Kuksis, 1983). Hiperholesterolemija uzrokuje nagomilavanje slobodnih radikala na razne načine i formiranje slobodnih radikala kiseonika, kao što su radikali superoksidnih anjona (O_2^-) ili peroksinitrita ($ONOO^-$) koji mogu imati značajan uticaj na patogenezu osim na kardiovaskularne bolesti i na druga upalna i kancerogena oboljenja (Prasad i Kalra, 1993; Das i sar, 2000; Rang i sar, 2005). Hipertenzija i displipidemija predstavljaju najčešće faktore rizika u nastajanju ateroskleroze, kao sve češćeg uzročnika smrti u industrijski razvijenim društvima, shodno tome teži se primeni medikamentne terapije u vidu hipolipemika, poboljšanja njihovog dejstva i primene u metabolizmu lipida u cilju produžavanja života.

Najčešću preporučenu terapiju lekara u tretiranju hiperholesterolemije čine statini (kao npr. simvastatin, lovastatin, pravastatin, fluvastatin, atorvastatin), koji snižavaju ukupni i nivo tzv. lošeg LDL holesterola (Low Density Lipoprotein- lipoprotein male gustine), koji je direktno povezan sa pojavom infarkta miokarda i šloga. Mehanizam dejstva statina podrazumeva inhibiciju enzima 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A-reduktaze (HMG-CoA) koji ima odlučujuću ulogu u biosintezi holesterola, i na taj način dovodi do regulisanja nivoa holesterola. Neželjena dejstva sintetičkih hipolipemika manifestuju se kao gastrointestinalne smetnje, dolazi do povećanja koncentracija enzima jetre u plazmi, nesanice i osipa, a moguća je pojava i miozitisa i angioedema (Rang i sar, 2005). Osim najčešće korišćenih statina, i drugi lekovi se propisuju, na primer derivati fibrinske kiseline, fibrati, zatim smole koje vezuju žučne kiseline,

nikotinska kiselina, probukol i riblje ulje. Međutim, u medikaciji hiperholesterolemije, a posebno u olakšavanju tegoba koje prate navedeno oboljenje, prednost nad sintetičkim lekovima preuzimaju prirodni proizvodi sa biljnim ekstraktima koji nemaju izražene neželjene i sporedne efekte, a koji su jeftiniji i efikasni (Hasani-Ranjbar i sar, 2010; Bahmani i sar, 2015; Bahmani i sar, 2015a; Sham i sar, 2014; Zeng i sar, 2012; Mahmood i sar, 2010; Phogat i sar 2010; Xiea i sar, 2012; Ghorbani i sar, 2013). Biljke poseduju antiinflamatorna, antioksidativna, analgetska svojstva koja ih promišlu od davnina u lečenju niza poremećaja zdravlja. WHO, 2001 je izvestila da se oko 80% globalne populacije oslanja na lečenje prirodnim proizvodima, a da danas postoji trend povećanja njihove primene. Naučni doprinos tradicionalnoj medicini predstavlja racionalna fitoterapija, zasnovana na naučnim i dokumentovanim studijama hemijske karakterizacije, farmakološke aktivnosti i dejstva biljaka i njihovih izolata, kliničkih studija o dejstvu i bezbednosti njihove primene, ekstrakcije prirodnih jedinjenja sa potencijalnom farmakološkom aktivnošću i tehnologije dobijanja preparata sa što efikasnijom primenom i upotrebom (Bhattaram i sar, 2002). Terapeutska primena ekstrakata dobijenih iz prirodnih izvora pokazala je značajne rezultate u lečenju raznih poremećaja i oboljenja, potvrđujući iskustva iz tradicionalne medicine (Zhang, 2004; Saraf, 2010). Hipolipemijska aktivnost određene grupe biljaka pokazala je evidentan potencijal u tretiranju hiperholesterolemije. Najčešće pominjane, ali i najviše obradivane u literaturi su: matičnjak (*Melissa officinalis*) (Lee i sar, 2008; Chung i sar, 2010; Bolkent i sar, 2005; Ribeiro i sar, 2001; Jun i sar, 2012; Zarei i sar, 2014) , grčko seme (*Trigonella-foenum graecum*) (Sauvaire i sar, 1991; Basch i sar, 2003; Bordia i sar, 1997; Stark i sar, 1993; Hannan i sar, 2003; Xue i sar, 2007; Kassaian i sar, 2009; Kaviarasan i sar, 2007; Narender i sar, 2007; Belguith-Hadriche i sar, 2010), badelj (*Silybum marianum*) (Akkay i sar, 2012; Valenzuela i sar, 1994; Škottova i sar, 1998; Sobolova i sar, 2006; Shaker i sar, 2010), artičoka (*Cynare folium*) (Ghada i Tamer, 2009; Speroni i sar, 2003; Gebhardt, 1998; Shimoda i sar, 2003), medveđi luk (*Allium ursinum*) (Reuter, 1995; Ali i sar, 2000; Vazquez-Prieto i sar, 2010), smilje (*Helichrysum arenarium*) (Albayrak i sar, 2010; Czinner i sar, 1999; Tepe i sar, 2005) i maslina (*Olea folium*) (Visioli i sar, 1998, Manna i sar, 2005, Jemai i sar, 2008).

Hiperholesterolemija je poznata kao zdravstveni poremećaj, koji se može tretirati biljnim tradicionalnim lekovima. U ovom istraživanju, biljke matičnjak (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae, droga *Melissae folium*) i grčko seme (*Trigonella foenum-graecum* L., Fabacea, droga *Foenugraeci semen*) su izabrane na osnovu literaturnih podataka koji su omogućili

povezivanje hemijskog profila navedenih biljaka i njihovog potencijalnog dejstva na hiperholesterolemiju. Cilj je bio optimizacija dobijanja njihovih ekstrakata sa farmakološki aktivnim jedinjenjima sa potencijalnim hipolipemičnim dejstvom primenom natkritične ekstrakcije.

2.1.1. Mehanizam hipolipemijske aktivnosti prirodnih jedinjenja

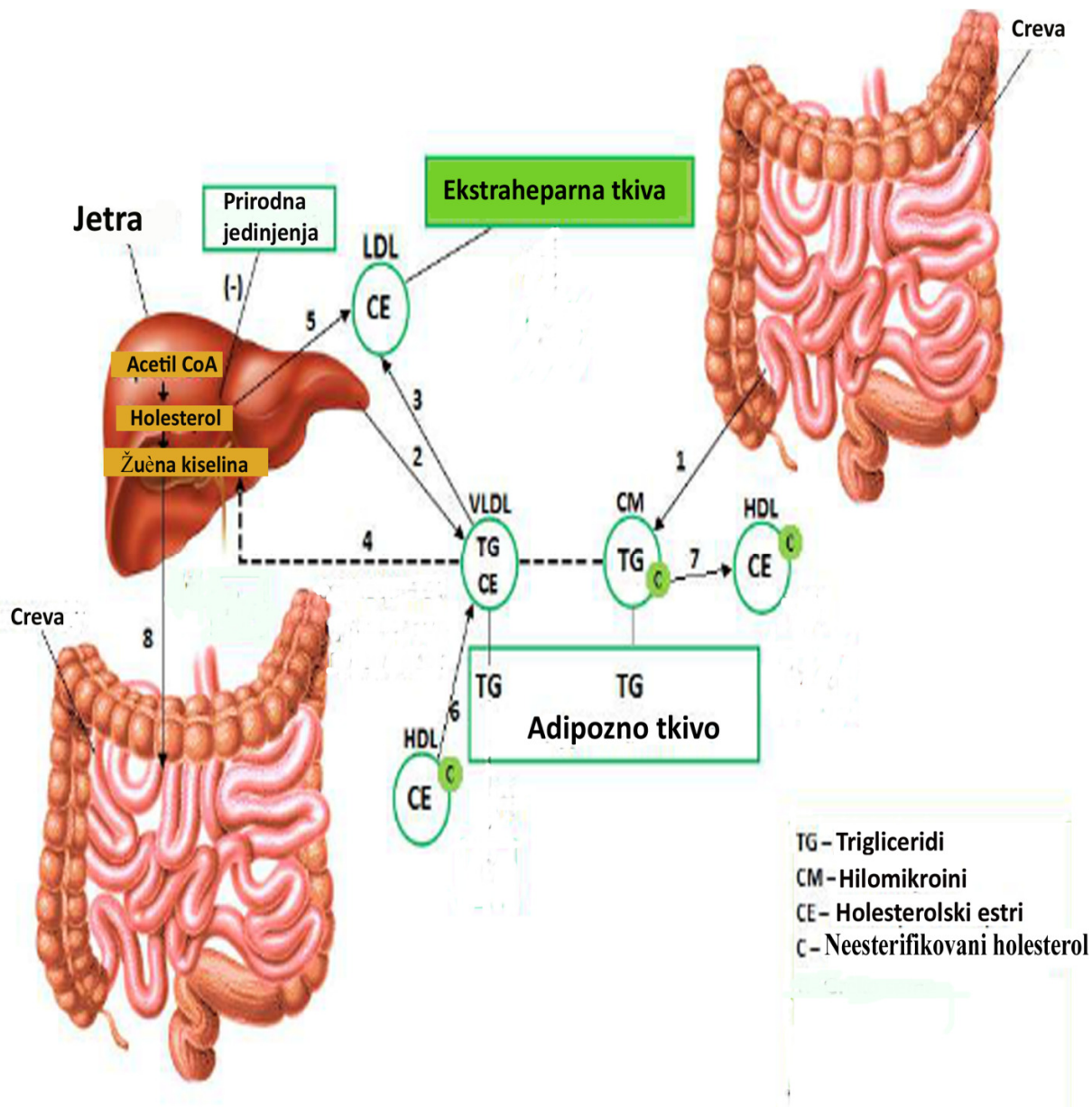
Hiperholesterolemija predstavlja poremećaj metabolizma koji se manifestuje kao višak lipida u krvotoku, koje čine holesterol, trigliceridi i lipoproteini. Prema načinu nastajanja ovog poremećaja, hiperholesterolemija može biti primarna ukoliko je uslovljena genskim defektom i kombinacijom genetskih faktora i životne sredine, a može biti i sekundarna kao rezultat već postojećih metaboličkih poremećaja kao što su dijabetes, alkoholizam, ciroza jetre, gojaznost i hipotireodizam. Lipoproteinski metabolizam obuhvata obrađivanje lipida unesenih preko hrane, proces sinteze lipida u jetri i transport lipida do ciljnog mesta. Postoje dva načina obrade lipida, egzogeni, lipidi koji su uneseni hranom i endogeni, lipidi koji se sintetišu u jetri (Rang i sar, 2005).

Hipolipemijsko dejstvo bioaktivnih grupa jedinjenja biljaka manifestuje se na više načina, po principu različitih mehanizama u metabolizmu lipida u organizmu. Snižavanje nivoa lipida u organizmu omogućuje se na više načina:

- inhibiranjem sinteze holesterola
- degradacijom triglicerida
- povećavanjem nivoa HDL holesterola (High Density Lipoprotein, tzv. dobrog holesterola)
- pospešivanjem izlučivanja holesterola putem bilijarnog trakta
- inhibiranjem apsorpcije holesterola u crevima.

HMG-KoA reduktaza je mirkozomalni i glavni regulatorni enzim u sintezi holesterola. Sinteza 90% holesterola se odvija u jetri i gastrointestinalnom traktu. Biosinteza holesterola je energetski zahtevan proces, zato je važno preuzimanje holesterola putem receptora LDL iz cirkulacije. Kontrola nivoa holesterola se najčešće postiže regulacijom aktivnosti HMG-KoA reduktaze i regulacijom sinteze LDL-receptora (Nelson i Cox, 2005; Voet i Voet, 2005).

Mehanizam regulisanja holesterola dejstvom prirodnih aktivnih komponenti prikazan je na slici 1.



Slika 1. Mehanizmi dejstva hipolipemijske aktivnosti prirodnih jedinjenja (prezeto iz predavanja "Fitoterapija primenjena na bolesti metabolizma", prof. Svetlana Kulevanova, Farmaceutski fakultet, Skoplje)

2.2. Antioksidativna aktivnost

Kroz istoriju razna naučna istraživanja su potvrdila antioksidativnu sposobnost niza biljaka karanfilić, muskatni orah, čubar, kurkuma, đumbir, majoran, među kojima su bile i biljke iz familije Lamiaceae, kao što su matičnjak, ruzmarin, žalfija, origano i timijan, koje su pokazale izuzetan antioksidativni potencijal (Chipault i sar, 1952; Chipault, 1956). Antioksidativno dejstvo biljaka je različito i zavisi od sadržaja aktivnih komponenti tj. od sadržaja etarskih ulja i fenolnih jedinjenja. Aktivne komponente koje pokazuju antioksidativne osobine su fenolne kiseline, flavonoidi, prirodni pigmenti (npr. kapsaicin u paprici) i terpeni (npr. rosmanol, karnosol, karnosolna kiselina, epirosmanol, izorosmanol iz ruzmarina i žalfije) (Babovic, 2010).

Prirodni antioksidansi u biljkama su pre svega fenolna jedinjenja tj. polifenoli, a najvažnije grupe prirodnih antioksidanasa su tokoferoli, flavonoidi, fenolne kiseline i terpeni. (Yanishlieva, 2001). Fenolna jedinjenja koja najviše doprinose antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata iz porodice Lamiaceae su rozmarinska kiselina, karnosol i karnosolna kiselina i bifenilna jedinjenja, npr. p-cimen-2,3-diol (u timijanu) (Babovic i sar, 2010; Mencherini i sar, 2007; Mimica-Dukic i sar, 2004; Schwarz i Ternes, 1992; Nakatani i sar, 1989)

Antioksidansi su supstance koje, prisutne kod komponentata koje podležu oksidaciji (kao što su lipidi, proteini, dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) ili ugljeni hidrati) značajno inhibiraju ili potpuno sprečavaju oksidaciju supstrata (Halliwell i Gutteridge, 1989; Halliwell, 1995). U sprečavanju štetne reakcije slobodnih radikala na konstituente ćelije, postoji čitav kompleksni antioksidativni odbrambeni mehanizam u organizmu. Pored antioksidativnog mehanizma koji štite organizam od štetnog uticaja slobodnih radikala, važan segment antioksidativne odbrane čine i antioksidansi koje treba unositi hranom svakodnevno u odgovarajućoj količini. Oksidativni stres se javlja jer je koncentracija antioksidanasa redukovana (zbog mutacije enzima koji imaju funkciju antioksidanasa u organizmu, ili pri smanjenom unosu prirodnih antioksidanasa preko hrane) i jer je broj ROS (Reactive Oxygen Species- reaktivne kiseonične vrste) povećan. Slobodni radikali koji nastaju tokom normalnog metabolizma, termolizom, elektromagnetnom radijacijom, redoks reakcijama, enzimskim procesima, hemijskim i biohemijskim procesima, dovode do mnogih patoloških promena u ljudskom organizmu (Acworth, 2003; Halliwell i Whiteman, 2004). Novija istraživanja dejstva slobodnih radikala, otkrila su da je iznenađujuće veliki broj veoma teških bolesti današnjice koje su posledica oksidativnog stresa i oštećenja do kojih on dovodi. Mnogi oblici malignih bolesti

rezultat su oksidativnog oštećenja DNK i mutacija koje zbog toga nastaju. Potvrđeno je da je arterioskleroza, koja nastaje oksidacijom holesterola niske gustine (LDL-low density lipoprotein) upravo uzrokovana reakcijama u kojima učestvuju slobodni radikali. Negativan uticaj slobodnih radikala može dovesti i do različitih autoimunih bolesti, šećerne bolesti, reumatskih bolesti, srčanog udara, bolesti bubrega, infektivnih bolesti, Alchajmerove bolesti i Parkinsonova bolest, dermatoloških poremećaja, psorijaze. Važnu ulogu imaju i u nastanku alergija, kao što su astma i atopički dermatitis, te upalnih bolesti creva poput ulceroznog kolitisa i Kronove bolesti. Postoje različiti mogući mehanizmi putem kojih antioksidansi deluju i pružaju zaštitu od slobodnih radikala. To podrazumeva sprečavanje obrazovanja ROS, zaustavljanje ROS napada hvatanjem reaktivnih metabolita i njihovo pretvaranje u manje reaktivne molekule, sprečavanje obrazovanja štetnih oblika iz manje reaktivnih ROS, olakšavanje oporavka od štetnih ROS i obezbeđivanje povoljne okoline za efikasno delovanje ostalih antioksidanasa (Sen, 1995). Lipidna peroksidacija je označena kao glavni mehanizam oštećenja ćelija u mnogim biološkim sistemima, koja nastaje napadom slobodnih radikala na lipide poput polinezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima, glikolipidima i holesterol u biološkim membranama.

Na osnovu različitog mehanizma delovanja antioksidansi mogu biti primarni (butilovani hidrosianizol, galati, flavonoidi, ruzmarinski ekstrakt, vitamin E, fenolna jedinjenja itd.), sekundarni ili preventivni (limunska kiselina, askorbinska kiselina, sumporna jedinjenja, selen, fosfolipidi, karotenoidi, transferin, ceruloplazmin itd.). Neki antioksidansi pokazuju i sposobnost sinergističkog dejstva kao što su limunska kiselina, askorbinska kiselina, sumporna jedinjenja, selen, fosfolipidi, karotenoidi, transferin, ceruloplazmin itd (Pokorny, 2001; Kochhar i Rossell, 1990). Antioksidansi mogu imati različite mehanizme delovanja, pa tako primarni antioksidansi usporavaju stepen inicijacije lančane reakcije slobodnih radikala, ili prekidaju lančanu reakciju u fazi propagacije donirajući vodonik ili elektrone slobodnim radikalima i transformišu slobodne radikale u stabilnije produkte, dok sekundarni antioksidansi sprečavaju razlaganje lipidnih hidroperoksida na slobodne radikale tj. redukuju brzinu reakcije inicijacije kod lančanih reakcija pomoću različitih mehanizama inaktivacije. Sinergističko dejstvo se ispoljava u pojačanju aktivnosti primarnih antioksidanasa, sposobnost antioksidanasa da vežu kiseonik kao tzv. "skevindžeri" (hvatači) kiseonika (askorbinska kiselina, sulfiti, askorbil-palmitat, eritorbinska kiselina, vitamin E, limunska kiselina, EDTA, fosfati, amino kiseline, fosfolipidi). Vitamin E je glavni liposolubilni antioksidans i igra veoma važnu ulogu u zaštiti ćelijskih membrana.

2.2.1. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti

Antioksidativni potencijal predstavlja mogućnost ispitivanog uzorka da preda elektron ili vodonik i na taj način spreči reaktivnost radikala u daljim lančanim reakcijama i oštećenjima i poremećajima koji su posledica njegove reaktivnosti. Postoji nekoliko različitih metoda za merenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta koje se uglavnom zasnivaju na merenju količine korišćenog reagensa i meri inhibicije oksidacije. Metode za ispitivanje antioksidativne aktivnosti se mogu podeliti na više načina, prema sistemu testiranja (*in vivo* i *in vitro*), prema metodi detekcije (spektrofotometrijske, fluorimetrijske, hemiluminiscentne i ESR spektrometrijske) i prema direktnosti određivanja (direktne sa ROS ili indirektne sa metalnim jonima, određivanje stepena inhibicije oksidacije lipidnog supstrata, određivanje prenosa atoma vodonika i prenosa jednog elektrona) (Sanchez-Moreno, 2002; Prior i sar, 2005; Robards i sar, 1999).

Tri najpoznatije i najčešće primenjivane metode za merenje antioksidativnog kapaciteta su:

1. Reakcije prenosa atoma vodonika ili HAT (hydrogen atom transfer)

Metode koje se zasnivaju na prenosu atoma vodonika odnose se na reakcije u kojima su antioksidansi i supstrat kompetitivni prema peroksil radikalima proizvedenim putem termičkog razlaganja azo-jedinjenja (Somogyi, 2007).

a) *Inhibition of induced low-density lipoprotein autooxidation*

Inhibicija indukovane autooksidacije lipoproteina niske gustine. Inicijatori oksidacije su Cu^{2+} joni ili AAPH (2,2-azobis(2-amidinopropane)dihidrohlorid).

b) ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Zasniva se na merenju efikasnosti različitih prirodnih antioksidanasa u sprečavanju oksidativne degradacije fluoresceina, nakon mešanja sa peroksil radikalima. Fluorescentni intenzitet fluoresceina slabi u toku njegove oksidacije, a u prisustvu antioksidanasa oksidativno raspadanje fluoresceina je sporije. ORAC vrednost označava kolika količina analiziranog proizvoda ima isti kapacitet "hvatanja" slobodnih radikala kao i poznata količina oblika vitamina E koji je rastvorljiv u vodi, prema kom je ispitivanje standardizovano.

c) TRAP (*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*)

Ukupna sposobnost "hvatanja" radikala. Bazira se na merenju potrošnje kiseonika tokom kontrolisane lipidne peroksidacije, koja je indukovana peroksil radikalima koji se proizvode putem termičkog razlaganja azo-jedinjenja 2,2'-azobis(2-amidinopropan)hidrohlorid (AAPH).

d) Carotenoid (crocina) bleaching assays

Stepen beljenja karotenoida "crocina" iz šafrana, određuje se kolorimetrijski. Peroksil radikali se stvaraju tokom termičkog razlaganja azo inicijatora AAPH. Antioksidativni potencijal supstance dodate u inkubacionu smešu je u funkciji inhibicije beljenja karotenoida "crocina".

e) TOSC (Total Oxidant Scavenging Capacity) ili ukupni kapacitet "hvatanja" oksidansa.

Reakcijom između različitih ROS (peroksil radikala, hidroksil radikala i peroksinitrita) i α -keto- γ -metiltio-buterne kiseline (KMBA) koja se oksiduje i dobija se etilen koji može biti odvojen od ostalih sastojaka i kvantitativno određen pomoću gasne hromatografije (GC). Antioksidativni kapacitet testiranog jedinjenja se meri sposobnošću inhibicije formiranja etilena iz KMBA.

2. Reakcije prenosa jednog elektrona ili SET (single electron transfer)

Metodama koje se baziraju na prenosu jednog elektrona meri se kapacitet antioksidansa tokom redukcije oksidansa koji menja boju kada se redukuje. Stepem promene boje proporcionalan je koncentraciji antioksidansa (Somogyi, 2007).

a) FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power)

Antioksidativni kapacitet zasniva se na merenju stepena redukcije kompleksa Fe(III)-tripiridiltriazina u plavi Fe(II)-kompleks.

b) CUPRAC (Total antioxidant potential koristeći Cu(II) kompleks)

Ukupni antioksidativni kapacitet, zasniva se na merenju stepena redukcije Cu (II) kompleksa.

3. Kombinacija HAT (hydrogen atom transfer) i SET (single electron transfer)

a) TEAC (Trolox equivalence antioxidant capacity)

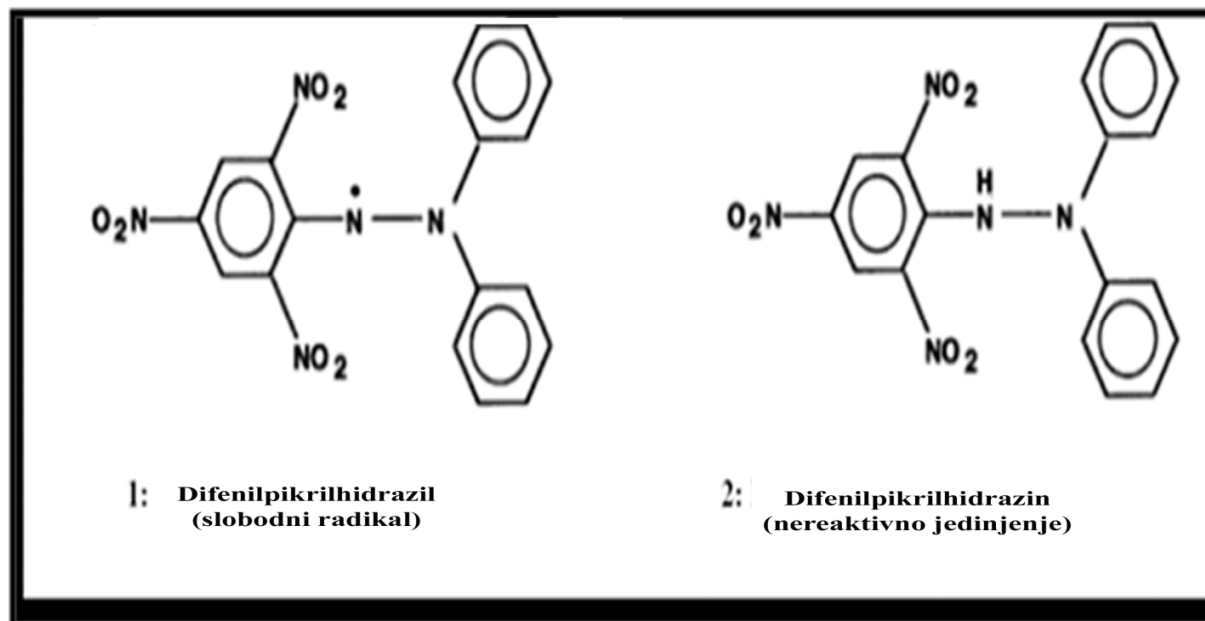
Antioksidativni kapacitet izražen kao koncentracija analoga vitamina E rastvorenog u vodi tj. u Trolox ekvivalentima, zasniva se na redukciji obojenog (plavo-zelenog) katjon radikala 2,2'-azonobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonata) (ABTS⁺). Obično se koristi kalijum-persulfat za oksidaciju ABTS radikala u radikal katjon ABTS⁺. Rezultati dobijeni ovom metodom se izražavaju kao TEAC.

b) DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal) metoda

DPPH metoda merenja antioksidativnog kapaciteta zasniva se na primeni stabilnog slobodnog radikala DPPH i njegove redukcije kao meri antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata iz

biljnog materijala. DPPH metoda je najčešće primenjivana metoda za ispitivanje sposobnosti antioksidativnih jedinjenja da se ponašaju kao "hvatači" slobodnih radikala, ili donori vodonika, kao jednostavna i pouzdana za određivanje antioksidativne aktivnosti jedinjenja (Sanchez-Moreno, 2002). Ova metoda se može odnositi na ukupni antioksidativni kapacitet uzorka i nije vezana ni za jednu određenu antioksidativnu komponentu. Za prikazivanje rezultata DPPH metode koristi se parametar "efikasna koncentracija" EC_{50} vrednost (IC_{50}) koja se definiše kao koncentracija antioksidansa potrebna da smanji početnu koncentraciju DPPH radikala za 50% i određuje se spektrofotometrijski ili pomoću elektron spin rezonantne spektrometrije. Jača antioksidativna aktivnost znači da antioksidans ima nižu EC_{50} vrednost (Cuvelier i sar, 1992). Recipročna vrednost EC_{50} vrednosti $1/EC_{50}$ predstavlja parametar antiradikalske moći (Becker i sar, 2004). Rastvor stabilnog DPPH radikala (zbog delokalizacije nesparenog elektrona) u etanolu daje jak maksimum apsorpcije na oko 520 nm i ružičaste je boje. Nakon reakcije DPPH radikala sa antioksidansom, smanjenje apsorpcije na datoj talasnoj dužini prati se spektrofotometrijski. Rezultujuća dekolorizacija je stehiometrijska, uzimajući u obzir broj vezanih elektrona (Becker i sar, 2004). Predstavljanjem DPPH radikala sa $Z\cdot$ i antioksidansa sa AH, pojednostavljena reakcija je: $Z\cdot + AH \rightarrow ZH + A\cdot$.

Elektron spin rezonantna (ESR) spektrometrija je metoda kojom je moguće direktno određivanje koncentracije slobodnih radikala. Antioksidativna aktivnost se određuje na osnovu relativnog smanjenja intenziteta ESR signala slobodnih radikala u prisustvu antioksidanasa, u odnosu na intenzitet ESR signala kada antioksidans nije prisutan (Becker i sar, 2004, M. Stamenic i sar, 2014, Babovic i Petrovic, 2011). Ova metoda se koristi za ispitivanje antioksidativne aktivnosti antioksidanasa na stabilne i nestabilne slobodne radikale. Isto kao u spektrofotometrijskoj metodi rezultati se predstavljaju pomoću parametra EC_{50} .



Slika 2. Struktura DPPH radikala i DPPH nakon redukcije antioksidansom

Za određivanje sposobnosti dobijenih antioksidativnih frakcija matičnjaka da inhibiraju lipidnu peroksidaciju primenjavana je ESR. spektroskopija. Definisane antioksidativne aktivnosti datih frakcija vršilo se merenjem njihove sposobnosti da "hvataju" DPPH radikale.

2.3. *Melissae officinalis* L. (Matičnjak)

2.3.1. Taksonomija matičnjaka

Melissae officinalis L., Lamiaceae, (matičnjak) je višegodišnja, zeljasta, medonosna, začinska i lekovita biljka, visine do 80cm. Potiče iz Sredozemlja i Azije, a na našem podneblju je jedna od najstarije poznatih biljaka. Rasprostranjena je u celoj Evropi. *Melissae officinalis* na grčkom jeziku znači pčela, jer pčele najviše vole ovu biljku. Iz korenovog sistema biljke raste više stabljika duž kojih su raspoređeni listovi, prekriveni sitnim dlačicama. Listovi su zeleni i sjajni, na dugim peteljka, jajolikog oblika, pri dnu zaobljeni. Biljka cveta u junu i julu, a cvetovi su beli i sitni. Droga je list (*Melissae folium*), koji se prikuplja u kasno proleće, pre cvetanja i skida sa stabljike neposredno nakon branja. Droga ima neobično lep i prijatan miris, na limun i limetu, zbog čega je i sam matičnjak dobio tradicionalan naziv limunka. Usled lako

isparljivog etarskog ulja kojeg inače ima u maloj količini, biljka se pažljivo bere i neposredno nakon branja tretira i ekstrahuje kako bi se dobilo etarsko ulja u što većem procentu, koje predstavlja važan lekoviti sastojak (World Health Organization, 2001; Weiss i Fintelmann, 2000).

Matičnjak se zbog svojih svojstava gaji za potrebe farmaceutske i kozmetičke industrije. Kod nas uspeva kao samonikla biljka gotovo u celoj zemlji. Vrlo je rasprostranjen i dobro se uzgaja i raste, vrlo je otporna i raste na svim zemljištima i podnosi razne klime. Retko koja biljka se može tako jednostavno gajiti kao matičnjak. Gaji se setvom semena ili, još brže, deljenjem busenova. Daje mnogo semena, pa se može posejati kao i svaka druga biljka. Rasaduje se u maju ili junu na stalna mesta, na rastojanju od oko pola metra. Brži se uspeh postiže deljenjem busenova, i to bolje u jesen nego u proleće (Czygan i sar, 2001). Matičnjak raste oko sela, pored ograda i po obodu šume. Sporadično je rasprostranjen. Danas se gaji po baštama, oko košnica ili se plantažno gaji radi dobijanja lista matičnjaka ili etarskog ulja (Kovačević, 2002).



Slika 3. List matičnjaka (*Melissae folium*), u svežem i osušenom obliku

2.3.2. Hemijski sastav matičnjaka

Sveži listovi biljke sadrže etarsko ulje, kojeg ima u maloj količini od oko 0,05-0,3 % (World Health Organization, 2001). Sastav etarskog ulja zavisi od mesta na kojem je sakupljena droga, klime, vremena skupljanja, kao i starosti biljke. Etarsko ulje se sastoji od više od 70

komponenti, od kojih >60% čine monoterpeni i >35% seskviterpeni; oksigenovani deo frakcije većinom (ca. 90%) čine monoterpeni, dok ugljovodoničnu frakciju većinom čine (ca. 90%) seskviterpeni (World Health Organization, 2001). Među glavnim aldehydima monoterpena su citronelal (ca. 30-40%) i citrali a i b (geranial i nerval) (ca. 10-30%), male količine metil-citronelata, (+)-ocimen, citronelol, geraniol i nerol. U najvećem procentu su zastupljeni seskviterpeni β -kariofilen i germakren D (oko 10%, oba). Monoterpeni glikozidi i ostali glikozidi sa isparljivim aglikonom, eugenil glikozidom su takođe prisutni u lišću matičnjaka (World Health Organization, 2001; Weiss i Fintelmann, 2000; Czygan, 2001; ESCOPE, Monographs, 1996).

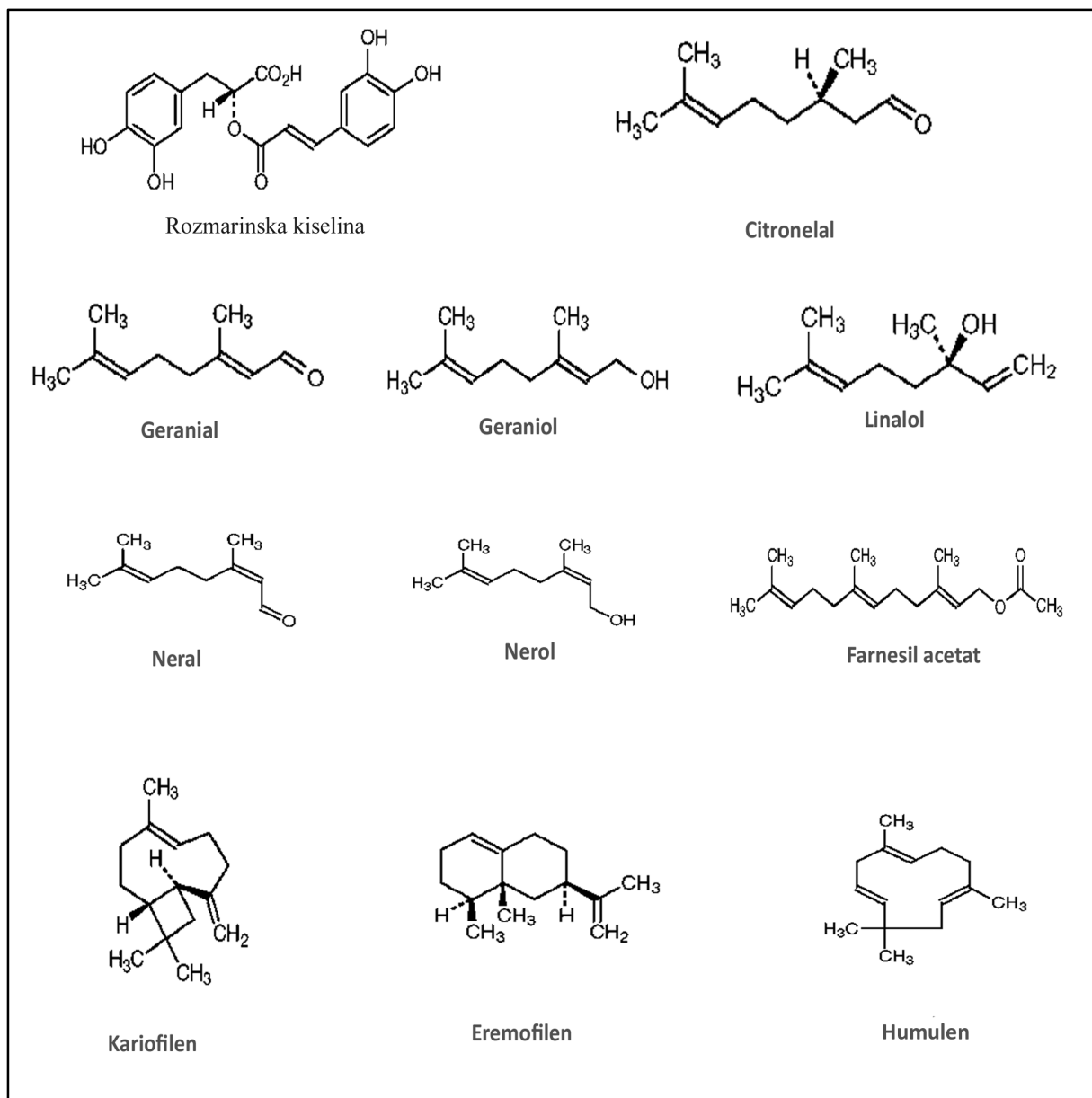
Najznačajnije neisparljive komponente u listu matičnjaka su derivati hidroksicimetne kiseline (4-7%, od čega 6% čini rozmarinska kiselina (tzv. labiat-tanin), glikozidno povezana hlorogenska i kafena kiselina, kumarinska kiselina) i etarsko ulje (60% monoterpena i 35% seskviterpena) (World Health Organization, 2001). Među glavnim monoterpenoidnim komponentama su citral a i b (geranial i nerval), koji zajedno čine 40-75% etarskog ulja i nose aromu ulja. Ukupna količina ovih aldehyda je promenljiva, ali je stalan njihov međusoban odnos u ulju (geranial:neral=4:3) (Kovačević, 2000). Prisutne su manje količine sledećih monoterpena: metilcitronelat, geranialacetat, citronelol, geraniol, nerol, linalol, α -terpineol, terpinen-1-ol-4, neralacetat, cis- i trans- ocimen. Od jedinjenja seskviterpenske strukture dominantni su: β -kariofilen, β -kariofilen oksid i germakren-D, zajedno sa nešto germakra-1(10)E-dien-4-ol. Ostala važna jedinjenja seskviterpenske strukture su: α -kubeben, α -kopaen, β -bourbonen, α -humulen, farnezol i kariofilenol. Biljka sadrži kamfora, tanina, aglikona. Ostale sastojke čine flavonoidi, tanini i triterpeni (usninske i oleinske kiseline) kao i smola, sluzi, glukozidi, saponini i timol. U svežoj biljci ima i do 253,0 mg /100 g vitamina C (Hagers Handbuch Der, 1969; Dab 10, 1991; European Pharmacopoeia 6.0; Hoppe, 1981).

Odnos monoterpenih alkohola (nerol, geraniol, linalol, citronelol i dr.) i monoterpenih aldehyda (citral a i b, citronelal) karakteriše etarsko ulje matičnjaka i taj odnos iznosi oko 1:30 (Klimek i sar, 2000).

U listu matičnjaka, osim etarskog ulja prisutni su i heterozidi flavonoida (kvercetrin, ramnocitrin, derivati apigenina i luteolina kao npr. luteolin-7-glikozid), fenolkarbonske kiseline (glikozidno vezane hlorogenska i kafena kiselina i naročito važna rozmarinska kiselina zvana 'tanin usnatica' (koje ima oko 4%), tanini, triterpeni (ursolna i oleanolna kiselina) i glikozidi od

alkoholnih i fenolnih komponenti npr. glikozidi geraniola, nerola, eugenola, benzil alkohola, β -feniletil alkohola). (Hagers Handbuch Der, 1969; Dab 10, 1991; European Pharmacopoeia 6.0; Hoppe, 1981, Aničić i sar, 2005).

Slika 4. Strukture najzastupljenijih komponenti matičnjaka



2.3.3. Farmakološka aktivnost matičnjaka

Matičnjak je od davnina poznat po povoljnom dejstvu na centralni nervni sistem, sa sposobnošću umirenja i opuštanja (Emamghorishi i Talebianpour, 2009). List i etarsko ulje matičnjaka se koriste kao fitopreparati u obliku infuza, ekstrakta i tinkture za različite vrste poremećaja (kod blagih nesanica i kod poremećaja varenja hrane, odnosno kod poremećaja funkcije gastrointestinalnog trakta) (Aničić, 2005). Stimulativno dejstvo matičnjak manifestuje i na intelektualni i fizički zamor, omogućavajući veću koncentraciju, pamćenje i usredređenost (Kennedy i sar, 2002). ESCOPE, 1996 (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) je službeno odobrio oralnu upotrebu matičnjaka sa pozitivnim učinkom na napetost, nemir i razdražljivost. Usled prisustva većih količina antioksidanasa, koji štite od radikala i oštećenja ćelija uzrokovanih oksidacijom, matičnjak ima pozitivni učinak i na poremećaje nastale usled Alchajmerove bolesti, sprečava i umanjuje dalje oštećenje ćelija i pospešuje pamćenje i koncentraciju (Akhondzadeh, 2003).

Preparati na bazi matičnjaka poseduju sedativna, spazmolitična i antibakterijska svojstva (WHO, 2001). Etarsko ulje matičnjaka spada u grupu etarskih ulja sa najjačim antimikrobnim dejstvom, jer u njegovom sastavu dominiraju monoterpenski aldehidi (Aničić, 2005). Koriste se za ublažavanje tegoba koje prate poremećaje u radu gastrointestinalnog trakta, psihosomatska i kardiovaskularna oboljenja i protiv migrene. Pretpostavlja se da deklarisanjoj aktivnosti matičnjaka doprinose polifenolne komponente. Spazmolitičko dejstvo etanolnog ekstrakta matičnjaka je pokazalo intenzivnu aktivnost koja se manifestuje inhibicijom histamin i barijum uzrokovanih kontrakcija, za razliku od vodenog ekstrakta koji nije ispoljavao spazmolitičku aktivnost.

Matičnjak se koristi i u inhibiciji herpes virusa i taj efekat se pripisuje reakciji između polifenolnih komponenata i virusa, tako što fenolne supstance blokiraju virusne receptore i na taj način sprečavaju adsorpciju virusa na ćelijsku membranu (WHO, 2001; Weiss i Fintelmann, 2000). Fenolkarbonske kiseline, naročito rozmarinska kiselina ima efekte na viruse, a deluje i kao blagi sedativ i pokazuje antitireoidalnu aktivnost (Kovačević, 2002).

Preparati na bazi matičnjaka se takođe primenjuju protiv prehlade i za poboljšanje cirkulacije (WHO, 2001; Weiss i Fintelmann, 2000).

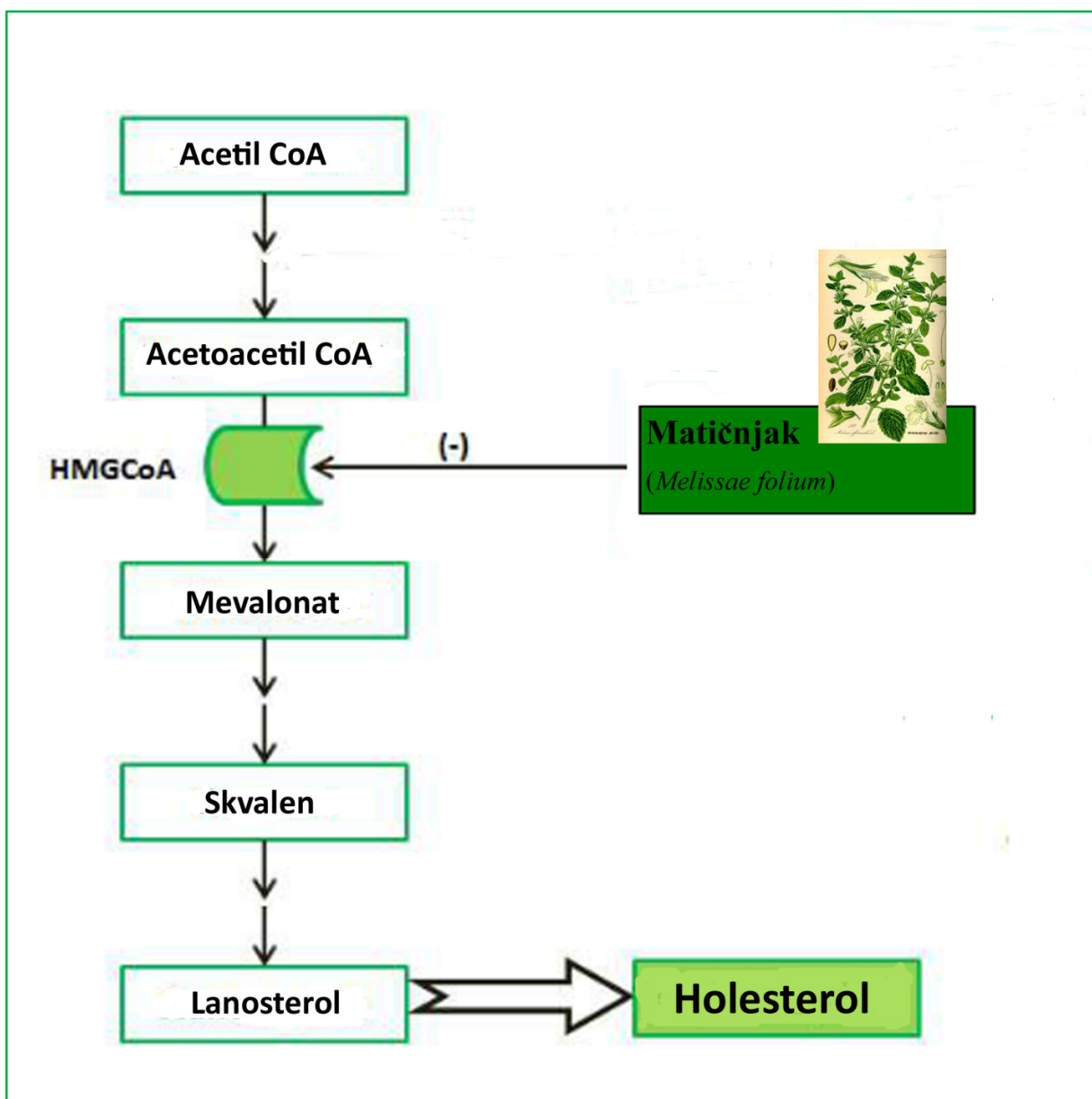
2.3.3.1. Hipolipemijski mehanizam delovanja matičnjaka

Oksidativni stres je uzročnik mnogih poremećaja u metabolizmu lipida. Glutation (GSH), koji nastaje od tri aminokiseline cisteina, glicina i glutamata, predstavlja značajno jedinjenje u odbrani ćelija od slobodnih radikala kao uzročnika oksidativnog stresa. Smanjena količina GSH je povezana sa brojnim poremećajima koji su rezultat nagomilavanja slobodnih radikala kao što su ateroskleroza, srčani udar, diabetes i oboljenja na nivou nervnog sistema. U in vivo ispitivanju na pacovima, primenom ekstrakta matičnjaka, povećava se količina GSH u jetri i krvi hiperlipidemičnih pacova. (Lee i sar, 2008).

Matičnjak je pokazao interesantne efekte na dijabetes. Kako slobodni radikali i oksidativni stres mogu biti uzročnici dijabetesa, antioksidativni sastojci ekstrakta matičnjaka mogu imati povoljan efekat u olakšavanju tegoba koje prate dijabetes. U metabolizmu insulina nastaju slobodni radikali koji su potrebni za njegovu regulaciju, ali sa njihovom povećanjem koncentracijom dolazi do negativnog efekta čineći receptore rezistentnim na insulin i navodeći na gojaznost. Oksidativni stres je takođe delimično odgovoran za razne komplikacije dijabetesa kao što su bubrežna insuficijencija i ateroskleroza. Ekstrakti matičnjaka značajno redukuju nivo glukoze u krvi. Sadašnji podaci ukazuju na antihyperglukemičnost matičnjaka koji ispoljava farmakološko dejstvo aktiviranjem hepatične glukokinaze (GCK) i inhibicijom glukoze-6-fosfataze (G6Pase) i fosfoenolpiruvat-karboksinaze (PEPCK), enzima koji utiču na transkripciju u jetri. Sav uticaj etarskog ulja matičnjaka koji se manifestuje u jetri i masnom tkivu utiče pozitivno na komplikacije dijabetesa (Chung i sar, 2010).

Hiperholesterolemija karakteriše nagomilavanje slobodnih radikala koji izazivaju peroksidaciju lipida i na taj način doprinose povećanom formiranju malondialdehida (MDA). Matičnjak sadrži flavonoide za koje je poznato da poseduju raznovrsne biohemijske i farmakološke aktivnosti, uključujući i inhibiranje oksidacije lipida (Bolkent i sar, 2005). Na taj način, hipolipemijski efekti matičnjaka mogu biti povezani sa sadržajem flavonoida. Poznato je da potencijalna antioksidativna aktivnost potiče od flavonoida, fenolnih kiselina, terpena, rozmarinske i kafene kiseline. (Bolkent i sar, 2005, Ribeiro i sar, 2000).

Matičnjak pored hipolipemijske aktivnosti, pokazuje i sposobnost u regulisanju raznih poremećaja kao što su gojaznost i poremećaji metabolizma lipida (Jun i sar, 2012). Morfološke i biohemijske analize potvrđuju efikasnost matičnjaka u prevenciji hiperholesterolemije. Primenom ekstrakta matičnjaka nije utvrđen nikakv negativan učinak na jetru, ukazujući na korisnost i bezbednost korišćenja ovih ekstrakata u medicini za tretiranje raznih poremećaja i bolesti (Zarei i sar, 2014).



Slika 5. Mehanizam hipolipemijskog dejstva matičnjaka

2.4. Grčko seme

2.4.1. Taksonomija grčkog semena

Grčko seme (*Trigonella foenum-graecum* L., Fabaceae), piskavica, je jednogodišnja zeljasta biljka, koja pripada rodu deteline i raste do 50 cm visine. Listovi su trodelni i imaju peteljke koje su prekrivene sitnim dlačicama i odozgo odebljale. Grčko seme cveta u junu ili julu, a žuto-beli cvetovi puni su semena koje se sakuplja u avgustu. Najlekovitiji deo biljke je seme, koje karakteriše izrazito jarka žuta boja i tvrdoća, nepravilnog romboidnog i dijamantskog kružnog oblika. Seme se najčešće melje, kako bi se lakše koristilo. Piskavica ima veoma jak i karakterističan miris, kao i gorak ukus i kao takva koristi se u prahu kao začim mnogim jelima, a najčešći je sastojak čuvenog začina karija.

Vodi poreklo iz Mediterana, samoniklo raste i u Ukrajini, Indiji i Kini, a najviše je proizvode Indija, Maroko, Kina i Turska. Grčko seme se u Srbiji uglavnom uzgaja, ali se može naći i kao samonikla biljka, naročito na krečnom zemljištu (Czygan i sar, 2001; Hagers Handbuch Der, 1969; European Pharmacopoeia 6.0; Hoppe, 1981).



Slika 6. Grčko seme, (*Trigonella foenum-graecum* L) - nadzemni deo i seme

2.4.2. Hemijski sastav grčkog semena

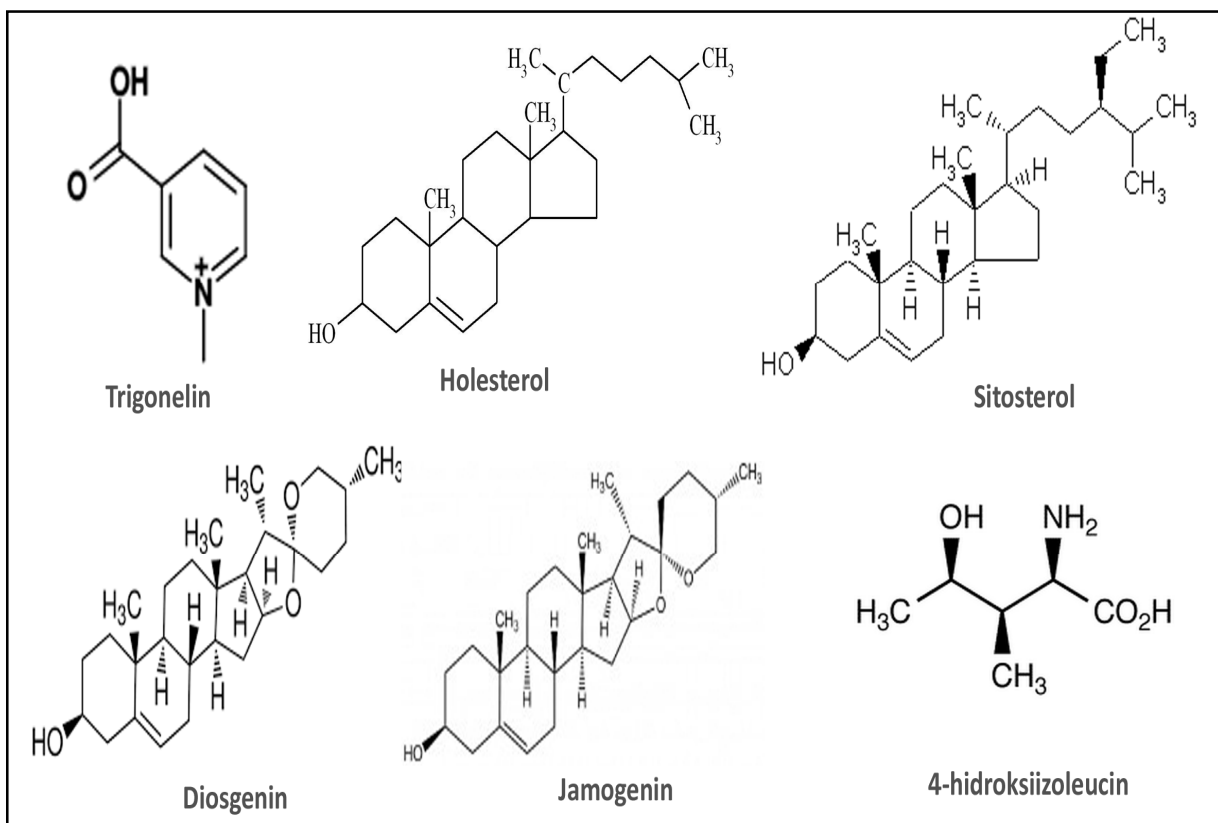
Grčko seme sadrži 45-60% ugljenih hidrata, skladištenih u vidu fibroznog materijala u ćelijskim zidovima endosperma-galaktomanani, 6-O- β -d-galactofuranosyl- α -d-mannopyranose sa malim količinama ksiloze. Sadrži i veliku količinu vlakana (48%) i skrobne komponente, kao i šećere kao što su oligosaharidi, 20-30% proteina (bogatih triptofanom) i 6-10% ulja, bogatog nezasićenim masnim kiselinama (Czygan i sar, 2001; Hagers Handbuch Der, 1969; Dab 10, 1991; European Pharmacopoeia 6.0; Hoppe, 1981). Biljka je poznata po veoma malom sadržaju etarskog ulja, svega 0,01%, sa širokim spektrom sekundarnih metabolita, uključujući protoalkaloide (trigonelin do 0,37%, holin do 0,05%), saponine 0,6-1,7% (iz kojih se hidrolizom dobijaju diosgenin, jamogenin, tigogenin i drugi), sterole (β -sitosterol, holesterol) i flavonoide (orientin, izoorientin, izoviteksin) Prisutne su i aminokiseline kao što su 4-hidroksiizoleucin, arginin, histidin i lizin (WHO, 2007).

Grčko seme sadrži i inhibitore proteinaza koje utiču na tripsin i himotripsin. Ovi inhibitori formiraju stabilne komplekse sa ciljnim proteazama da blokiraju, promene ili onemoguće pristup enzima reaktivnom mestu. Ovi proteini su poznati da su uključeni u mnogim biološkim funkcijama, kao što su zgrušavanje krvi, agregacije trombocita, anti-kancerogenezo i antiparazitskih agenasa. Inhibitori proteinaza se primenjuju kao nove vrste lekova sa antivirusnim dejstvom da bi se produžio očekivani životni vek HIV pozitivnih bolesnika (Weder i sar. 1991, Oddepally i sar. 2013).

Nekoliko steroidnih saponina je prisutno u slobodnom obliku, kao što je 3,26-bisglikozid sa strukturama Δ^5 -furosten i 5α -furostan, koji se nakon uklanjanja glukoze sa C-26 transformišu u spirostanol glikozide, praćeni hidrolizom i oslobađaju u najvećem delu diosgenin i jamogenin (0,1-2,2%) praćeni sa ostalim aglikonima u manjim količinama. Furostanolni glikozidi su osnovni nosioci gorkog ukusa. Grčko seme, takođe sadrži fenugrecin, tripeptidni estar diosgenina (Czygan i sar, 2001).

Od sterola u grčkom semenu su prisutni holesterol i sitosterol u najvećoj količini, pored stigmasterola, fukosterola, kampesterola, cikloartenola, sitostanola, polinastanola i ostalih. U sadržaj grčkog semena ulaze i C-glikozidni flavonoidi isoviteksin, viteksin, homoorientin. Od alkaloida najzastupljeniji je trigonelin. U tragovima je zastupljen i nikotinamid, amid nikotinske

kiseline-vitamin B3. Karakterističan miris grčkog semena potiče od prisustva 3-hidroksi-4,5-dimetil-2[5H]-furanona. U grčkom semenu su prisutni u znatnim količinama vitamini i minerali kalcijum, fosfor, gvožđe, natrijum, kalijum, vitamin B₁, vitamin B₂, niacin, vitamin C i vitamin A. (Czygan i sar, 2001; Hagers Handbuch Der, 1969; Dab 10, 1991; European Pharmacopoeia 6.0; European Pharmacopoeia 8.0; Hoppe, 1981).

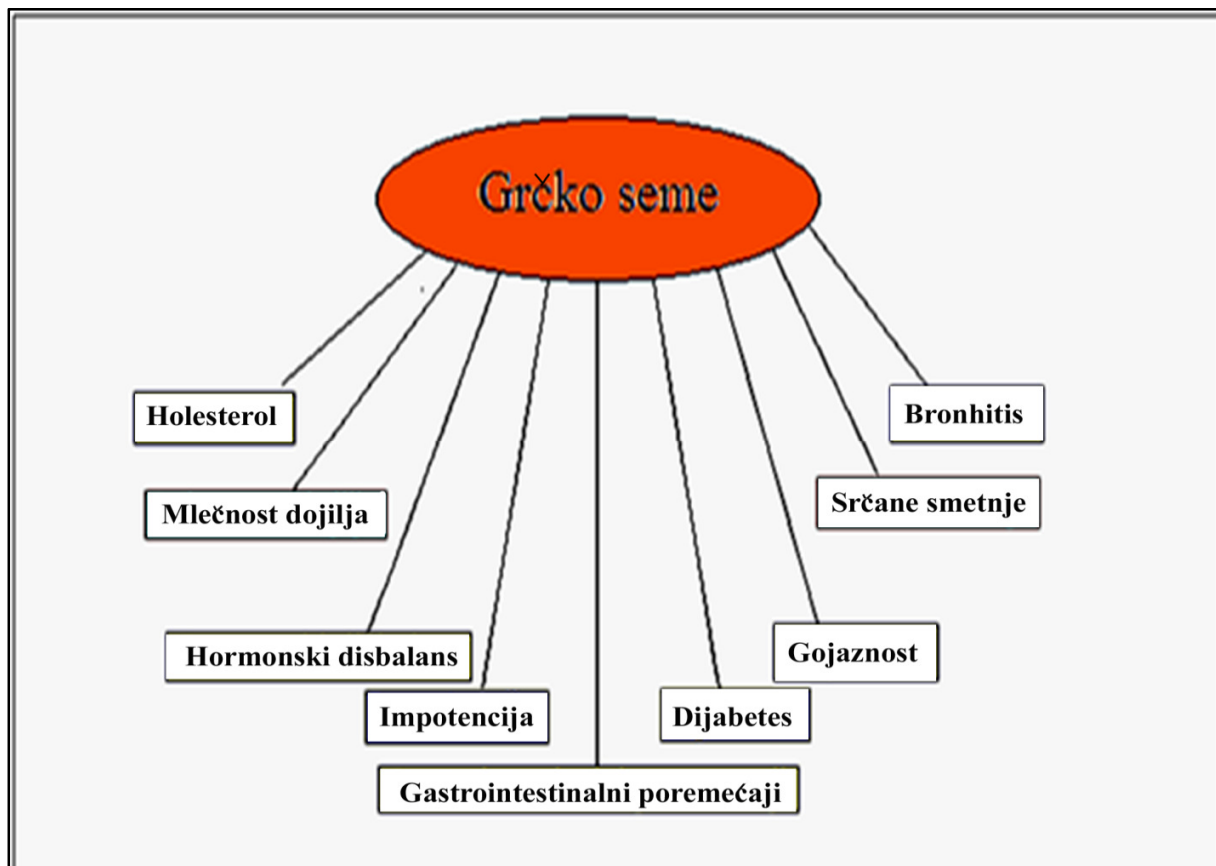


Slika 7. Najznačajnije komponente grčkog semena (*Trigonella foenum graecum* L.)

2.4.3. Farmakološka aktivnost grčkog semena:

Grčko seme je pokazalo dugu istoriju primene u medicini sa blagotvornim dejstvom na mnoge poremećaje i bolesti, sa sveobuhvatnim jačanjem imunog sistema. Još u drevnoj civilizaciji Egipta, Rima i Grčke poznata je upotreba kod otklanjanja problema u varenju, kod oboljenja bubrega jetre, kao i kod hormonskog disbalansa. Preliminarna istraživanja su pokazala antihyperglipemijsku i antihyperlipemijsku aktivnost. U narodnoj medicini grčko seme se koristi za povećanje produkcije mleka kod dojilja, za uklanjanje peruti i smanjenje upalnih procesa

kože. Takođe, tradicionalno se upotrebljava za snižavanje nivoa šećera u krvi (Czygan i sar, 2001; European Pharmacopoeia 6.0; WHO, 2007). Istraživanjem sprovedenim na zdravim i pacovima sa povišenim nivoom holesterola u krvi, utvrđeno je da se primenom ekstrakata grčkog semena povišeni nivo holesterola u krvi životinja smanjio dvostruko. Primenom odmašćenih ekstrakata grčkog semena u cilju snižavanja nivoa holesterola u krvi, zapaženo je znatno smanjenje, dok trigonelin i lipidna frakcija ne ispoljavaju ovakav efekat (Czygan i sar, 2001). Fenugricin, 3 peptidni estar diosgenina, može biti potencijalni nosilac hipolipemične aktivnosti, pored toga što poseduje virostatično, antiflogistično i kardiotonično dejstvo (Czygan i sar, 2001). Steroidni saponini (smilagenin, sarsasapogenin, diosgenin, tigogenin, yamogenin, neotigogenin, yuccagenin, gitogenin, neogitogenin) takođe poseduju hipolipemično, antiflogistično i antimikrobno dejstvo. Njihovo hipolipemično dejstvo se objašnjava redukcijom absorpcije holesterola u crevima, kao i mehanizmom reakcije steroidnih saponina sa solima iz žuči, povećavajući izlučivanje kiselina iz žuči. Vodeni ekstrakti grčkog semena su pokazali pozitivan učinak u jačanju imunog sistema materice, creva i zaštitnog dejstva na srce. Vodeni ekstrakt je pokazao pozitivno dejstvo u lečenju čira (Czygan i sar, 2001). Od posebnog interesa je mogućnost dobijanja diosgenina iz grčkog semena. Diosgenin se koristi za polisintezu steroidnih hormona. Diosgenin pokazuje pozitivno dejstvo na metabolizam holesterola, od kojih je najznačajniji snižavanje koncentracije holesterola u krvi. Hipolipemijsko dejstvo diosgenina se objašnjava njegovom sposobnošću da inhibira absorpciju holesterola, kao i smanjenjem nivoa holesterola u jetri i pospešivanjem izlučivanja holesterola iz žuči (Sauvaire, 1991). Grčko seme je bogato fitoestrogenima, koji mogu biti za tradicionalnu upotrebu semena za povećanje količine mleka kod dojlja, rast grudi. Naime, smatra se da zadržavanjem vode, kao i blokiranjem absorpcije estrogena kod hormonskih poremećaja zbog povećanog nivoa estrogena koji može dovesti do pojave mioma, cisti i fibroadenoma. (Czygan i sar, 2001; European Pharmacopoeia 6.0; European Pharmacopoeia 8.0, WHO, 2007).



Slika 8. Farmakološko dejstvo grčkog semena sa raznim benefitima na zdravlje i metaboličke poremećaje

2.4.3.1. Hipolipemijska aktivnost ekstrakata grčkog semena

Grčko seme snižava trigliceride, totalni holesterol i holesterol niske gustine lipoprotein (LDL). Mehanizmi dejstva grčkog semena na snižavanje holesterola se objašnjavaju sprečavanjem apsorpcije holesterola u intestinalnom traktu, smanjenjem nivoa holesterola u jetri, kao i njegovim povećanim izlučivanjem iz žuči. Mehanizmi snižavanja holesterola primenom grčkog semena prikazani su na slici 9. Za različite vrste mehanizama smanjenja holesterola, odgovorne su i različite grupe jedinjenja, među kojima su najznačajniji steroidni sapogenini i fitosteroli.

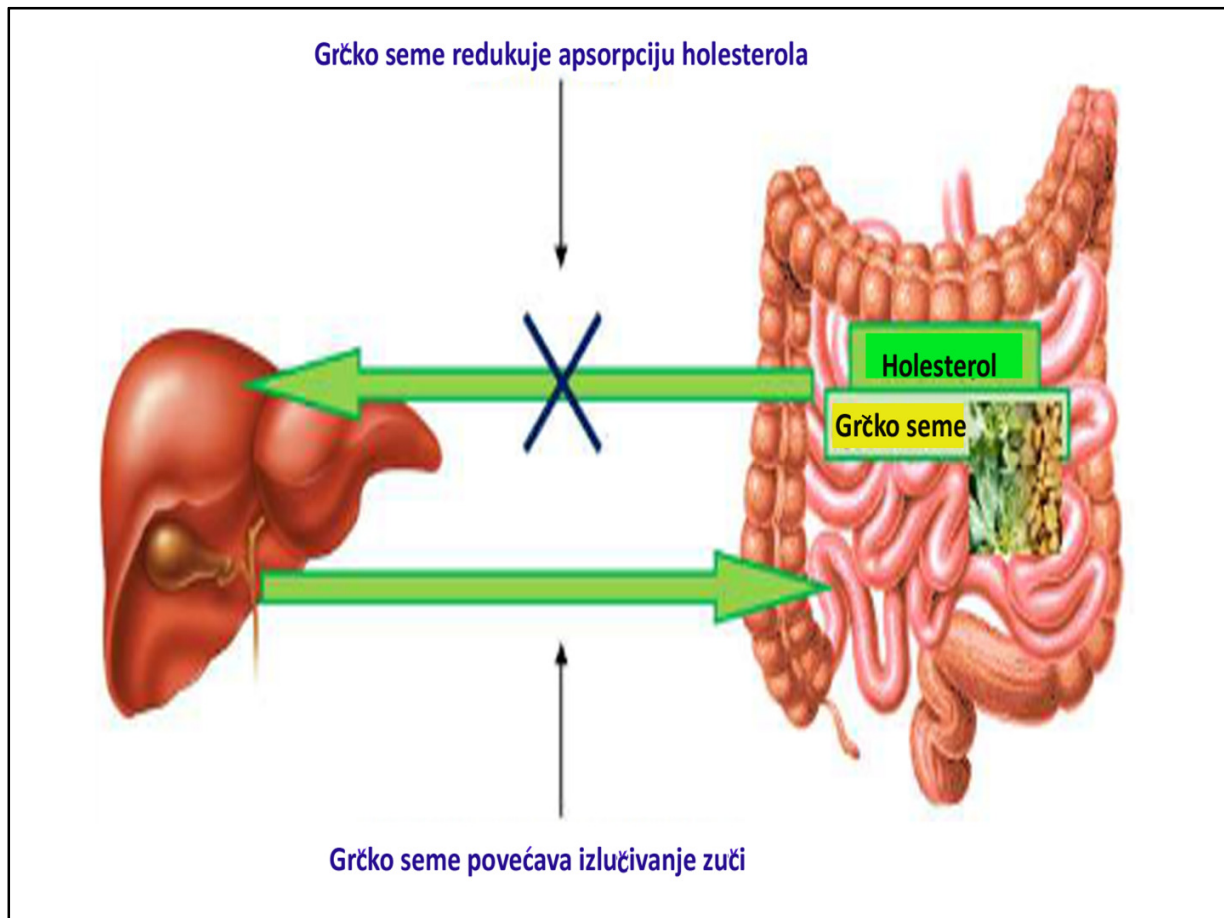
Dejstvo steroidnih sapogenina se ispoljava povećavanjem izlučivanja holesterola iz žuči dovodeći do snižavanja nivoa holesterola. Izlučivanjem holesterola iz žuči na prirodan način se

reguliše nivo holesterola, pri čemu se iz žuči izlučuje tzv. skladišten loš oksidirani holesterol. Usled povišenog holesterola, najčešće je izbacivanje holesterola iz žuči onemogućeno usled lenjih creva, pa sapogenini iz grčkog semena omogućavaju vezivanje holesterola i njegovo izbacivanje iz žuči u vidu fekalnog otpada, smanjujući njegov nivo (Basch i sar, 2003; Bordia i sar, 1997; Stark i sar, 1993).

Pozitivno dejstvo fitosterola (sitosterola, kampesterola, fukosterola, holesterola, stigmasterola i dr.), koji su prisutni u količini od 0,2% u semenu se prezentuje kroz njihovu sposobnost da redukuju nivo holesterola u krvi. Fitosteroli koji su strukturno najbliži holesterolu, smanjuju skladištenje rezervi holesterola u žuči, smanjujući na taj način apsorpciju holesterola. Ubrzavanjem metabolizma holesterola, takođe dolazi do njegove smanjene apsorpcije. Shodno tome, aktivnost LDL receptora i sinteza holesterola se smanjuje što dovodi do konačnog smanjenja LDL koncentracija serumskog holesterola (Jong, 2003).

Sposobnost snižavanja holesterola može biti pripisana i estrogenim konstituentima koji indirektno pospešuju hormone štitne žlezde T4. (Bordia i sar, 1997). Antioksidativna svojstva grčkog semena imaju snažan uticaj na oksidaciju LDL holesterola koja vodi aterosklerozi. Postoji mogućnost da snižavanje holesterola potiče od aktivnosti fitosterola za koje je dokazano da inhibiraju adsorpciju holesterola u crevima tako što formiraju komplekse sa njima. Još jedan način hipolipemijskog dejstva semena je intenziviranje difuzije dietetskih vlakana kroz creva, čime se podstiče resorpcija holesterola u crevima.

Grčko seme je poznato i po hipoglipemičnom dejstvu. Hiperglipemija je poznat rizičan faktor za hiperlipidemiju. Grčko seme povećava broj insulinskih receptora i smanjuje količinu glukoze u krvi, ali mehanizam ovog dejstva nije razjašnjen. Hipoglipemični efekti, primenom grčkog semena, nastaju stimulacijom sekrecije insulina kao i inhibicijom α -amilaze i sukraze, dva intestinalna enzima uključena u metabolizam ugljenih hidrata (Hannan i sar, 2003; Xue i sar, 2007; Kassaian i sar, 2009; Kaviarasan i sar, 2007; Narender i sar, 2006; Belguith-Hadrichei sar, 2010).



Slika 9. Mehanizam hipolipemijskog dejstva grčkog semena (preuzeto iz predavanja "Fitoterapija primenjena na bolesti metabolizma", prof. Svetlana Kulevanova, Farmaceutski fakultet, Skoplje

2.5. Klasični postupci izolovanja bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala

Postoji niz ekstrakcionih tehnika za izolovanje različitih klasa biološki aktivnih jedinjenja iz biljnog materijala (Wang i Weller, 2006; Azmir i sar, 2013). Izbor tehnike zavisi od grupe jedinjenja koja se želi izolovati shodno njihovoj hemijskoj strukturi, pa se prvo mora voditi računa o selektivnosti procesa kojim se ekstrahuju jedinjenja. Pored karakteristika rastvarača (npr: lipofilnost, toksičnost itd), odabir procesa ekstrakcije zavisi od selektivnosti metode, prinosa ekstrakcije, kao i od termolabilnosti komponenata na primenjenim uslovima, mogućnosti uklanjanja rastvarača od dobijenih ekstrakata dužine i ekonomičnosti procesa. Pri proizvodnji biljnih ekstrakata primaran cilj je obezbediti što bolji prinos i kvalitet proizvoda. Faktori koji

utiču na izbor postupka su: vrsta biljke, sadržaj ulja u biljci, deo biljke u kom su željene komponente locirane (koren, kora, stablo, list, cvet, plod ili seme), hemijski sastav, prinos i kvalitet ekstrakta koji obezbeđuje primenjeni postupak, ali i vrednost ostatka, biomase, posle završene ekstrakcije. Sve ove karakteristike su odlučujuće u izboru tehnike ekstrakcije kako bi se što efikasnije dobio što kvalitetniji, čistiji ekstrakt bogat bioaktivnim komponentama sa što povoljnijim prinosom. S obzirom da sve raspoložive tehnike ekstrakcije poseduju prednosti i nedostatke, potrebno je pri izolaciji bioaktivnih komponenata razmotriti njihove karakteristike i opredeliti se za najbolju opciju. U tom smislu natkritična ekstrakcija je čestonajprihvatljivija metoda ekstrakcije sa brojnim prednostima koja omogućava dobijanje čistog i kvalitetnog ekstrakta i bez dalje potrebe za njegovim prečišćavanjem, a uz očuvanje termolabilnih komponenata.

Etarska ulja su aromatični isparljivi biljni izolati, koji se dobijaju tretiranjem određenih delova biljke pogodnim postupkom. Sastav etarskih ulja čine složene smese različitih jedinjenja kojih može biti u velikom broju, a koji se mogu podeliti prema biosintetskom putu kao terpeni ugljovodonika, sastavljenih od monoterpena, seskviterpena, diterpena. Ostali deo sastava mogu činiti kiseline, zasićene i nezasićene, sumporna i azotna jedinjenja. Za razliku od masnih ulja, etarska ulja su isparljiva i ne podležu reakcijama saponifikacije. Često su zapaljiva, rastvorljiva u alkoholu i etru i samo slabo rastvorljiva u vodi.

Etarska ulja su smeštena u sekrecionim strukturama, koje se nalaze unutar ili na površini biljke (Svoboda i sar, 2000; Jončić i sar, 1995). Biljke i njihova etarska ulja su se od davnina koristili u tradicionalnoj medicini za lečenje mnogih poremećaja i oboljenja, ali su savremene metode brojnih istraživanja dokazale da su etarska ulja farmakološki aktivna, sa ispoljenim antioksidativnim, antibakterijskim, analgetskim, spazmolitičkim i antiinflamatornim svojstvima. (Edris, 2007; Bakkali i sar, 2008).

Usled značajnih farmakoloških efekata, etarska ulja našla su široku primenu u medicini, farmaciji, prehrambenoj industriji, kozmetici, industriji aromatičnih napitaka, veterini i u aroma terapiji. Iz etarskih ulja mogu se dobiti čiste komponente ili smeše komponenata, od kojih potiče karakterističan prijatan miris (Glišić i sar, 2007).

2.5.1. Presovanje mehaničkim putem

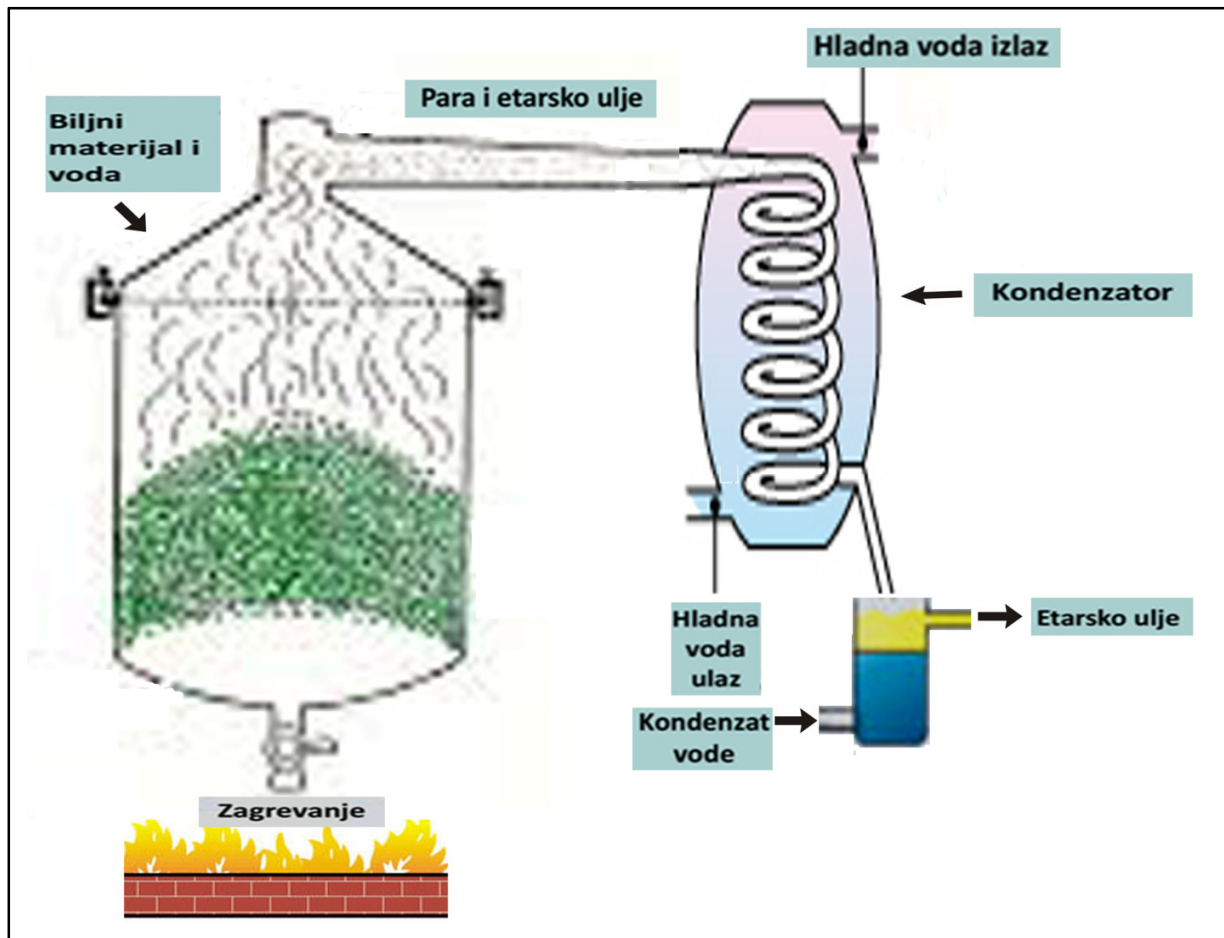
Postupak se izvodi na sobnoj temperaturi, primenom ručnih ili automatskih presa. Primenuje se na sirov biljni materijal, sa visokim sadržajem ulja smeštenim u perifernim rezervoarima biljke Hladnim presovanjem dolazi do pucanja vazikula i oslobađanjabiljnih metabolita, pri tome se iz tkiva biljne mase izdvaja i sok, tako da zajedno daju emulziju. Iz emulzije, etarsko ulje se izdvaja: ultracentrifugiranjem, filtriranjem, primenom enzima ili naknadnom destilacijom pomoću vodene pare (Skala i sar, 1999). Etarsko ulje dobijeno na ovaj način boljeg je kvaliteta nego proizvedeno destilacijom, ali prinos je manji, uz povećanje vremena izolovanja ulja.

2.5.2. Hidrodestilacija

Etarska ulja se tradicionalno dobijaju postupkom hidrodestilacije na atmosferskom ili sniženom pritisku (vakuum destilacija). Osnovne prednosti postupaka hidrodestilacije je mogućnost prerade velikih količina biljne sirovine na jednostavan i ekonomičan način, što ih čini najčešće primenjivanim i dostupnim postupcima za izdvajanja ulja iz lekovitih i aromatičnih biljaka. Prilikom destilacije dolazi do hidrolize pojedinih komponenata ulja što je uzrokovano visokom temperaturom i što predstavlja jedan od glavnih nedostataka ove metode pri ekstrakciji etarskih ulja iz biljnog materijala.

Postupak hidrodestilacije se primenuje za izolovanje, prečišćavanje ili razdvajanje supstanci koje se ne mešaju ili se neznatno mešaju sa vodom. Temperatura ključanja smeše koju čine voda i biljni materijal je temperatura na kojoj je suma parcijalnih pritisaka komponenata jednaka atmosferskom pritisku. Procedura se sastoji u destilaciji vode iz vodenog rastvora koji sadrži organska jedinjenja, pri čemu para nosi sa sobom i organske komponente. Biljni materijal se kuva u destilovanoj vodi, pri čemu se sistem izoluje kako bi se održavao konstantan nivo vode i omogućilo njeno kruženje tj. vraćanje u balon sa biljnim materijalom. Pare koje isparavaju iz smeše, a zatim se kondenzuju i kruže u sistemu, sadrže smešu vode i etarskog ulja, pri čemu se destilat koji sadrži vodu i etarsko ulje dalje razdvajadekantacijom i drugim separacionim postupcima.

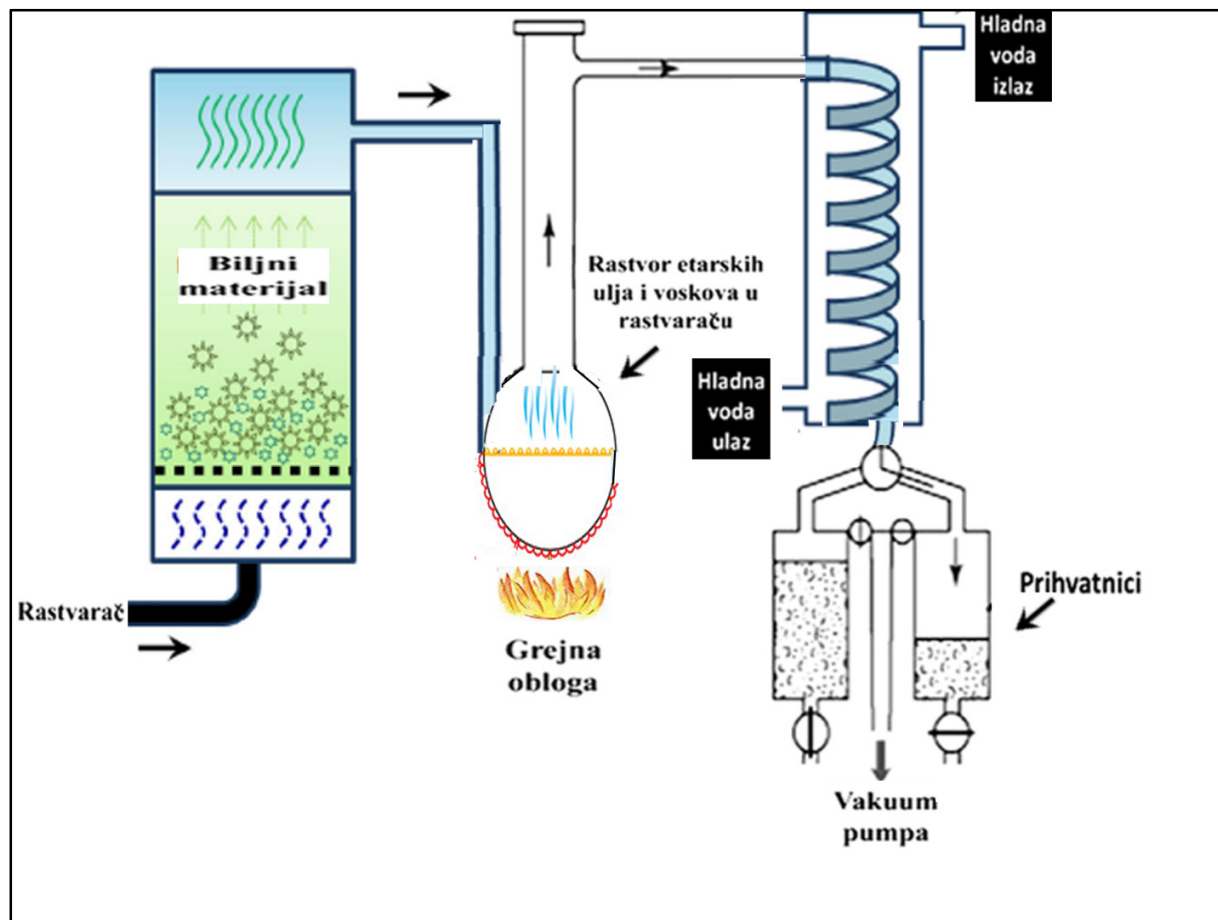
Primenjuju se tri načina izvođenja hidrodestilacije: klasična, vodeno-parna i parna. Klasična hidrodestilacije se primenjuju prelivanjem biljnog materijala vodom i zagrevanjem do ključanja (Stanković i sar., 1994). Biljni materijal se kuva u ključaloj vodi, dok pare koje isparavaju napuštaju sud i kondenzuju se u kondenzatoru, nakon čega se destilat sakuplja u posebnom sudu kroz koji i dalje tokom procesa kruži destilat ali se zbog težine etarskih ulja i vode, konstantno odvajaju uljana i vodena faza, čija jasna granica i omogućava separaciju etarskog ulja od vode. Prinos etarskog ulja je veoma nizak i slabijeg kvaliteta što ovu metodu svrstava kao najmanje poželjnu u ekstrakciji bioaktivnih komponenata iz biljnog materijala. Zbog malog prinosa i slabog kvaliteta etarskog ulja, ovaj postupak se primenjuje u ruralnim sredinama daleko od industrijskih postrojenja, kod malih proizvođača za koje je investicija u kotao za paru velika. Na ovaj način najčešće se destiliše ulje lavande, majčine dušice i ružino ulje. Retko se koristi jer tokom procesa može doći do saponifikacije estara, koja je često ubrzana katalitičkim dejstvom nekog metala prisutnog u materijalu od koga je načinjen sud, i nepovoljnog delovanja povišene temperature (Skala i sar., 1999).



Slika 10. Šema postrojenja za običnu hidrodestilaciju

2.5.3. Ekstrakcija organskim rastvaračima

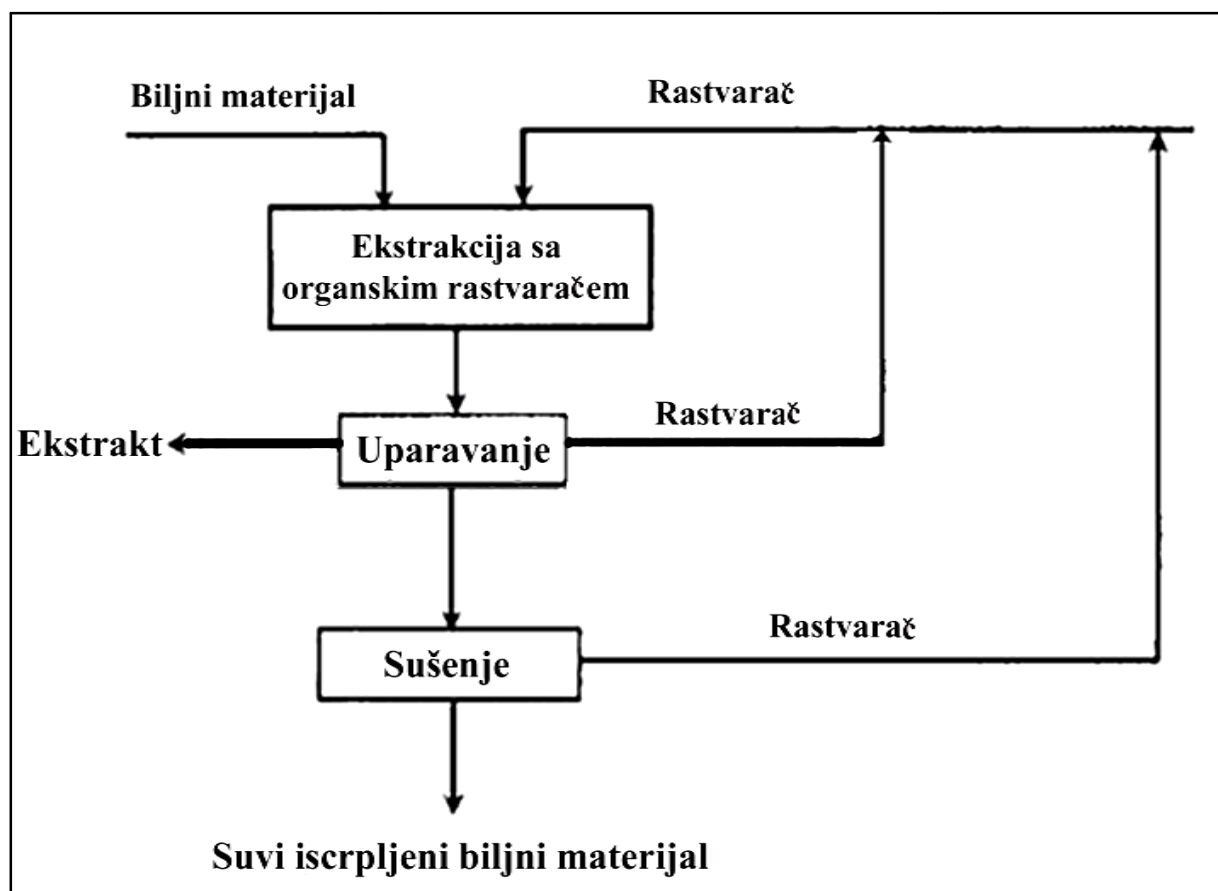
Ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja pomoću organskih rastvarača je često primenjivana ekstrakciona tehnika za dobijanje biljnih ekstrakata. Od polarnih rastvarača, najčešće se koriste voda, etanol, metanol i glicerol, a od nepolarnih n-heksan, aceton, petroletar, dietiletar, benzen i dr.



Slika 11. Šematski prikaz postrojenja za ekstrakciju organskim rastvaračima

Korišćeni organski rastvarači se odstranjuju uparavanjem na sniženim pritiscima, pri čemu pri samom uparavanju na povišenoj temperaturi može doći do termalne degradacije bioaktivnih komponenata osetljivih na povišenu temperaturu. Lipofilni deo koji zaostaje nakon uparavanja je sastavljen od etarskog ulja i lipofilnih supstanci (smole, masti, voskovi). To je tzv. konkret, koji se dalje tretira etanolom kako bi se etarsko ulje odvojilo od ostalih materija i koriste se kao mirisne supstance u proizvodnji sapuna i krema. Destilacijom konkreta vodenom parom dobijaju se etarska ulja (Skala i sar, 1999). Ovim postupkom (tehnikom) dobijaju se fina etarska ulja koja su zadržala prirodni miris biljke i kao takva koriste se u industriji parfema. Otparavanjem polarnih rastvarača dobija se tzv. rezinoid. Nedostaci ekstrakcije organskim rastvaračima su njihovo zaostajanje u manjoj ili većoj meri u izolovanom ekstraktu, što ograničava njihovu primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji usled toksičnosti prisutnih rastvarača. Usled zaostajanja rastvarača u ekstraktu, javljaju se dodatni troškovi zbog potrebe prečišćavanja, što produžava proces dobijanja ekstrakata iz biljnog materijala, kao i troškovi

regeneracije utrošenih rastvarača i njihov štetan uticaj na životnu sredinu. Šematski prikaz postupka ekstrakcije organskim rastvaračima, koji je praćen procesom upravanja kako bi se dobio zaostali ekstrakt, prikazan je na slici 12. Kao otežavajuća okolnost u separaciji bioaktivnih komponenata iz biljnog materijala može biti i potreba za primenom više rastvarača zbog neadekvatne selektivnosti prema određenim grupama jedinjenja koje sadrži određeni biljni materijal.



Slika 12. Šematski prikaz postupka izolacije biološki aktivnih ekstrakata iz biljnog materijala ekstrakcijom sa organskim rastvaračima

2.6. Ekstrakcija ugušćenim ugljenik(IV)-oksidom

2.6.1. Subkritična ekstrakcija (SKE)

Tridesetih godina prošlog veka otkrivena je mogućnost primene ugljenik(IV)-oksida za tečnu i natkritičnu ekstrakciju (Pilat, 1936a; Pilat, 1936b). Po tom principu, subkritični i natkritični fluidi su predloženi kao pogodni za ekstrakciju ulja i lipidnih komponenata, iako njihova aplikacija nije do tada bila primenjena niti ispitana (Dickinson, 1947; Groll, 1953; Palmer, 1950). Tokom šezdesetih godina prošlog veka, ideja ekstrakcije lipida i ostalih komponenata pomoću tečnog i natkritičnog ugljenik(IV)-oksida je dobila veći značaj (Zosel, 1964). Primenjena je ekstrakcija lipida iz suncokreta, soje i kikirikija ugljenik(IV)-oksidom na povišenim pritiscima (Vitzthum, 1972.). Tokom eksperimenata utvrđeno je da mnoge komponente lipidnih struktura, koje su se destilacijom izdvajale pod vakuumom i na visokim temperaturama, mogu biti ekstrahovane na blažim temperaturnim uslovima u slučaju ekstrakcije ugljenik(IV)-oksidom na povišenim pritiscima (Peter, 1976). Dalja istraživanja u oblasti ekstrakcije primenom ugljenik(IV)-oksida kao rastvarača u ugušćenom stanju tj. u tečnom ili natkritičnom stanju, omogućena su dizajniranjem postrojenja na laboratorijskom nivou (Stahl, 1976). Utvrđeno je da većina nepolarnih jedinjenja može biti ekstrahovana na pritisku u opsegu od 80 do 200 bara. Ekstrakcija polarnih komponenti, praktično nerastvorljivih u ugljenik(IV)-oksidu, se nije značajnije povećavala i sa većim povećanjem pritiska (Stahl, 1978). Kasnijim istraživanjima je pak utvrđeno da se i rastvorljivost polarnijih komponenti može pospešiti podešavanjem procesnih parametara ekstrakcije (Stahl, 1980) kao i dodatkom polarnog kosolventa. Upoređivanjem ekstrakcije iz biljnog materijala tečnim i natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom sa aspekta totalnog ekstrakta, uočena je podjednaka efikasnost u ekstrakciji na nižim pritiscima, dok je na povišenim pritiscima efikasnost natkritične ekstrakcije bila veća. Primećeno je da se pri većim pritiscima smanjuje količina utrošenog ugljenik(IV)-oksida za ekstrakciju (Stahl, 1980).

Prednost ekstrakcije ugušćenim fluidima u tzv. subkritičnim uslovima nad klasičnim načinima ekstrakcije se ogleda u kraćem vremenu ekstrakcije, većem kvalitetu ekstrakata,

odsustvu tragova rastvarača, manjim troškovima operativnim i u usklađenosti sa zahtevima zaštite životne sredine (Herrero i sar, 2006, Kubátová i sar, 2001).

Fluidi koji se koriste za subkritičnu ekstrakciju su voda, propan i ugljenik(IV)-oksid. Za ekstrakciju aromatičnih jedinjenja iz biljnog materijala najčešće se koristi subkritični ugljenik(IV)-oksid u tečnom stanju na 0°C do 10° C i 60-80 bara. Tečni ugljenik(IV)-oksid je rastvarač kojim se, pored etarskog ulja, izoluju jedinjenja koja etarskom ulju daju obojenje i povećavaju stabilnost etarskog ulja. Zahvaljujući ovoj osobini povećana je primena etarskog ulja u industriji parfema (Skala i sar, 2002). Subkritičnom ekstrakcijom na niskim temperaturama u ulju zadržavaju se najisparljivije komponente koje bi se izgubile pri klasičnim tehnikama ekstrakcije na povišenoj temperaturi ili delom rastvorile u rastvaraču za ekstrakciju. Etarska ulja ekstrahovana pomoću subkritičnog ugljenik(IV)-oksida su koncentrovanija od ulja dobijenih hidrodestilacijom ili ekstrakcijom organskim rastvaračima, usled manje koncentracije monoterpena, koji doprinose razblaženju (Skala i sar, 2002). U uslovima subkritične ekstrakcije dobijaju se ekstrakti sa većim prinosom nego u slučaju natkritične ekstrakcije, ali je njihova moć ratsvorljivosti manja prema neisparljivim ili polarnijim komponentama u odnosu na natkritičnu ekstrakciju. Efikasnost subkritične i natkritične ekstrakcije može biti uslovljena nizom promenljivih, kao što su procesni uslovi temperature i pritiska, vreme ekstrakcije, protok ugljenik(IV)-oksida, kao i kombinacijom ovih parametara (Vidovic i sar, 2011).

2.6.2. Natkritična ekstrakcija (NKE)

Natkritična ekstrakcija je postupak ekstrakcije fluidom koji se nalazi u natkritičnom stanju, na temperaturi i pritisku iznad kritičnih vrednosti za određen fluid. U natkritičnim uslovima postoji samo jedna tzv. natkritična faza u kojoj se fluid nalazi u stanju ugušćenog gasa. Iznad kritične tačke, daljim povećanjem temperature, dato jedinjenje se ne može prevesti u gas, niti se daljim povećanjem pritiska može prevesti u tečnost.

Osnovna prednost natkritične ekstrakcije u odnosu na standardne vidove separacije je u tome što se ona izvodi na umerenim temperaturama (za fluide sa umerenim kritičnim temperaturama kao na pr. ugljenik(IV)-oksid), te se može primeniti za izdvajanje slabo isparljivih i termički nestabilnih jedinjenja. Primena natkritičnih fluida omogućava laku separaciju rastvorka od rastvarača, kao i relativno jednostavnu selektivnu ekstrakciju, jer se

promenom njihove gustine mogu regulisati prinos i sastav ekstrakta koji se dobija. Zbog toga je ovaj način ekstrakcije od posebnog interesa za prehrambenu i farmaceutsku industriju, ali i za rafinerijske procese prerade nafte. Ekstrakcija natkritičnim fluidima već dugo se proučava kao alternativa konvencionalnim procesima separacije. Ovaj način ekstrakcije je naročito efikasan za izolaciju supstanci srednjih molskih masa i manje polarnosti. Natkritični fluidi rastvaraju neočekivano velike količine slabo polarnih jedinjenja, a rastvorljivost slabo isparljivih organskih jedinjenja u natkritičnim fluidima znatno je veća od one koja bi se mogla očekivati s obzirom na njihov napon pare.

2.6.2.1. Natkritični fluidi i njihove osobine

Fluidi koji se najčešće primenjuju kao natkritični fluidi su: ugljenik(IV)-oksid, voda, freon, azot, azot(II)-oksid, amonijak, eten, metan, etan, propan, propen i metilamin. Vrednosti fizičkih parametara fluida u natkritičnom stanju nalaze se između vrednosti parametara gasova i tečnosti, pa natkritični fluidi poseduju osobine i gasova i tečnosti, kako je to prikazano u tabeli 1. (Rizvi i sar., 1986).

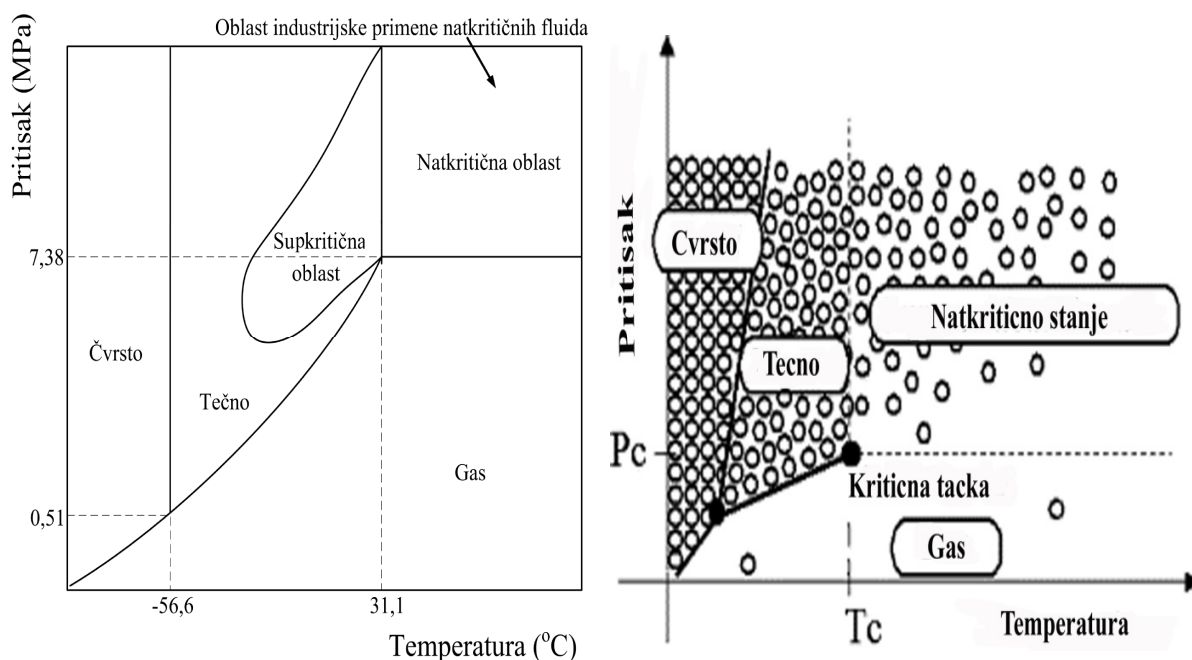
Tabela 1. Karakteristične vrednosti nekih fizičkih parametara ugljenik(IV)-oksida u različitim stanjima (Brunner, 2005)

	Gustina (g/cm³)	Difuzivnost (cm²/s)	Viskoznost (g/cm s)
Gas P=101,3 kPa T=15-30°C	(0,6-2,0)x10 ⁻³	0,1-0,4	(1,0-3,0)x10 ⁻⁴
Natkritični CO₂ P=P _c , T=T _c P=4P _c , T=T _c	0,2-0,5 0,4-0,9	0,7x10 ⁻³ 0,2x10 ⁻³	(1,0-3,0)x10 ⁻⁴ (3,0-9,0)x10 ⁻⁴
Tečnost P=101,3kPa, T=15-300C	0,6-1,6	(0,2-2,0)x10 ⁻⁵	(0,2-3,0)x10 ⁻⁴

Natkritični fluidi imaju veliku gustinu, blisku tečnosti, što pozitivno utiče na njihovu moć rastvaranja. Vrednosti difuzivnosti i viskoznosti natkritičnih fluida su slične vrednostima

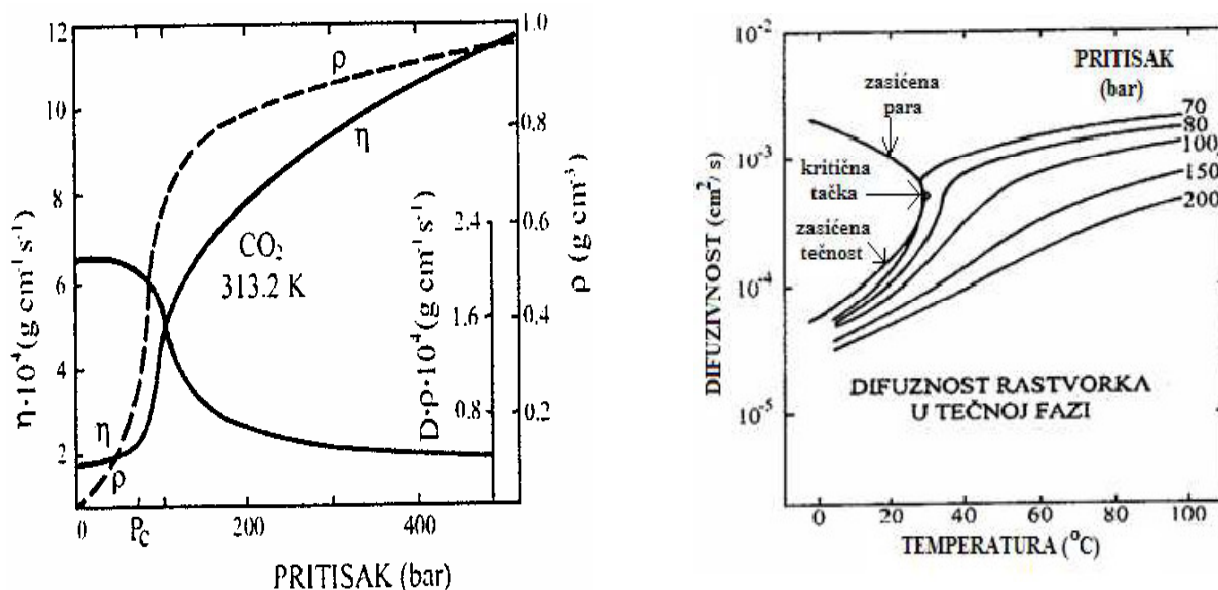
difuzivnosti i viskoznosti gasova. Vrednosti viskoznosti i difuzivnosti doprinose mogućnosti lakog i brzog prodiranja natkritičnog fluida u biljni materijal. Ove osobine čine natkritične fluide pogodnim rastvaračima za procese ekstrakcije.

Najširu primenu među natkritičnim fluidima ima ugljenik(IV)-oksid (CO_2) zbog svojih optimalnih osobina: netoksičan je, nezapaljiv, hemijski inertan, ima veliku čistoću, jeftin je, lako dostupan iz velikog broja izvora i ima povoljne kritične parametre. Na Slici 13. je prikazan fazni dijagram za CO_2 na kome se mogu uočiti trojna tačka ($-56,6^\circ\text{C}$ i $0,51\text{ MPa}$) i kritična tačka ($31,1^\circ\text{C}$ i $7,38\text{ MPa}$). U trojnoj tački čvrsta, tečna i gasovita faza su u ravnoteži. Iznad kritične tačke se nalazi natkritična oblast u kojoj je CO_2 u natkritičnom stanju. U oblasti iznad trojne tačke i ispod kritične tačke, CO_2 može postojati i kao bezbojna tečnost u tzv. subkritičnoj oblasti.



Slika 13. Fazni dijagram (pritisak-temperatura) za ugljenik(IV)-oksid.

Karakteristična promena difuzivnosti i viskoznosti natkritičnih fluida sa promenom pritiska i temperature može se videti na slikama 12 i 13, na primeru CO_2 .



Slika 14. Fizičko-hemijske osobine CO_2 : a) viskoznost, gustina i difuzivnost i b) difuzivnost (Brunner, 2005)

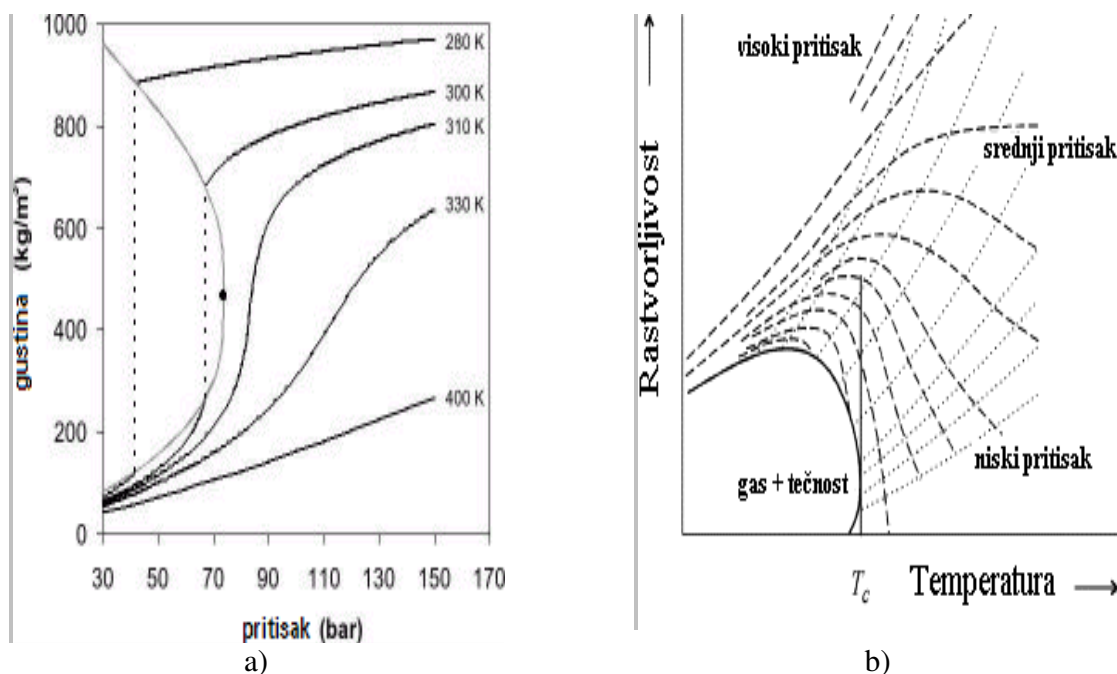
Vrednosti kritičnih parametara CO_2 omogućavaju da se proces ekstrakcije izvodi na relativno niskim temperaturama, što može da bude od velikog značaja pri ekstrakciji termički nestabilnih supstanci. Sposobnost rastvaranja se lako može podesiti pogodnim izborom radnih uslova.

2.6.2.2. Moć rastvaranja natkritičnih fluida

Natkritični fluidi imaju osobine koje mogu da se podešavaju promenom temperature, pritiska ili promenom sastava fluida (Kiran i Balkan, 1994). Osobine natkritičnih fluida na datim uslovima određuju rastvorljivost komponenata u sistemu. Na Slici 15. se može videti promena gustine CO_2 po Benderovoj jednačini. Variranjem pritiska i temperature mogu se podešavati gustine natkritičnih fluida koje direktno određuju i moć rastvaranja. U oblasti neposredno iznad kritične tačke, relativno male promene pritiska ili/i temperature, dovode do evidentnih promena gustine fluida, a samim tim i do bitnih razlika u osobinama i moći rastvaranja koje fluid ispoljava. Sa porastom temperature iznad kritične tačke, gustina rastvarača znatno opada, pa se smanjuje sposobnost rastvorljivosti rastvorka. Međutim, na visokim temperaturama, porast napona pare rastvorka ima veći uticaj na njegovu rastvorljivost od smanjenja gustine rastvarača,

pa dolazi do porasta rastvorljivosti sa porastom temperature (Slika 15b.). Promene rastvorljivosti rastvorka sa promenom pritiska i temperature su od velikog praktičnog značaja. Na Slici 15b. predstavljena je zavisnost rastvorljivosti slabo isparljivih jedinjenja (tečnosti i čvrstih supstanci) od temperature i pritiska u subkritičnom ($T < T_c$) ili natkritičnom fluidu ($T > T_c$). Na datom dijagramu, izobare su označene isprekidanim linijama, dok tačkastim linijama označena stanja jednake gustine fluida (Brunner, 2005).

Širok opseg izbora procesnih parametara pritiska i temperature omogućava prednost primene natkritičnih fluida.



Slika 15. a) Promena gustine CO₂ (Marr i Gamse, 2000) i b) Promena rastvorljivosti nekih slabo isparljivih jedinjenja (Brunner, 2005)

2.6.2.3. Prednosti i nedostaci NKE

U procesima izolacije biološki aktivnih ekstrakata ili pojedinih komponenti iz biljnog materijala najčešće se koriste subkritični i natkritični ugljenik(IV)-oksid. Upotreba ugljenik(IV)-oksida u natkritičnoj ekstrakciji omogućava pogodnost dobijanja ekstrakata različitog kvaliteta i kvantiteta u zavisnosti od procesnih parametara. Prinos dobijenih ekstrakata tokom procesa subkritične i natkritične ekstrakcije je uporedljiv sa prinosom ekstrakata dobijenih tradicionalnim

tehnika ekstrakcije, pri čemu je značajna prednost natkritične ekstrakcije jer nema zaostalih toksičnih rastvarača u ekstraktu, čije dalje prečišćavanje iziskuje dodatne troškove i vreme u procesu. Takođe, natkritična ekstrakcija se izvodi na relativno niskim temperaturama, omogućava ekstrakciju jedinjenja koja se denaturišu u slučaju ekstrakcije tradicionalnim tehnikama (Stahl, 1980).

CO₂ ima najčešću primenu u procesima NKE zato što je nereaktivan, netoksičan, nezapaljiv i stabilan rastvarač, bez boje, ukusa i mirisa, lako dostupan i jeftin, čist, potpuno neškodljiv po čovekovo zdravlje i životnu sredinu i može se reciklirati. Relativno niske vrednosti kritičnih parametara CO₂ (Pc=7,38 MPa i Tc=31,1 °C) omogućavaju ekstrakciju na niskim pritiscima i temperaturama, čime se sprečava razgradnja termolabilnih komponenti u ekstraktu (Reverchon, 1997a). Zamenom organskih rastvarača sa nkCO₂, koji se lako regeneriše u procesu, eliminisani su problemi i troškovi vezani za odlaganje i tretman velikih količina toksičnih organskih rastvarača. Tehnologijama koje se zasnivaju na primeni natkritičnih fluida se dobijaju proizvodi sa izuzetnim karakteristikama u pogledu kvaliteta. Takođe, operativni troškovi su znatno niži u poređenju sa konvencionalnim procesima koji zahtevaju velike količine energije za uparavanje organskog rastvarača ili vode. Sa druge strane, potrebna su veća investiciona ulaganja u poređenju sa procesima koji se izvode na niskim pritiscima. Kapitalna investiciona ulaganja se mogu smanjiti i brzo nadoknaditi izgradnjom postrojenja sa velikim proizvodnim kapacitetom, sa mogućnošću proizvodnje više proizvoda (Skala i sar, 2002).

2.6.2.4.Primena natkritičnih fluida

Od prošlog veka natkritični fluidi dobijaju na značaju po mogućnosti i sposobnosti za razvoj novih procesa. Od osamdesetih godina prošlog veka natkritični fluidi se istražuju ili primenjuju kao rastvarači za dobijanje etarskih ulja i ekstrakata, za procesiranje hrane, nutraceutika, polimernih materijala, kao reakcioni medijum za procese polimerizacije, kao ekološki poželjniji rastvarač za proizvodnju prahova, impregnaciju, inkapsulaciju, čišćenje, rast kristala i kao sredstvo za mešanje i/ili spajanje kristalnih ili viskoznih materijala (Shen i sar, 2008).

Natkritični fluidi se osim za procese natkritične ekstrakcije mogu upotrebljavati u velikom broju procesa kao što su natkritično sušenje, natkritična impregnacija i brojni procesi

generisanja čestica. Ovi procesi su mogući zbog izražene sposobnosti natkritičnih fluida da rastvaraju veliki broj supstanci i difunduju kroz veliki broj materijala.

Natkritični fluidi imaju primenu u industriji hrane, pića, kao i u petrohemijskoj, biohemijskoj, farmaceutskoj, polimernoj i biopolimernoj industriji (Knez i sar., 2014). Intenzivno proučavanje procesa NKE započeto je 70-tih godina XX veka, što je rezultovalo brojnim patentima u oblasti NKE hmelja, kafe, čaja, duvana i začina (Skala i sar., 2002). Primena NKE u industrijskim razmerama započeta je 80-tih godina dvadesetog veka i to u rafinerijskoj obradi nafte, kod prerade kafe i čaja (proces dekofeinizacije) i ekstrakcije hmelja (Martinez i Samuel, 2008). Krajem 80-tih godina izgrađena su velika postrojenja za preradu kafe i ekstrakciju hmelja u SAD-u i manja postrojenja za proizvodnju komponenata za lekove, kozmetičke preparate i različite prirodne proizvode u Japanu, Južnoj Koreji i Indiji. U oblasti neposredno iznad kritične tačke, relativno male promene pritiska ili/i temperature, dovode do evidentnih promena gustine fluida, a samim tim i do bitnih razlika u osobinama i moći ratsvaranja koje fluid ispoljava.

Najveća postrojenja za NKE su postrojenje za ekstrakciju kofeina iz kafe i čaja, hmelja i za uklanjanje pesticida iz pirinča (Gamse, 2005). Natkritični fluidi se u industriji koriste i za hemijske i biohemijske reakcije (npr. heterogena kataliza organskih jedinjenja) kao zamena za organske rastvarače. Uspešna industrijska primena procesa natkritične impregnacije sa nkCO_2 je za impregnaciju drveta (Gamse, 2005). Primena natkritične ekstrakcije na industrijskom nivou i suvo bojenje tkanina (Zizovic i sar., 2014).

Danas u svetu postoji velika tendencija za uvođenjem novih alternativnih tehnologija koje imaju tzv. zeleni efekat i imaju manje štetno dejstvo koje su dosadašnje industrije ispoljavale na životnu sredinu, koje ne uključuju primenu organskih rastvarača opasnih po okolinu i čovekovo zdravlje, i koje su energetske efikasnije i sa manje sporednih proizvoda (Knez i sar., 2014). Pored zakonske regulative vezane za zaštitu životne sredine, postoje sve veći zahtevi potrošača za konzumiranjem tzv. „funktionalne“ hrane, koja, pored nutritivnih vrednosti, pokazuje i farmakološku aktivnost za regulisanje niza metaboličkih poremećaja i različitih oboljenja. Stoga, velika pažnja i energija se posvećuje istraživanjima koja vode ka optimizaciji izolovanja grupa jedinjenja iz biljnih sirovina sa izraženim farmakološkim dejstvom. Razvojem tehnoloških procesateži se omogućavanju dobijanja aktivnih komponenata sa najvećim mogućim prinosom, u što čistijem obliku, kako bi njihova primena bila što efikasnija. U daljoj budućnosti

teži se tendenciji sveprisutnije primene aktivnih supstanci iz prirodnih izvora, poboljšanju tehnologija za njihovo izolovanje sa težnjom povećanja kvaliteta i kvantiteta izolovanih komponenata. S obzirom da natkritična ekstrakcija zadovoljava tendencije i potraživanja današnjeg društva za očuvanjem životne sredine, omogućavajući dobijanje čistih farmakološki aktivnih komponenata iz prirodnih izvora, potreba za sve većom implementacijom natkritične ekstrakcije na industrijskom nivou je u ekspanziji i prednosti nad ostalim tradicionalnim tehnikama.

2.7. Mehanizam procesa i matematičko modelovanje NKE

Etarska ulja se u biljnom tkivu proizvode i skladište u sekrecionim strukturama. Sekrecione strukture su karakteristika biljne familije i to mogu biti trihomi, sekrecione ćelije, šupljine ili cevčice. Uz poznavanje tipa sekrecione strukture u kojoj je smešteno etarsko ulje i optimalan predtretman biljnog materijala kako bi se ove strukture razorile moguće je optimizovati proces NKE etarskog ulja. U slučaju matičnjaka, etarska ulja su skladištena u glandularnim trihomama na površini lista, a sekundarni metaboliti koji su nosioci antioksidantne aktivnosti smešteni su dublje u biljnom tkivu. Na slici 10 prikazan je mikroskopski snimak trihoma matičnjaka (*Melissa officinalis* L.), karakterističan za biljke porodice Lamiaceae, kojoj pripadama matičnjak.



Slika 16. Primer trihoma i uljanih žlezdi kod matičnjaka (*Melissa officinalis* L.) (<http://www.sciencephoto.com/>)

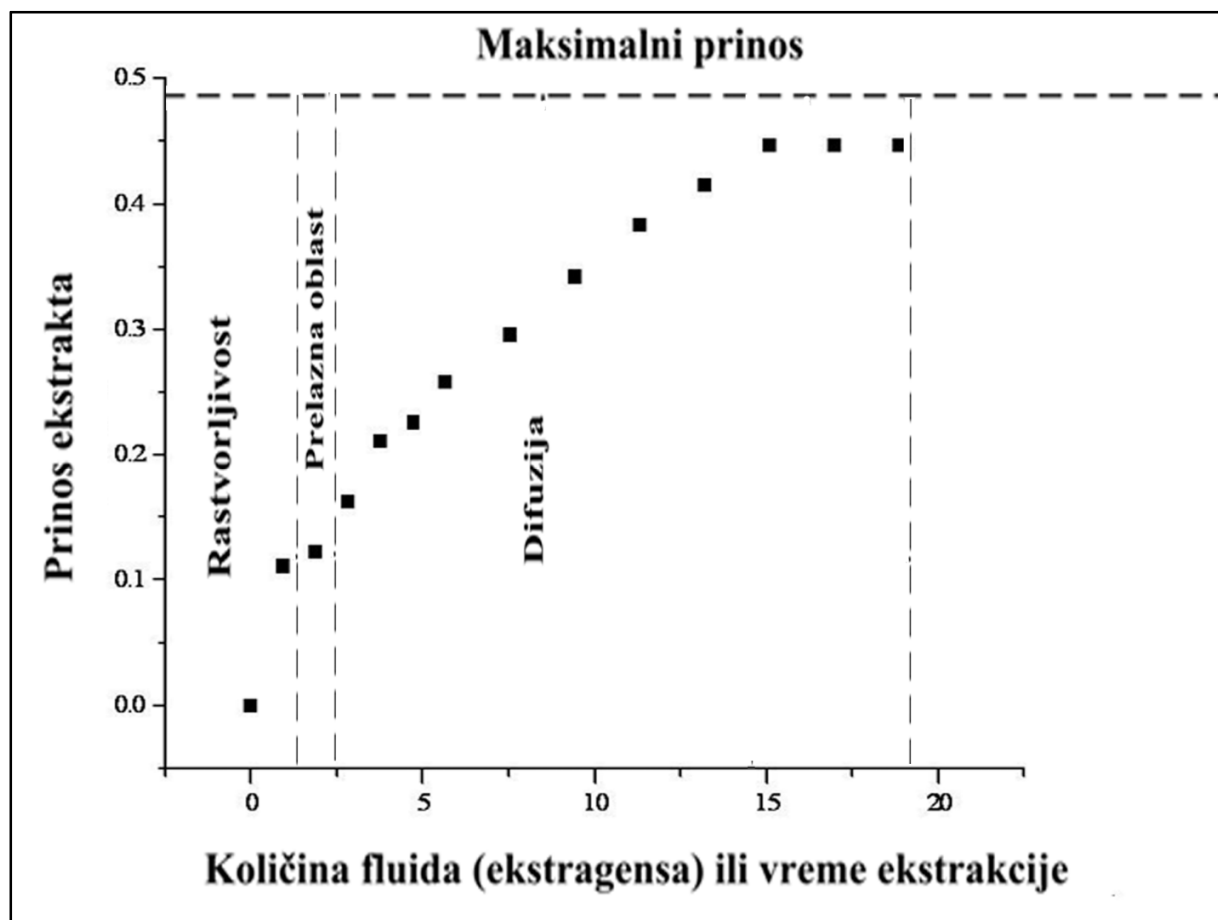
Mlevenjem se postiže razaranje jednog dela trihoma i time se smanjuje otpor prenosu mase u čvrstoj fazi. Natkritični ugljenik(IV)-oksid prodire u nerazorene trihome i rastvara se u ulju unatar njih. Usled rastvaranja CO₂ u ulju, zapremina trihoma raste i konačno dolazi do njihovog pucanja. Na taj način nove količine etarskog ulja postaju lako dostupne za ekstrakciju. Ovakvo ponašanje glandularnih trihoma izloženih NKCO₂ je potvrđeno SEM analizom (Stamenic i sar, 2008, Stamenic i sar, 2010; Zizovic i sar, 2005).

Praćenjem kinetike procesa NKE tokom vremena trajanja ekstrakcije, mogu se uočiti zakonitosti u vidu različitih perioda na dijagramima koji predstavljaju zavisnost prinosa ekstrakta u odnosu na vreme trajanja ekstrakcije. Naime, često su uočljiva dva dela krive od kojih prvi predstavlja brzu ekstrakciju u vidu prave karakteristične za ekstrakciju lako dostupnih količina ekstrahovane supstance oslobođenje mlevenjem gde je proces limitiran spoljnim prenosom mase. Drugom periodu prethodi prelazna oblast koja predstavlja nestašicu lako dostupnih količina i proces je limitiran, dolazi do privremenog zastoja u prinosu ekstrakta, dok dolazi do bubrenja materijala i oslobađanja ekstrahovane supstance nakon čega se nagib krive znatno povećava, predstavljajući drugi period ekstrakcije limitiran unutrašnjom difuzijom kroz čvrstu česticu

biljnog materijala. To se odražava na krivu tako što se prinos i nagib znatno smanjuju, pa ekstrakcija dostiže asimptotske vrednosti.

Postoji više objašnjenja za ponašanje ekstrakcionih kriva. Različiti pristupi dozvoljavaju stvaranje fizičkih slika o samom procesu što dalje prouzrokuje različite modele ekstrakcije. Ukoliko koncept nije dobar, model nije u stanju da adekvatno opiše proces. Matematičko modelovanje teži da što preciznije prikaže fizičku sliku realnosti.

Brzina NKE u početnoj fazi ekstrakcije zavisi od ravnoteže faza (rastvorljivost datih komponenti) na datom pritisku i temperaturi (ekstrakciona kriva je linearna) (slika 8). Nakon određenog vremena, ekstrakciona kriva dobija konveksni oblik usled promene otpora prenosu mase (usled povećanja uticaja difuzije kroz čvrstu fazu). Na kraju procesa ekstrakcije, brzina zavisi samo od difuzije kroz čvrstu poroznu fazu. Mehanizmi difuzije mogu, u nekim slučajevima, biti veoma složeni u zavisnosti od supstrata koji se ekstrahuje (Lee, 1990). Usled istraživanja i primene natkritične ekstrakcije, javila se i potreba za razumevanjem ovih procesa. Sa tom svrhom razvijani su matematički modeli za opisivanje i bolje razumevanje ovih procesa. Prema pristupu procesu NKE, modeli mogu biti empirijski (Kandiah i sar, 1990.; Nguyen i sar, 1991), zasnovani na analogiji prenosa toplote i prenosa mase (Bartle i sar, 1990; Reverchon i sar, 1993) ili na integraciji diferencijalnog materijalnog bilansa za ekstraktor (Reverchon, 1996; Sovova, H., 1994; Roy i sar, 1996).



Slika 17. Tipična zavisnost prinosa ekstrakta u funkciji vremena ekstrakcije ili količine utrošenog rastvarača (preuzeto iz Lee i sar, 1990).

Ukoliko je kontrolišući stupanj procesa spoljašnji prenos mase ili ravnoteža faza, brzina ekstrakcije podešava se pravilnim izborom protoka NK CO₂. U većini slučajeva, kad je difuzija u poroznoj strukturi biljnog materijala, odnosno difuzija kroz čvrsto, najsporiji stupanj, stepen usitnjenosti i bubrenje biljnog materijala ima ključnu ulogu (Reverchon, 2006; Stamenic i sar, 2010.).

Poslednjih godina je razvijeno više matematičkih modela za procese NKE koji se zasnivaju na rešavanju diferencijalnog materijalnog bilansa za ekstraktor, a najveći broj modela kao najsporiji stepen ekstrakcionog procesa uzima difuziju u unutrašnjosti čestice.

(Bartle i sar, 1990) su uveli model ekstrakcije zasnovan na analogiji sa prenosom toplote, po kom se sve čestice biljnog materijala smatraju sferama i jednačine kojima se opisuje hlađenje "vrole kugle" koriste se da bi se opisao profil koncentracija unutar čestica tokom

vremena. Taj pristup dalje su usvojili i korigovali (Reverchon, 1994). Njihov korigovan model uključivao je pretpostavku da je etarsko ulje smešteno u unutrašnjem delu lista, a da se voskovi nalaze na površini lista. Nakon mlevenja, čestice biljnog materijala se posmatraju kao sfere. Model opisuje prenos mase između jedne sferične i porozne čestice i natkritičnog rastvarača. Ekstrakcioni proces su činili difuzija natkritičnog rastvarača kroz film oko čvrste čestice, prodiranje i difuzija kroz česticu, rastvaranje rastvorka u natkritičnom fluidu, difuzija rastvorka i rastvarača kroz česticu i zatim kroz film oko čestice do mase fluida. Kasnije je (Reverchon, 1996) razvio model i za NKE etarskog ulja, pretpostavljajući je da je etarsko ulje smešteno u vakuolama unutar ćelija, tako da je frakcija slobodno dostupnog ulja na površini čestica zanemarljiva, pa je koeficijent spoljnog prenosa mase mogao biti zanemaren. Goto i sar, 1993, su razvili model koji je zasnovan na lokalnoj adsorpcionoj ravnoteži etarskog ulja na lipidima biljnog lista. Modelovanje procesa NKE etarskih i masnih ulja koji je razvila Sovová, 1994a se najčešće primenjivao u dosadašnjim literaturnim podacima. Model podrazumeva klipno proticanje fluida kroz pakovani sloj biljnog materijala, sa pretpostavkom da su čestice istih dimenzija i da je rastvorak podjednako raspoređen u biljnom materijalu u biljnim ćelijama. Proces ekstrakcije po ovom modelu obuhvata tri perioda ekstrakcije koje čine period brze ekstrakcije u kome se ekstrahuje lako dostupna frakcija ulja osobođena iz mlevenjem razorenih biljnih ćelija (brzina ekstrakcije limitirana je rastvorljivošću datih komponenti na datim uslovima pritiska i temperature), prelazni period u kome brzina ekstrakcije pored rastvorljivosti počinje da biva limitirana i difuzijom u čvrstoj fazi, i period spore ekstrakcije u kome je brzina određena samo difuzijom rastvorka u čvrstoj fazi (ekstrakcija teže dostupne frakcije ulja iz nerazorenih ćelija). Kasnije je Sovova, 2005 razvila novi model za NKE prirodnih proizvoda, zasnovan na netaknutim i razorenim uljnim ćelijama, sa dva ekstrakciona perioda, pri čemu u toku prvog perioda brzina ekstrakcije je limitirana rastvorljivošću lako dostupnog rastvorka u natkritičnom rastvaraču, dok u drugom periodu, ukupnu brzinu procesa određuje difuzija unutar čestice. Goodarznia i Eikani, 1998 su razvili troparametarski model. Parametri su koeficijenti prenosa mase, aksijalne disperzije i difuzije unutar čestice. Poslednji koeficijent je parametar za „fitovanje“ modela, dok se prva dva predskazuju primenom eksperimentalnih korelacija. Reis-Vasco i sar, 2000 su razvili dva modela za NKE etarskih ulja, sa pretpostavkom da se deo etarskog ulja nalazi u glandularnim trihomima na površini lista, a deo u unutarljivoj strukturi lista. Model razmatra desorpciju etarskog ulja lociranog blizu površine lista i otpor prenosu mase pri

ekstrakciji ulja iz unutrašnje strukture lista. Drugi model je uključio i aksijalnu disperziju (Gaspar, 2003a) su razvili model sa pretpostavkom pločaste geometrije biljnog materijala i lokacijom etarskog ulja u glandularnim trihomima. Gaspar, 2003b. su uveli metod za razaranje trihoma brzom CO₂ dekompresijom kao vrstu predtretmana za NKE. Nedostatak ovog metoda je to što brze dekompresije, zbog svog uticaja na opremu i velike potrošnje energije, nisu poželjna operacija u industrijskim uslovima.

Razvoj fiziologije biljaka, kao i eksperimentalnih tehnika za izolovanje sekrecionih struktura i njihovog sadržaja, omogućio je precizniji uvid u strukturu biljnog materijala, tj. u vrstu, oblik i dimenzije sekrecionih struktura u kojima se nalaze etarska ulja. Zahvaljujući tome, omogućen je bolji uvid i precizniji pristup u modelovanju i optimizaciji sa ciljem da se opišu i razumeju pojave tokom procesa NKE (Zizović i sar., 2005, 2007a,b; Stamenić i sar., 2008, 2010).

Modelovanje na nivou sekrecionih struktura (Zizovic i sar, 2005 , Stamenic i sar, 2008;), uzima u obzir prenos mase iz realnih sekrecionih struktura u masu natčritičnog fluida, izotermne i izobarne uslove, kao i postojanje aksijalne disperzije NK CO₂ u ekstraktoru uz konstantni protok CO₂. Po ovom modelu kao i kod modela Sovove, ekstrakt koji se nalazi u realnim, sekrecionim strukturama aproksimiran je pseudokomponentom. Na osnovu ponašanja odgovarajućih sekrecionih struktura tokom procesa NKE i rezultata modelovanja, izvršena je klasifikacija biljnog materijala na osnovu otpora prenosu mase tokom ekstrakcionog procesa (Stamenic i sar, 2008). Pokazalo se da je brzina NKE kod biljaka sa sekrecionim kanalima i šupljinama (Zizovic i sar, 2007b), limitirana brzinom spoljašnjeg prenosa mase, dok je kod biljnih vrsta čiji su sekundarni metaboliti skladišteni u sekrecionim ćelijama ukupna brzina NKE procesa limitirana difuzijom u čvrstoj fazi (Zizovic i sar, 2007a). Kod NKE biljaka Lamiaceae u kojima se etarsko ulje nalazi u glandularnim trihomima, na ukupnu brzinu procesa ekstrakcije utiču spoljašnji prenos mase u periodu brze ekstrakcije, odnosno difuzija u čvrstoj fazi u periodu spore ekstrakcije (Stamenic i sar, 2008; Stamenic i sar, 2010; Zizovic i sar, 2005).

2.7.1. Matematičko modelovanje procesa NKE

Matematičkim modelovanjem dobijenih eksperimentalnih rezultata, omogućava se formiranje zakonitosti radi efikasnijeg razumevanja i praćenja datog procesa ekstrakcije. Dobile zakonitosti se mogu primeniti i za ispitivanje potencijalnih procesnih uslova koji nisu obuhvaćeni eksperimentom. Primenjen matematički model treba da pokazuje pravu sliku realnosti natkritičnog procesa i kao takav se smatra relevantnim, pouzdanim i upotrebljivim.

Postoje tri glavna pristupa matematičkom modelovanju procesa natkritične ekstrakcije (Reverchon, 2006):

- *empirijsko modelovanje*

Nastali iz eksperimentalnih podataka, ovi modeli praktično predstavljaju interpolaciju samih rezultata. Mogu da budu korisni ukoliko podaci o mehanizmu prenosa mase i ravnoteži nisu dostupni. Van samog eksperimenta nisu naročito upotrebljivi pa je njihov značaj mali.

- *modelovanje zasnovano na analogiji prenosa toplote*

Uzima se analogija fenomena prenosa mase i toplote i primenjuje na natkritičnu ekstrakciju. Svaka čestica biljnog materijala se posmatra kao zagrejana sfera koja se hladi u medijumu uniformnog sastava. To podrazumeva da je materija koja se ekstrahuje ravnomerno raspoređena u čestici, i da se sve čestice u istom trenutku nalaze na istim uslovima tokom ekstrakcije. Kao glavni nedostatak navodi se pretpostavka o istim uslovima kroz ceo sloj biljnog materijala. Koncept empirijskog i modelovanja zasnovanog na analogiji sa prenosom toplote napušten je relativno brzo, da bi se u potpunosti prešlo na koncept rešavanja diferencijalnog masenog bilansa za reaktor.

- *modelovanje zasnovano na integraciji diferencijalnog masenog bilansa*

Ovo je, za sada, najšire primenjen oblik modelovanja procesa natkritične ekstrakcije iz biljnog materijala. Zasnovan je na postavljanju diferencijalnog masenog bilansa za deo ekstraktora i njegovoj integraciji za ceo ekstraktor. U ovu kategoriju spadaju modeli Sovove, koji se primenjuju u ovom radu i kasnije biće detaljno obrađeni.

2.7.1.1. Empirijsko modelovanje

Empirijski modeli nastaju iz eksperimentalnih podataka i mogu biti korisni ukoliko podaci o mehanizmu prenosa mase i ravnoteži nisu dostupni. Njihov značaj je mali za procesne uslove koji prevazilaze okvire eksperimentalnih, jer ovi modeli praktično predstavljaju interpolaciju eksperimentalnih rezultata (Reverchon, 2006). Pri empirijskom modelovanju procesa NKE korišćene su dve vrste empirijskih formula, prva, Langmuir-ovog tipa koja je data jednačinom (1):

$$Y = \frac{Y_{\infty} \cdot t}{B + t} \quad (1)$$

i druga, tipa kinetike prvog reda data jednačinom (2):

$$\frac{dq_{rs}}{dt} = -k \cdot q_{rs} \quad (2)$$

gde je t - vreme, Y - prinos, k - kinetička konstanta, B - konstanta, i q_{rs} - preostala količina ekstrakta u čestici biljnog materijala.

2.7.1.2. Modelovanje zasnovano na analogiji sa prenosom toplote

Proces natkritične ekstrakcije se posmatra kroz fenomene prenosa toplote, pri čemu se svaka čestica biljnog materijala posmatra kao zagrejana sfera koja se hladi u medijumu uniformnog sastava. Pretpostavke su da je materija koja se ekstrahuje ravnomerno raspoređena u čestici i da se sve čestice u istom trenutku nalaze na istim uslovima ekstrakcije (Bartle i sar., 1990; Hong i sar., 1990; Reverchon i sar., 1993, 1994).

Primenom drugog Fikovog zakona difuzije, maseni bilans za jednu česticu sfernog oblika može se napisati na sledeći način:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{D}{r^2} \frac{\partial \left(r^2 \frac{\partial q}{\partial r} \right)}{\partial r} \quad (3)$$

Korišćenjem analogije između prenosa toplote i mase, i nakon Furijeovih transformacija, može se definisati materijalni bilans za česticu biljnog materijala:

$$\frac{q}{q_0} = \left(\frac{6}{\pi^2} \right) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp \left(- \frac{n^2 \pi^2 D t}{r^2} \right) \quad (4)$$

gde je: n - ceo broj, r - prečnik sfere, D - koeficijent difuzije u sferi ili unutrašnji efektivni koeficijent difuzije, t - vreme ekstrakcije, q - preostala koncentracija rastvorka u sferi i q_0 , početna koncentracija materije koja se ekstrahuje.

Glavni nedostatak modela po analogiji sa prenosom toplote je pretpostavka o istim uslovima ekstrakcije kroz ceo sloj biljnog materijala. Koncept empirijskog i modelovanja zasnovanog na analogiji sa prenosom toplote je napušten relativno brzo, da bi se skoro u potpunosti prešlo na koncept rešavanja diferencijalnog masenog bilansa za ekstraktor.

2.7.1.3. Modelovanje zasnovano na integraciji diferencijalnog masenog bilansa

Koncept modelovanja zasnovan na integraciji diferencijalnog masenog bilansa za ekstraktor je najšire primenjen oblik modelovanja procesa NKE iz biljnog materijala. Zasnovan je na postavljanju diferencijalnog masenog bilansa za deo ekstraktora i njegovoj integraciji za ceo ekstraktor. Osnovne pretpostavke modela zasnovanih na integraciji diferencijalnog masenog bilansa su konstantna gustina rastvarača i protok natkritičnog fluida kroz sloj čestica, zanemarljiva aksijalna disperzija, kao i aproksimacija kojom se etarsko ulje može okarakterisati osobinama jedne, izabrane pseudokomponente (Žižović, 2010).

Uzimajući u obzir ove pretpostavke moguće je napisati jednačine materijalnog bilansa za diferencijalni deo ekstraktora (5) i čvrstu fazu (6):

$$uV \frac{\partial c}{\partial h} + \varepsilon V \frac{\partial c}{\partial t} + (1 - \varepsilon)V \frac{\partial q}{\partial t} = 0 \quad (5)$$

$$(1 - \varepsilon)V \frac{\partial q}{\partial t} = -A_p K_c (q - q^*) \quad (6)$$

gde je ε - poroznost sloja, V - zapremina ekstraktora, c - koncentracija ekstrakta u natkritičnom fluidu, q - koncentracija ekstrakta u čvrstoj fazi, u - prividna brzina strujanja fluida, A_p - ukupna površina čestica, q^* -ravnotežna koncentracija na granici faza čvrsto-fluid, K - koeficijent prenosa mase kroz česticu, t - vreme i h - prostorna koordinata ekstraktora.

Imajući u vidu imaseni bilans za jednu česticu sfernog oblika (jednačine 3 i 4), moguće je dobiti i profil koncentracija unutar čestica. Poznavajući početne i granične uslove, kao i uslove ravnoteže, jednačine (5) i (6) se mogu rešiti pogodnom numeričkom metodom.

Maseni bilans čvrste faze može biti napisan i za jednu česticu sfernog oblika:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{D_e}{r^2} \frac{\partial (r^2 \frac{\partial q}{\partial r})}{\partial r} \quad (7)$$

gde je D_e – unutrašnji koeficijent difuzije. U ovom slučaju moguće je i dobiti i profil koncentracija unutar čestica. Poznavajući početne i granične uslove, kao i uslove ravnoteže, jednačine (5) i (6) mogu biti rešene pogodnom numeričkom metodom (Žižović, 2009).

Danas se natkritična ekstrakcija posmatra i na nivou sekrecionih struktura pa se prema tome matematičko modelovanje ovog procesa naziva još i mikroskopski nivo opisa procesa. Modeli Sovove spadaju u grupu modela pod nazivom „*modeli naprsnutih i sačuvanih ćelija*”. Ćelije u ovom slučaju predstavljaju čestice čvrste faze bilnog materijala.

Matematički model Sovove

Najviše primenjivani model u literaturi za natkritičnu ekstrakciju iz biljnog materijala jeste predložila Sovova (Sovova i sar, 1994). Model Sovove ima generalizovani oblik koji omogućava njegovu primenu za NKE bilo kog biljnog materijala i na ekstrakciju kako lakših etarskih frakcija, tako i težih frakcija.

Model posmatra klipno proticanje natkritičnog rastvarača prividnom brzinom U kroz fiksirani sloj mlevenog biljnog materijala u aksijalnom pravcu cilindričnog ekstraktora. Rastvarač je čist na ulazu u ekstraktor i temperatura i pritisak se smatraju konstantnim. Raspored i veličina čestica u sloju su homogeni. Materijalni bilans za deo cevnog ekstraktora se može predstaviti sledećim jednačinama:

$$-\rho_s(1 - \varepsilon) \frac{\partial x}{\partial t} = J(x, y) \quad (8)$$

$$\rho\varepsilon \frac{\partial y}{\partial t} + \rho U \frac{\partial y}{\partial h} = J(x, y) \quad (9)$$

Prvi član u bilansu za natkritičnu fazu (jednačina 9) je odraz nestacionarnosti procesa i može se zanemariti, pa je pojednostavljen sistem jednačina:

$$-\rho_s(1 - \varepsilon) \frac{\partial x}{\partial t} = J(x, y) \quad (10)$$

$$\rho U \frac{\partial y}{\partial h} = J(x, y)$$

Sistem jednačina (10) se rešava za granične uslove:

$$x(h, t = 0) = x_0 \quad (11)$$

$$y(h = 0, t) = 0 \quad (12)$$

Osnovna pretpostavka modela je da je deo ćelija (hipotetičkih jedinica u kojima je sadržana rastvorljiva supstanca tj. ulje) otvoren ili razoren procesom mlevenja. Na početku procesa ekstrakcije ukupna količina rastvorka u biljnom materijalu **O**, se može podeliti na lako dostupnu količinu, **P**, i količinu teže dostupnog rastvorka koja se nalazi unutar netaknutih ćelija, **K**:

$$\mathbf{O}=\mathbf{P}+\mathbf{K} \quad (13)$$

Količina ulja na početku procesa ekstrakcije se može predstaviti kao:

$$x(t=0) = x_0 = \frac{O}{N} = x_p + x_k = \frac{P}{N} + \frac{K}{N} \quad (14)$$

gde je **N** masa nerastvorene čvrste biljne materije u natkritičnom fluidu.

Da bi se predstavila analitička rešenja sistema jednačina (10) potrebno je uvesti bezdimenzione promenljive r, Y, z, τ :

$$r = \frac{x}{x_k}, \quad Y = 1 - \frac{y}{y_r}, \quad z = \frac{k_f a_0}{U} h, \quad \tau = \frac{k_f a_0 \rho y_r}{(1-\varepsilon) \rho_s x_k} \quad (15)$$

Veličina x_k se može objasniti i na sledeći način: kada pri iscrpljivanju biljnog materijala lako dostupnim rastvorkom, masa rastvorljivih supstanci po masi nerastvorljive čvrste faze opadne na vrednost x_k menja se mehanizam prenosa mase, tada se mogu napisati sledeće jednačine za brzinu prenosa mase, J :

$$J(x > x_k, y) > J(x \leq x_k, y) \quad (16)$$

$$J(x > x_k, y) = k_f a_0 \rho (y_r - y) \quad (17)$$

$$J(x \leq x_k, y) = k_s a_0 \rho_s x \quad (18)$$

Jednačine (10) i granični uslovi (11) i (12) uvođenjem bezdimenzionih promenljivih dobijaju novu formu:

$$\frac{\partial r}{\partial \tau} = \frac{\partial Y}{\partial z} = -J^*(r, Y) \quad (19)$$

$$r(z, \tau = 0) = r_0 \quad (20)$$

$$Y(z = 0, \tau) = 1 \quad (21)$$

gde je

$$J^*(r, Y) = J(x, y)/(k_f a_0 \rho y_r) \quad (22)$$

Lako dostupno ulje iz razorenih biljnih ćelija se prvo ekstrahuje, a zatim sledi sporija ekstrakcija iz netaknutih ćelija. Proces se deli na tri perioda: brz, prelazni i spor period. U prvom periodu brzina ekstrakcije je limitirana rastvorljivošću lako dostupnog ulja. U jednom trenutku τ_m , lako dostupno ulje na ulazu u ekstraktor biva iscrpljeno i počinje prelazni period. U prelaznom periodu lako dostupno ulje se i dalje ekstrahuje u jednom delu (pri izlazu) ekstraktora dok u drugom se ekstrakcija vrši iz čvrstih čestica. Granica između ova dva dela fizički ne postoji ali u ovom modelu je matematički definisana i čini sastavni deo modela koji opisuje prelaz između mehanizama. Zamisao ovog modela jeste da se granica, z_w , pomera duž reaktora sve dok ne stigne do izlaza iz reaktora, a da vreme za koje je prešlo taj put definiše prelazni period u kome postoje dva različita režima. Nakon isteka prelaznog perioda, lako dostupnog ulja više nema u sloju i ostaje samo ekstrakcija iz čvrstih čestica određena internom difuzijom.

Udeo ekstrakta ukupne mase biljne sirovine koji se ekstrahuje tokom sva tri perioda i samim tim simulacija ekstrakcione krive je predstavljena kao:

$$e = \begin{cases} qy_r[1 - \exp(-Z)] & \text{za } q < q_m \\ y_r[q - q_m \exp(z_w - Z)] & \text{za } q_m \leq q \leq q_n \\ x_0 - \frac{y_r}{W} \ln \left\{ 1 + \frac{[\exp(\frac{Wx_0}{y_r}) - 1] \exp[W(q_m - q)]x_k}{x_0} \right\} & \text{za } q \geq q_n \end{cases} \quad (23)$$

gde je

$$Z = k_f a_0 H / U \quad (24)$$

$$W = k_s a_0 / [\dot{q}(1 - \varepsilon)\rho_s] \quad (25)$$

$$z_w = \frac{Zy_r}{Wx_0} \ln \frac{x_0 \exp[W(q - q_m)] - x_k}{x_0 - x_k} \quad (26)$$

$$q_m = (x_0 - x_k) / y_r Z \quad (27)$$

$$q_n = q_m + \frac{1}{W} \ln \frac{x_k + (x_0 - x_k) \exp(\frac{Wx_0}{y_r})}{x_0} \quad (28)$$

Karakteristika ovog modela je veliki broj parametara kojima se proces ekstrakcije opisuje, a koji se ne mogu izračunati. Vrednosti tih parametara se u velikom broju slučajeva pretpostavljaju tako da se ekstrakcioni prinosi predskazani modelom poklapaju sa eksperimentalno dobijenim prinosima, odnosno ovi parametri se optimizuju. To su:

k_s - koeficijent prenosa mase kroz čvrstu fazu, (m/s),

y_r - ravnotežna rastvorljivost ulja u natkritičnom ugljenik(IV)- oksidu, (kg ulja / kg CO₂),

x_k - kg ulja po kg nerastvorljive čvrste faze nakon iscrpljivanja biljnog materijala lako dostupnim uljem,

x_0 - kg ulja po kg nerastvorljive čvrste faze na početku ekstrakcije, bezdimenziona veličina.

2.8. Optimizacija procesa NKE

Optimizacija procesa NKE podrazumeva izbor procesnih parametara u cilju izolacije najveće količine ekstrakta željenog kvaliteta (željenih fizičko-hemijskih karakteristika i biološke aktivnosti) uz minimalnu potrošnju natkritičnog fluida i energije.

Efikasnost natkritične ekstrakcije zavisi pored podešavanja procesnih parametara pritiska i temperature, odnosno gustine ugljenik(IV)-oksida i od karakteristika jedinjenja ili grupe jedinjenja koja se žele izolovati iz biljnog materijala. Za što efikasnije iskorišćenje potencijala natkritičnog fluida, neophodno je poznavati rastvorljivost rastvorka u natkritičnom fluidu (Shen i sar, 2008). Poznavanje podataka o rastvorljivosti komponenti u natkritičnom fluidu je prvashodno od značaja da bi se utvrdili optimalni procesni uslovi kako bi ekstrakcija bila efikasnija i produktivnija (Adachi i Lu, 1983; Sovova i Jež, 1994). Usitnjenost i veličina čestica biljnog materijala utiče na efikasnost natkritične ekstrakcije zbog dostupnosti i načina skladištenja aktivnih jedinjenja u matriksu i ćelijama biljnog materijala. Difuzija rastvarača kroz poroznu strukturu biljnog materijala predstavlja značajan faktor u natkritičnoj ekstrakciji aktivnih komponenti. Manje čestice imaju manji otpor difuziji i samim tim ona je olakšana, čime se postiže brže i lakše izolovanje rastvorka iz biljnog matriksa. Međutim prilikom velike usitnjenosti biljnog materijala dolazi do isparavanja lakih komponenti u procesu mlevenja, a može doći i do kanalisanja u pakovanim sloju ili odnosšenja čestica, čime se smanjuje efikasnost procesa. Na osnovu dosadašnjih podataka za procese NKE najčešće se koristi biljni materijal sa ustinjenošću doprečnika čestice u opsegu 0,25-2,0 mm (Reverchon, 2006).

Procesne parametre koji utiču na moć rastvaranja ugljenik(IV)-oksida čine pritisak, temperaturai vreme zadržavanja rastvarača. Pravilnim izborom i definisanjem opsega ovih vrednosti može se postići potpuna ekstrakcija željenih komponenti za što kraće vreme u što većem prinosu, što bi i predstavljalo glavni cilj natkritične ekstrakcije.

Poželjna temperatura na kojoj se izvodi proces ekstrakcije bi trebalo da bude između 35 i 60 °C, tj. u blizini kritične tačke, ali i dovoljno niska da bi se izbegla degradacija termolabilnih komponenti. Promena pritiska ima značajniji uticaj na gustinu ugljenik(IV)-oksida, povećanjem pritiska povećava se i gustina, samim tim i moć rastvaranja, ali se smanjuje selektivnost, pa se procesni uslovi pritiska kreću najčešće u opsegu od 10MPa-30MPa. (Reverchon, 2006).

Izbor procesnih parametara zasniva se na proučavanju i razmatranju rastvorljivosti komponenti u natkritičnom fluidu kao rezultat napona para i interakcija rastvarač-rastvorak, razumevanje i interpretacija ponašanja faznog sistema u natkritičnoj oblasti primenom termodinamičkih modela kojima mogu da se opišu složene interakcije između molekula nepolarnog rastvarača i molekula rastvorka (Zhao, 2010). Potrebno je definisati i kinetičke parametre koji određuju brzinu prenosa mase. a to su spoljni prenos mase koji se može regulisati protokom ugljenik(IV)-oksida i unutrašnji prenos mase koji zavisi uglavnom od usitnjenosti i veličine čestica, a samim tim i dostupnosti aktivnih komponenata skladištenih u strukturi biljnog materijala.

2.8.1. Selektivnost natkritičnog ugljenik(IV)-oksida

Natkritični ugljenik(IV)-oksid se pokazao kao pogodan rastvarač za izolovanje nepolarnih komponenti, dok je njegov afinitet prema polarnim komponentama manji. Natkritična ekstrakcija se tako pokazala efikasnom u izolovanju jedinjenja sa većom molarnom masom i manje polarnosti. Natkritični ugljenik(IV)-oksid je odličan lipofilni rastvarač pa se često upotrebljava za ekstrakciju mirisnih komponenti i komponenti nosilaca ukusa (Reverchon, 1997a). Kako bi se poboljšala moć rastvaranja ugljenik(IV)-oksida prema polarnim komponentama, dodaju mu se organski rastvarači u malim količinama kao kosolventi, a najčešće etanol. Dodatkom kosolvenata povećava se interakcija između rastvorka i natkritičnog fluida usled povećanja gustine, hemijske interakcije (formiranje vodoničnih veza), promene strukture biljne matrice (strukturne promene, bubrenje) i raskidanja polarnih veza između rastvoraka i biljne matrice (Hamburger i sar., 2004.) Međutim, povećana moć rastvaranja uzrokuje smanjenje selektivnosti ugljenik(IV)-oksida (Cavero i sar., 2006). Nedostatak dodavanja kosolventa u cilju povećanja afiniteta natkritičnog ugljenik(IV)-oksida prema polarnim jedinjenjima se ogleda u potrebi za dodatnom separacijom kosolventa od ekstrakta (Reverchon, 2006).

Na osnovu literaturnih podataka o rastvorljivosti terpenskih jedinjenja i selektivnosti NK CO₂ u odnosu na ova jedinjenja, najčešći radni uslovi za izolaciju etarskih ulja su 10-15 MPa i 40-60 °C (Glisic i sar., 2010; Ivanović i sar., 2011a,b; Reverchon i sar, 1997b). Etarska ulja, sadrže u najvećoj količini mono- i seskviterpene. Uz ekstrakciju etarskog ulja, u manjoj meri, odvija se i ekstrakcija kutikularnih voskova, parafinskih komponenti na površini čestica biljnog materijala. Da bi se voskovi izdvojili iz ekstrakta, primenjuje se dvostepena separacija. Na primer,

posle ekstrakcije na 40 °C i 90 bar najpre se, u prvom separatoru, izvodi separacija na 0 °C i 90 bar pošto je rastvorljivost voskova u ugljenik(IV)-oksidu na ovim uslovima minimalna, a zatim se, u drugom separatoru, na 15 °C i 20 bar razdvaja ugljenik(IV)-oksid od etarskog ulja (Reverchon, 2006).

Ekstrakcija natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom koristi se i za dobijanje triacilglicerida, odnosno masnih biljnih ulja. Natkritična ekstrakcija triacilglicerida se vrši na višim pritiscima u odnosu na ekstrakciju etarskih ulja, zbog veće rastvorljivosti na višim pritiscima. Rastvorljivost etarskih ulja je takođe veća na višim pritiscima, ali se koriste niži da ne bi došlo do koekstrakcije težih komponenata.

Pojedine grupe jedinjenja je moguće ekstrahovati kako tradicionalnim tehnikama, tako i natkritičnom ekstrakcijom samo ukoliko se primeni predtretman biljnog materijala hidrolizom kako bi se komponente vezane za druga jedinjenja oslobodile i omogućila njihova izolacija, kao što je u slučaju izolovanja diosgenina iz biljnog materijala potrebno raskinuti njegove vodonične veze sa šećerima (Ghoreishi i sar, 2012; Mebaza i sar, 2009; Kang i sar, 2013).

2.8.2. Modelovanje NKE grčkog semena zasnovano na odzivnim površinama

Za određivanje optimalnih uslova natkritične ekstrakcije može se koristiti konvencionalni metod koji podrazumeva variranje jednog od ispitivanih faktora pri konstantnim vrednostima ostalih faktora. Budući da je jednodimenzionalan, ovaj težak i dugotrajan metod, često ne garantuje određivanje optimalnih uslova (Box i sar, 1978; Wernimont, 1995). Sa druge strane, izvođenje eksperimenata za svaku moguću kombinaciju ispitivanih faktora je nepraktično i zahteva dugotrajan rad.

Poslednjih decenija, u svim područjima istraživanja, primećen je sve veći porast statističkog planiranja eksperimenata, a izuzetno je korisna njegova upotreba pri optimizaciji tehnoloških i proizvodnih procesa. Kako je potreban relativno mali broj eksperimentalnih testova smanjuje se utrošak materijala i vremena potrebnog za izvođenje određenog eksperimenta, omogućava se dobar uvid u uticaj procesnih parametara na proces ekstrakcije u vidu prinosa, a takođe je moguće otkriti i međusobnu interakciju između ispitivanih parametara.

U statistički dizajniranim eksperimentima metodologija odzivnih površina zauzima značajno mesto u kombinaciji matematičkih i statističkih tehnika primenjenih u modelovanju i

analizi izlaznih veličina od interesa koji su pod uticajem nekoliko parametara i cilj je optimizacija izlazne veličine (Montgomery, 2005.). Metodologija odzivnih površina (Response Surface Methodology- RSM) koju su prvi put 1951 primenili i predstavili autori Box i Wilson (Box i Wilson, 1951) predstavlja optimizacioni sistem koji omogućava utvrđivanje relacija među procesnim parametrima ekstrakcije, kao i njihov pojedinačan uticaj na proces ekstrakcije. Najčešće je primenjena na istraživanja u oblasti hrane i biljaka, sa ciljem izolovanja aktivnih komponenata u vidu ekstrakata. Pristup metodologije odzivnih površina optimizaciji procesnih parametara ekstrakcije se najčešće primenjuje korišćenjem centralnog kompozitnog dizajna. Primena analize varijanse (ANOVA) služi proceni stepena tačnosti primenjene metodologije. RSM metodologija omogućava determinisanje sveobuhvatnog eksperimentalnog dizajna sa ciljem da se sa najvećom preciznošću i adekvatnošću utvrde relacije parametara na proces, kao i njihove potencijalne interakcije. Mogućnost da formiranjem i definisanjem jednačine modela omogući ne samo matematičku relaciju uticaja procesnih parametara na ekstrakciju, već i kasnije predviđanje izlazne veličine ekstrakcionog procesa (prinosa ekstrakcije, količine određene komponente ili grupe jedinjenja) na osnovu determinisane jednačine modela svrstava RSM metodologiju kao pogodnu od značaja za determinisanje ekstrakcionih procesa (Mohamad Said, 2015).

RSM metodologija može biti opisana kao tehnika sa kompleksnim kalkulacijama u cilju optimizacije procesa. Korišćenjem pogodnog eksperimentalnog dizajna koji integriše uticaj i varijacije procesnih parametara (nezavisnih promenljivih) determinišu se jednačine modela koje predstavljaju teoretsku zavisnost uticaja procesnih parametara na izlaznu veličinu ekstrakcionog procesa. Izlazne veličine nastaju iz regresione analize koja se zasniva na dobro dizajniranim kontrolisanim vrednostima nezavisnih promenljivih (Meilgaard i sar, 1991.; Resurreccion, 1998). Od kada je RSM metodologija prvi put predstavljena od strane autora Box i Wilson davne 1951.godine, broj eksperimentalnih ranova u dizajnu matrice eksperimenata se značajno smanjio prema broju ranova određenih punim faktorijalnim dizajnom. Osim redukcije u broju eksperimentalnih ranova, rezultati dobijenih analiza RSM metodologijom su pokazali i zadovoljili statističku prihvatljivost u pogledu tačnosti i preciznosti (Tan i sar, 2009) Primenom RSM metodologije u analizi uticaja procesnih parametara na process ekstrakcije i njene izlazne veličine, vreme analize je vrlo kratko omogućavajući testiranje i analizu uticaja svih parametara u opsezima zadatih vrednosti dizajna matrice eksperimenata, koji utiču na proces ekstrakcije, što

čini ovu metodologiju efikasnom u analizi i optimizaciji ekstrakcionih procesa (H. in H.J.H.M.& D.M.H.T, 1994). Određivanjem uticaja parametara RSM metodologijom i analizom dobijenih rezultata, definiše se uticaj promenljivih koji značajno utiču na model, što dalje ukazuje na fokusiranje i detaljnijoj analizi date promenljive koja značajno utiče na izlazne veličine. Podaci o međusobnoj interakciji parametara koji utiču na izlazne veličine ekstrakcionog procesa su ključni u definisanju uticaja parametara kao i objašnjenju i razumevanju dobijenih rezultata ekstrakcionog procesa. Nemogućnost utvrđivanja međusobnih interakcija procesnih parametara analizom variranja jednog od ispitivanih faktora pri konstantnim vrednostima ostalih faktora, čini RSM metodologiju pogodnijom u analizi procesnih parametara na ekstrakcione procese (Elksibi i sar, 2014). Determinisanjem jednačine modela, RSM metodologijom se može proceniti uticaj kao i međusobne interakcije većeg broja procesnih parametara upotrebom eksperimentalnih podataka i rezultata. Primeni RSM metodologije se pristupa definisanjem eksperimentalne matrice po dizajnu centralnog kompozitnog rotabilnog dizajna (CCRD), zatim se primenjuje statistička i regresiona analiza sa ciljem determinisanja jednačine modela koji predstavlja modelovanje odzivnih površina i na kraju optimizacija parametara determinisanom jednačinom modela (Wang i sar, 2012). Eksperimentalni rezultati izlaznih veličina ekstrakcionih procesa se fituju u jednačine prvog reda, polinomne drugog reda ili kubne, pri čemu se adekvatnost jednačine odgovarajućeg modela eksperimentalnim vrednostima determiniše primenom analize varijance (ANOVA) koja prikazuje i značajnost uticaja svakog pojedinačnog parametra, kao i njihove međusobne interakcije na primenjen model. Ukoliko se izlazne veličine mogu definisati linearnom funkcijom nezavisnih promenljivih, onda se funkcionalna zavisnost predstavlja jednačinom prvog reda. Jednačina prvog reda sa dve nezavisno promenljive može biti izražena jednačinom (29):

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \varepsilon \quad (29)$$

Ukoliko se funkcionalna zavisnost izlaznih veličina i nezavisnih promenljivih ogleda u krivoj u odzivnim površinama, onda se primenjuje upotreba višeg polinomnog reda. Najčešće se primenjuje polinom drugog reda koji se za dve nezavisno promenljive predstavlja jednačinom (30):

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (30)$$

Sa ciljem da se dobiju najefikasniji rezultati u aproksimaciji polinoma odgovarajući eksperimentalni dizajn se primenjuje u skupljanju podataka, i vrši se procena značaja uticaja parametara na izlaznu veličinu kroz polinomnu jednačinu modela. Rezultati validacije koji se determinišu primenom ANOVA analize, su utoliko značajni i kao prediktivni model, jer upoređuju dobijene eksperimentalne rezultate sa prediktivnim po odgovarajućem modelu, definišući njihovo odstupanje. Značaj primene centralno kompozitnog dizajna (CCD) u RSM metodologiji optimizacije procesa ekstrakcije je utoliko značajniji što specifičnim dizajnom matrice eksperimenata omogućava različite pristupe u analizi podataka.

Primena RSM/CCRD metodologije kao podobnoj u analizi parametara na procese je široko zastupljena u mnogim istraživanjima procesa, tehnologije i industriji, od tehnologije hrane (Henika, 1982; Henika, 1972; Giovanni, 1983), u konzervaciji hrane (Ölmez, 2009; Rico, 2008), fermentaciji (Dhandhukia, 2008), kao i u procesima ekstrakcije izolovanja ekstrakata bogatih biološki aktivnim komponentama (Huang, 2008; Yang i sar, 2012; Bogdanovic i sar, 2016; Ghafoor, 2010; Liu, 2009) kao i u drugim disciplinama inženjerstva.

2.8.2.1. Optimizacija primenom centralnog kompozitno rotabilnog dizajna (CCRD)

RSM metodologija obuhvata nekoliko metoda za dizajn eksperimenta i jedna od njih je centralni rotabilni kompozitni dizajn (CCRD) koji omogućava optimizaciju kroz razmatranje širokog opsega parametara kao i pojedinačni uticaj svakog od faktora (Şahin i sar, 2011). CCDR poseduje mogućnost da oceni kuluativni efekat procesnih parametara nezavisnih promenljivih na izlaznu veličinu procesa. Efikasnost CCDR metoda u optimizaciji se ogleda u značajnoj redukciji u broju ranova u eksperimentalnom dizajnu, prema punom ili parcijalno faktorijalnim metodama, što smanjuje broj potrebnih eksperimenata, a samim tim i troškove kao i vreme utrošenu za analizu (Box i Wilson, 1951). Da bi se formirao eksperimentalni dizajn, pristupa se kodiranju nezavisnih promenljivih prema jednačini (31):

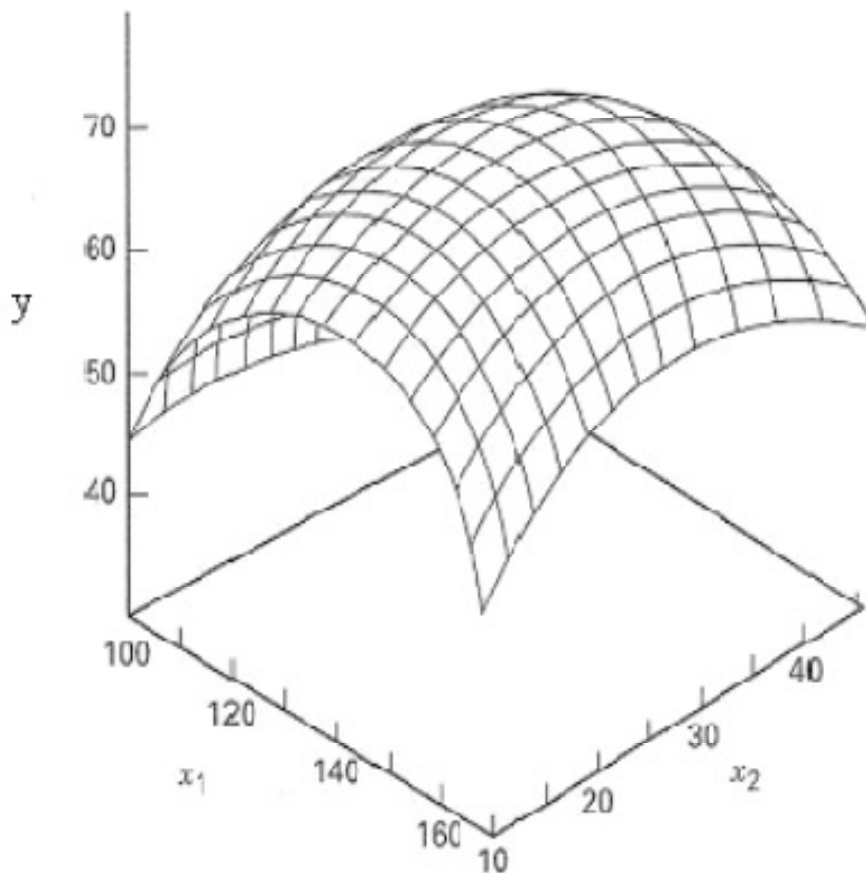
$$x_i = (X_i - \bar{X}_i) / \Delta X_i \quad (31)$$

gde je x_i kodirani nivo; X_i je prirodni nivo nezavisne promenljive; \bar{X}_i je srednja vrednost prirodnog nivoa nezavisnih promenljivih, a ΔX_i je vrednost promene koraka.

2.8.2.2. Analiza odzivnih površina

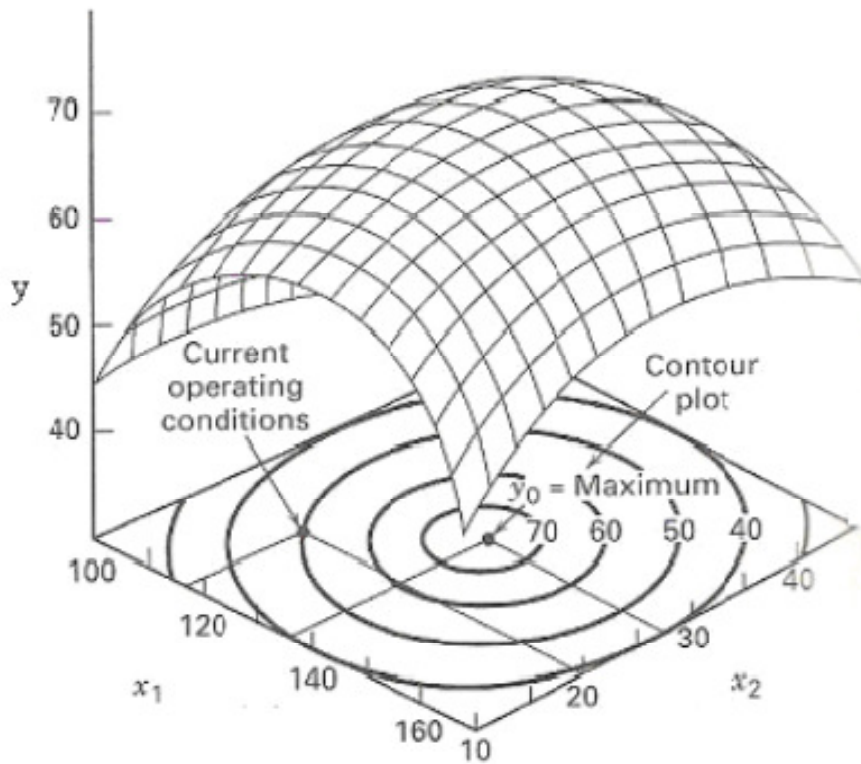
Analiza odzivnih površina se zasniva na fitovanju odzivne površine prema podacima uticaja parametara na izlaznu veličinu kroz polinomnu jednačinu modela. Razumevanje topografije formiranih površina na osnovu polinomne jednačine modela koje podrazumeva utvrđivanje maksimuma i minimum na krivoj, nagib i položaj odzivne površine, daje uvid o uticaju parametara, njihovoj međusobnoj interakciji, na izlaznu veličinu, dajući uvid u optimalne uslove. Metodu odzivnih površina čine modeli i dizajn sa ciljem da pronađu optimalne vrednosti ili definišu i opišu uslovljenost izlazne veličine (Oehlert, 2000). Primaran cilj metode odzivnih površina je utvrđivanje optimuma izlazne veličine, a ukoliko postoji više od jedne vrednosti izlazne veličine, pronalaženje kompromisa u optimizaciji izlazne veličine i parametara koji utiču na nju (Oehlert, 2000). Sekundarni cilj je razumevanje promene izlazne veličine ukoliko se menjaju promenljive dizajna eksperimentalne matrice. Grafički prikaz odzivnih površina u trodimenzionoj 3D formi omogućava vizualizaciju i bolje razumevanje uticaja nezavisnih promenljivih na izlazne veličine.

Funkcija nezavisnih promenljivih $f(x_1, x_2)$ na izlaznu veličinu y može biti grafički prikazana 3D dijagramom na slici 18 (Montgomery, 2005).



Slika 18. 3D grafički prikaz odzivnih površina RSM metodologije

Interaktivni grafički prikaz u 3D formatu predstavlja uticaj nezavisnih promenljivih na odzivnu površinu, i za svaku njihovu promenu vrednosti dobija se odgovarajuća vrednost izlazne veličine. Nekada je bolje uočiti tačnije vrednosti optimuma na konturnim linijama u dvodimenzionoj 2D formi



Slika 19. Konturni dijagram odzivnih površina RSM metodologije

Pored statističkih i matematičkih tehnika koje kroz jednačinu modela predstavljaju uticaj i značaj nezavisnih promenljivih na izlaznu veličinu, grafički prikaz odzivnih površina je takođe od značaja u određivanju optimuma i analizi uticaja parametara na njegovo determinisanje. Metoda odzivnih površina predstavlja pogodan pristup u razvijanju, poboljšanju i optimizaciji komponenata, proizvoda i procesa.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Sirovine

Za dobijanje etarskih ulja i ekstrakata sa hipolipemičnom aktivnošću korišćeni su osušeni listovi matičnjaka (*Melissae folium*) i grčko seme (*Foenugraeci semen*). Biljni materijal je osušen na vazduhu, provetravanjem na sobnoj temperaturi i skladisten u višeslojne papirne kese u suvoj prostoriji na mračnom mestu. List matičnjaka ubran je na području Srbije, na planini Rajac, dok je grčko seme je sakupljano u području Vojvodine, na severu Srbije. Biljni materijal matičnjaka i grčkog semena je identifikovan na Institutu za bilje „Josif Pančić“. Sirovine su mlevene i prosejane do čestica srednjeg prečnika $0,4 \pm 0,1$ mm neposredno pre hidrodestilacije, destilacije organskim rastvaračima i natkritične ekstrakcije.

Za natkritične ekstrakcije je korišćen komercijalni ugljenik(IV)-oksid (čistoća 99%, Messer, Beograd, Srbija).

U procesu hidrolize grčkog semena kod predtretmana biljne sirovine u cilju izolovanja diosgenina, korišćena je hlorovodonična kiselina HCl (37%), proizvođača Merck, Nemačka. Heksan (>95.0%) je za klasičnu ekstrakciju grčkog semena organskim rastvaračima nabavljen od proizvođača Sigma-Aldrich. Standardno jedinjenje diosgenina (>99,0%) proizvođača Sigma-Aldrich je korišćeno za hemijsku analizu kvalitativno-kvantitativnog sadržaja ove komponente u dobijenim ekstraktima grčkog semena.

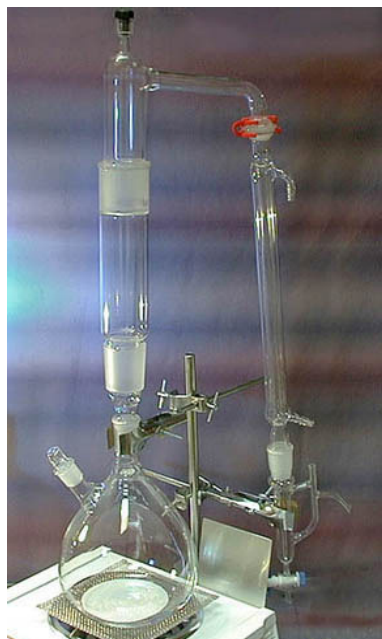
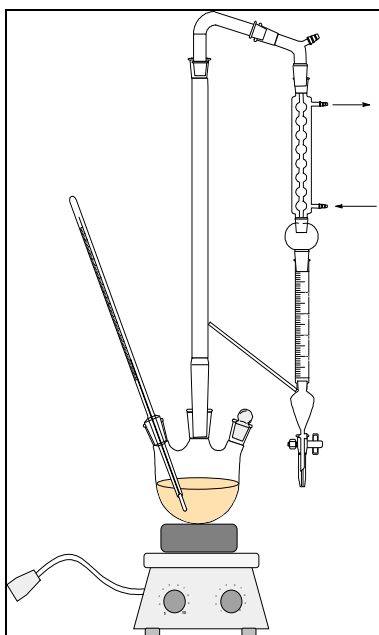
Za hemijsku analizu ekstrakata matičnjaka pomoću GC-MS korišćeni su metanol (>99,0%) (Burdick & Jackson, Mashegon, MI, SAD.), acetonitril (>99,0%) (Merck KgaA, Darmstadt, Nemačka) i Milli Q voda $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ koja je dobijena iz sistema za prečišćavanje Millipore Simplicity 185. Za hemijsku analizu ekstrakata grčkog semena pomoću HPLC korišćeni su metanol HPLC čistoće (Burdick & Jackson, Mashegon, MI, SAD.), HPLC acetonitril (Merck, Darmstadt, Nemačka) i hloroform (>99,0%) (Merck, Darmstadt, Nemačka).

Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti matičnjaka korišćeni su 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH), proizvođača Sigma Chemical Co. (St. Louis, SAD).

3.2. Metode ekstrakcije

3.2.1. Hidrodestilacija matičnjaka po Klevendžeru

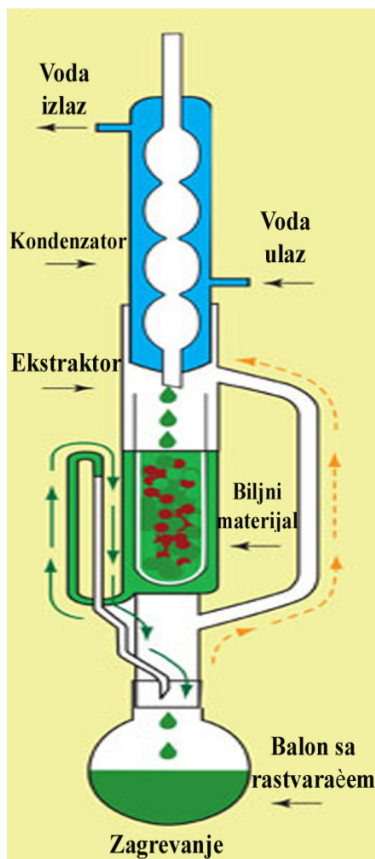
Hidrodestilacija listova matičnjaka izvedena je na aparaturi po Klevendžeru sa balonom zapremine od 1,0 dm³ (slika. 20), za dobijanje etarskog ulja. Za eksperimente hidrodestilacije je korišćeno 50-60 g osušenog i usitnjenog biljnog materijala i 600 ml destilovane vode. Na balon, koji se zagreva pomoću električne obloge, postavljen je kondenzator sa stalnim protokom tekuće vode. Proces destilacije trajao je između 4-6 h, tokom koje je etarsko ulje sakupljano u gornjem, graduisanom delu cevi za merenje zapremine predestilisanog ulja. Nakon očitavanja zapremine, izdvojeno etarsko ulje je ispuštano u odmereni stakleni sud. U stakleni sud se dodaje anhidrovani Na₂SO₄ kako bi se uklonio zaostatak vlage koju ulje može povući tokom ispuštanja. Uzorak je držan u frižideru na 4°C nekoliko dana pre nego što je analiziran. Nakon sušenja, uzorak se analizira radi određivanja hemijskog sastava i antioksidativne aktivnosti.



Slika 20. Aparatura za hidrodestilaciju po Klevendžeru

3.2.2. Ekstrakcija grčkog semena po Soksletu

Ekstrakcija grčkog semena organskim rastvaračima izvedena je na aparaturi po Soksletu sa n-heksanom (Slika 21.).



Slika 21. Aparatura po Soksletu

Temperatura na kojoj je izvedena ekstrakcija je jednaka temperaturi ključanja rastvarača, 68 °C za n-heksan (>95.0%) koji je nabavljen od proizvođača Sigma-Aldrich. Za dobijanje ekstrakata pomoću ekstrakcije po Soksletu korišćeno je 40 g prethodno odmašćenog i hidrolizovanog grčkog semena. Biljni materijal je stavljan u filter vrećice za čaj, koje se postavljaju u ekstrakcionu komoru Soksletovog ekstraktora. Soksletov ekstraktor se postavlja na balon u koji je prethodno dodato 600 ml heksana. Na vrhu ekstrakcione komore nalazi se kondenzator. Rastvarač je zagrevan preko električne obloge do temperature ključanja. Pare rastvarača se penju uz destilacionu granu i ulaze u komoru za ekstrakciju. Kondenzator omogućava da se para rastvarača hladi i kapljice vraćaju u ekstrakcionu komoru, natapajući

čvrsti materijal. Ekstrakciona komora, u kojoj se nalazi prethodno tretirano grčko seme napakovano u filter kesicama za čaj, natapa se toplim rastvaračem koji rastvara željene komponente. Istog trenutka kada se komora napuni, ona počinje da se prazni preko padine (grane povezane sa destilacionom komorom), pri čemu se rastvarač vraća u destilacioni balon. Ovaj ciklus se ponavlja do obezbojavanja rastvora koje se dešava nakon iscrpljenja biljne sirovine, što je u slučaju grčkog semena trajalo 3-4h. Tokom svakog ciklusa, deo komponenti se rastvara u rastvaraču. Nakon više ciklusa željeno jedinjenje se koncentriše u destilacionom balonu. Nakon ekstrakcije, rastvarač je potrebno odvojiti od ekstrakta uparavanjem pomoću rotacionog vakuum uparivača (Slika 22). U cilju određivanja prinosa Sokslet ekstrakcije iz osušenih listova grčkog semena dobijen rastvor se uparava pomoću rotacionog vakuum uparivača (slika 22), zatim se meri zaostala masa ekstrakta nakon uparavanja i računa prinos ekstrakta pomoću jednačine (32):

$$Y(\%, w / w) = \frac{m_e}{m_{bm}} \cdot 100 \quad (32)$$

gde je m_e -masa nakupljenog ekstrakta, m_{bm} -masa biljne sirovine pre ekstrakcije.

Upareni ekstrakt se zatim sakuplja u vajalicu, stavlja u frižider do analize na GC/MS ili HPLC hromatografiji.



Slika 22. Rotacioni vakuum uparivač

3.2.3. Ekstrakcija ugušćenim ugljenik(IV) - oksidom

3.2.3.1. Opis postrojenja

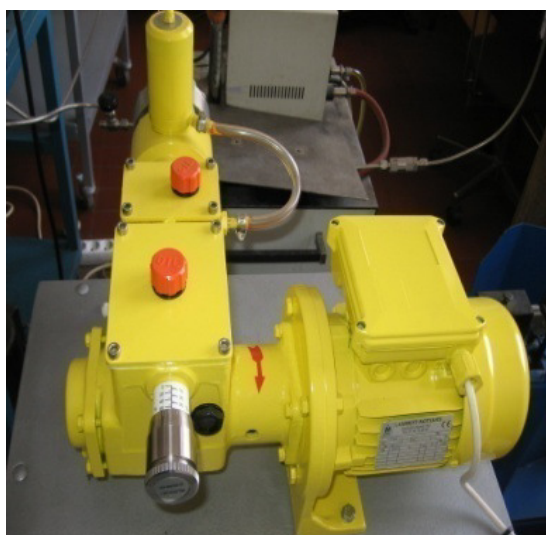
Ekstrakcije sa natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom su izvedene na laboratorijskom postrojenju za NKE (Autoclave Engineers SCE Screening System) (Slika 23).



(a)



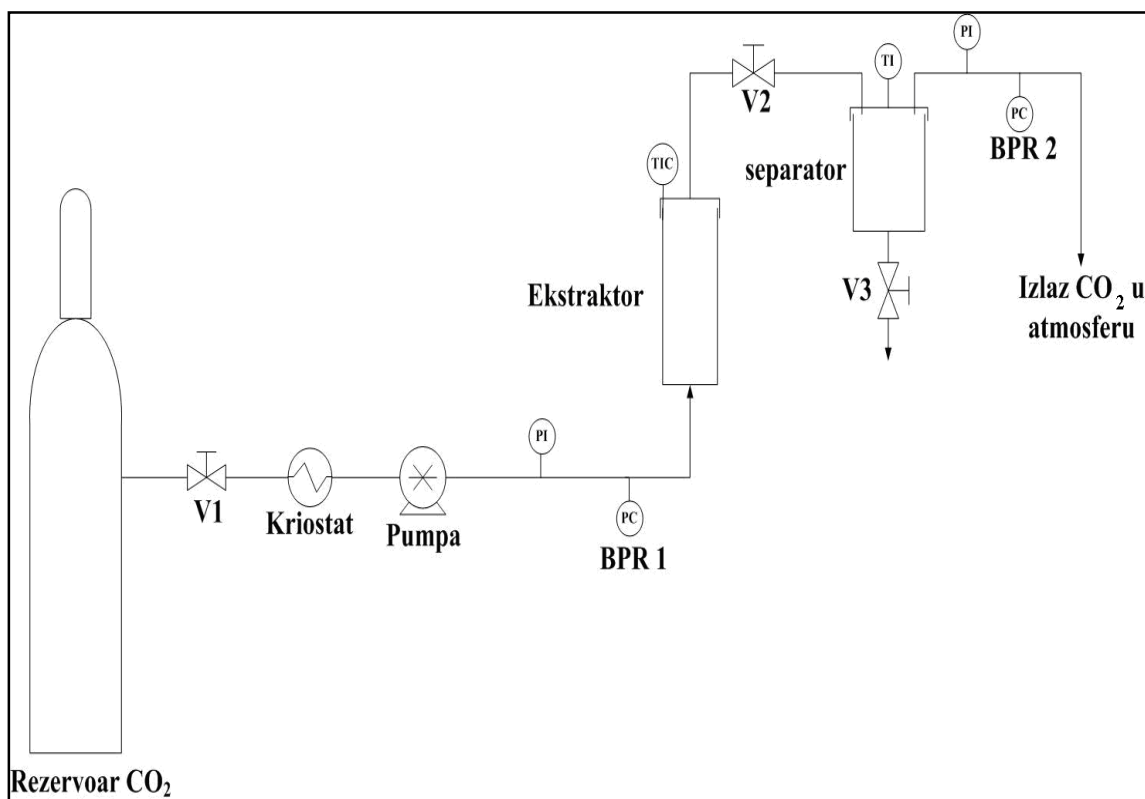
(b)



(c)

Slika 23. Laboratorijsko postrojenje za NKE (Autoclave Engineers Screening System) (a); ekstraktor (b) i pumpa za tečnosti pod visokim pritiskom (c)

Ovaj sistem predviđen je za laboratorijska ispitivanja sa šaržama biljnog materijala, uz korišćenje ugljenik(IV)-oksida kao natkritičnog medijuma i najveći dozvoljeni radni pritisak od 41,3 MPa na 238 °C. Tečni ugljenik (IV)-oksid pritiče iz boce sa sifonom, a na putu između izlaza iz boce i pumpe visokog pritiska se hladi u kriostatu, kako bi se sprečilo njegovo isparavanje. Pumpom za tečnosti visokog pritiska (Milton Roy, Francuska) ostvaruje se maksimalni izlazni pritisak od 42 MPa pri protoku od 0,1-0,7 kg/h. Glava pumpe se dodatno hladi, radi obezbeđenja ravnog rada i konstantnog protoka tečne faze. Dva povratna regulatora pritiska (BPR1 i BPR2) se koriste u cilju regulacije pritiska u ekstraktoru i separatoru. Radna zapremina ekstraktora iznosi 150 cm³. Ekstraktor je izrađen od nerđajućeg čelika 316SS i opremljen je sa dva grejača radi održavanja neophodne temperature. NK CO₂ napušta ekstraktor i ulazi u separator, gde se promenom pritiska vrši odvajanje rastvarača od rastvorka. Zapremina separatora iznosi 500 cm³. Uzorci ekstrakta mogu se uzeti otvaranjem ventila na dnu separatora. Za indicaciju protoka ugljenik(IV)-oksida kroz sistem predviđen je merač protoka. Protok se može podešavati igličastim ventilom. Ugljenik(IV)-oksid koji napušta separator, nakon prolaska kroz merač protoka, odlazi u atmosferu. Šema ovog postrojenja prikazana je na slici 24.



Slika 24. Šema laboratorijskog postrojenje za NKE (Autoclave Engineers Screening System)

3.3. Dobijanje ekstrakata matičnjaka bogatih jedinjenjima sa hipolipemičnim dejstvom

3.3.1. Frakciona ekstrakcija matičnjaka

U cilju izolovanja antioksidativnih frakcija primenjen je postupak frakcione ekstrakcije sa natkritičnim i subkritičnim ugljenik(IV)-oksidom. Šematski prikaz frakcione ekstrakcije sa natkritičnim i subkritičnim CO₂ dat je na slici 25. Prvo je izolovana frakcija etarskog ulja iz biljnog materijala na pritisku od 10 MPa i temperaturi od 40°C, koja se sastojala od lako isparljivih, aromatičnih komponenata, pretežno monoterpena i seskviterpena i njihovih oksidacionih proizvoda sa smolama. Zatim su na pritisku od 30 MPa i na temperaturama od 40° i 100°C izdvojene teže antioksidativne frakcije iz matičnjaka. Dati parametri ekstrakcije (100°C i 30 MPa) izabrani su na osnovu rezultata ranijih istraživanja (Nguyen i sar, 1991) koji pokazuju da je temperaturni opseg 90-110°C najpogodniji za izolovanje antioksidativnih frakcija iz biljnih vrsta familije Lamiaceae. Pored ekstrakcije na pritisku od 30 MPa i na temperaturi od 100°C, izvršena je i ekstrakcija frakcije na 30 MPa i 40°C, zato što se po literaturnim podacima na ovim uslovima izdvajaju najveće količine usninske i rozmaricinske kiseline i ostalih flavonoida, kao značajnih komponenti antioksidativnog dejstva (Kutta i sar, 2009).

Uslovi frakcione SKE i NKE matičnjaka u cilju izolovanja ekstrakata sa antioksidativnim dejstvom dati su u tabeli 2.

Tabela 2. Eksperimentalni uslovi frakcione SKE i NKE ugljenik(IV)- oksidom

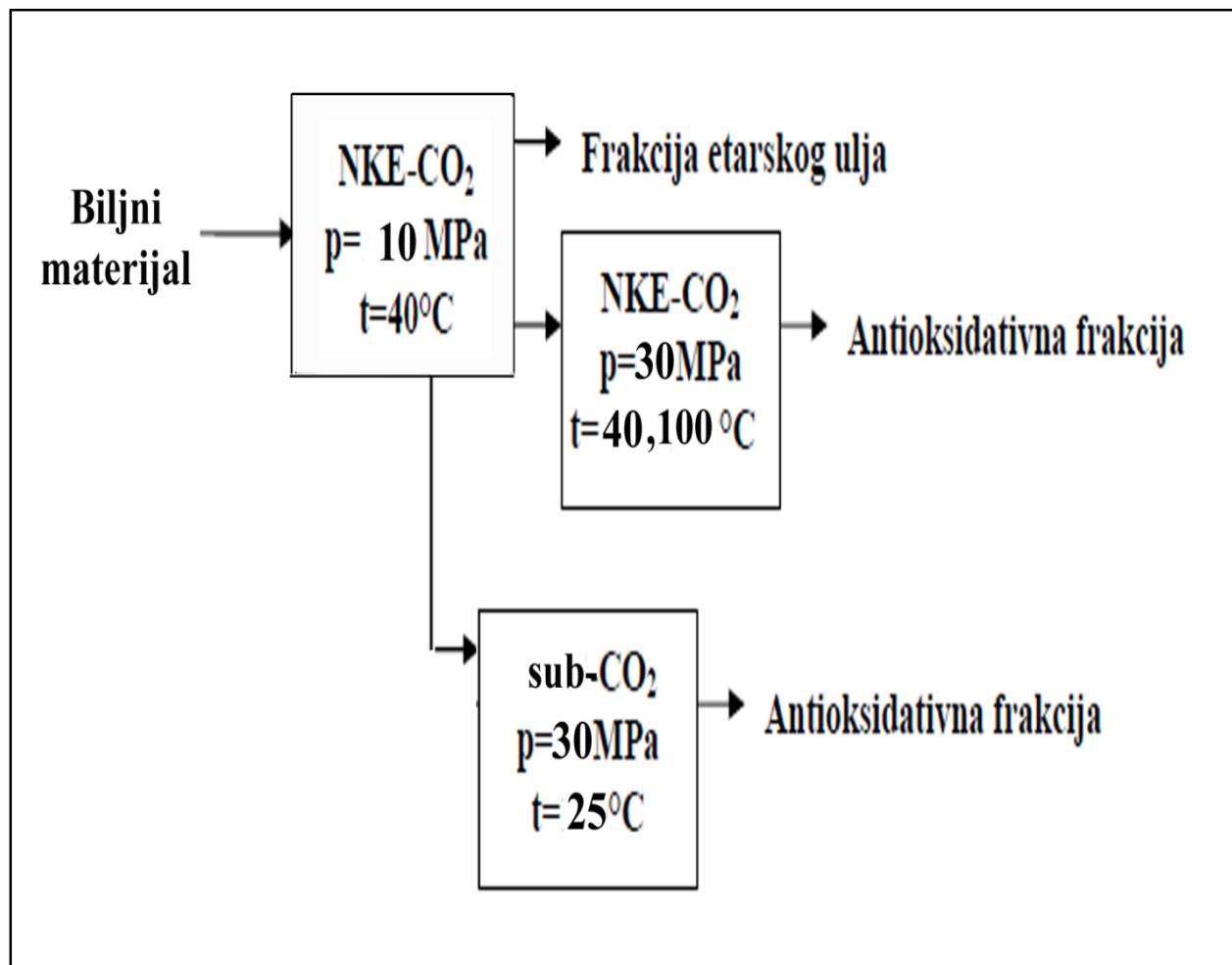
Frakcija	Pritisak/ temperatura	Masa uzorka, g	Protok CO ₂ , kg/h	Gustina CO ₂ , kg/m ³	Vreme trajanja ekstrakcije, min
I	10 MPa / 313 °K	53	0,62	629,3	87
II/1	30 MPa / 298 °K	53	0,29	966,8	191
II/2	30 MPa / 313 °K	54	0,23	910,6	198
II/3	30 MPa / 373 °K	54	0,24	662,4	248

U toku NKE merena je masa izdvojenog ekstrakta i računat maseni prinos ekstrakta (33) u odnosu na specifičnu količinu utrošenog NK CO₂ (kg_{CO2}/kg_{bm}).

$$Y(\%, w/w) = \frac{m_e}{m_{bm}} \cdot 100 \quad (33)$$

gde je m_e -masa nakupljenog ekstrakta, m_{bm} -masa biljne sirovine pre ekstrakcije.

Biljni materijal je mleven i prosejan sitima 0,2 i 0,6 mm gde je za dalje istraživanje uzeta frakcija čestica srednjeg prečnika $d_p=0,4$ mm. Protok NK CO₂ bio je 0,6 kg/h pri ekstrakciji etarskog ulja i 0,3 kg/h pri ekstrakciji antioksidativne frakcije. Početna masa biljnog materijala bila je 50 g. Usitnjeni i prosejani biljni materijal je izlagan NK CO₂ sve dok ekstrakcione krive koje pokazuju zavisnost prinosa ekstrakta od specifične potrošnje NK CO₂ ne zaustave rast na grafikonu što se meri izjednačavanjem u merenju tri uzastopne tačke.



Slika 25. Šematski prikaz fracione ekstrakcije matiĉnjaka subkritiĉnim i natkritiĉnim CO₂

3.3.2. Subkritiĉna ekstrakcija (SKE) matiĉnjaka

SKE su izvodi na uslovima niĉim od kritiĉnih vrednosti pritiska i temperature za ugljenik (IV)-oksid. SKE matiĉnjaka izvedena je na uslovima od 25 °C i 30 MPa u fracionoj ekstrakciji, nakon NKE na 40 °C i 10 MPa u cilju dobijanja antioksidativnih ekstrakata.

Hemijska analiza i antioksidativna aktivnost odreĉivana je za sve izolovane frakcije, radi uporeĉivanja njihovog antioksidativnog kapaciteta.

3.3.3. Matematičko modelovanje procesa ekstrakcije matičnjaka

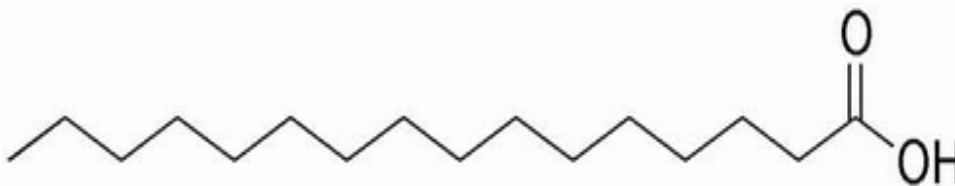
Matlab je program za numeričke proračune i programski paket proizvođača MathWorks. Matlab omogućava lako manipulisanje matricama, prikazivanje funkcija i fitovanje, implementaciju algoritama, stvaranje algoritama, stvaranje grafičkog korisničkog interfejsa kao i povezivanje sa programima pisanim u drugim jezicima. Koristeći Matlab programski paket, mogu se rešiti tehnički problemi brže nego sa tradicionalnim programskim jezicima, kao što su Fortran, C i C++ jer su kreiranje promenljivih, određivanje vrste podataka i slične operacije nepotrebne i komplikovanije.

Matlab je korišćen za simulaciju procesa ekstrakcije natkritičnim ugljen(IV)-oksidom zbog očiglednih prednosti. U cilju simulacije ekstrakcionih kriva pomoću modela Sovove (Sovova i sar, 1994) korišćen je Matlab kod priložen kao PRILOG A. Treba napomenuti da nije upotrebljena rigorozna optimizacija parametara već posebna analiza parametara pomoću najmanje standardne devijacije izračunatih ekstrakcionih prinosa od eksperimentalnih podataka.

3.3.3.1. Određivanje parametara modela

Biljni materijal je mleven i prosejan sitima 0,2 i 0,6 mm gde je za izvođenje daljeg eksperimenta uzeta frakcija čestica srednjeg prečnika $d_p=0,4$ mm. Poroznost sloja, dobijena metodom nalivanja tečnosti, iznosila je $\varepsilon = 0,58$, a nasipna gustina $\rho_s = 901,15$ kg /m³. Uzorci su ekstrahovani u dve frakcije: prva lakša sačinjena uglavnom od etarskih ulja, a druga teža sačinjena od sekundarnih metabolita antioksidativnih svojstava. Kao natkritični rastvarač upotrebljen je komercijalni ugljenik(IV)- oksid 99% čistoće (Messer Tehnogas).

Kao ekstrahovana supstanca za obe frakcije odnosno pseudokomponenta uzeta je palmitinska kiselina. Palmitinska kiselina, ili heksadekanska kiselina u IUPAC nomenklaturi, je jedna od najrasprostanjenijih zasićenih masnih kiselina prisutnih u životinjskom i biljnom svetu. Njena molekulska formula je CH₃(CH₂)₁₄COOH, a strukturna formula prikazana je na slici 26.



Slika 26. Palmitinska kiselina

Pre nego što se pristupi korišćenju modela, neke parametre je potrebno izračunati iz pouzdanih korelacija. Za izračunavanje koeficijenta prenosa mase k_f u filmu oko čestice korišćena je Tan-ova korelacija:

$$Sh = 0.38Re^{0.83}Sc^{1/3} \quad (34)$$

pri čemu je:

$$k_f = \frac{ShD_{12}}{d_p}$$

gde je:

$$Re = \frac{\rho d_p u}{\mu} - \text{Reynolds-ov broj,}$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho D_{12}} - \text{Schmidt-ov broj,}$$

ρ - gustina natkritičnog ugljenik(IV)- oksida (kg/m^3),

μ - koeficijent vizkoznosti natkritičnog ugljenik(IV)- oksida (Pas),

u - brzina strujanja ugljenik(IV)- oksida kroz sloj biljnog materijala (m/s),

d_p - prečnik čestice (m),

D_{12} - binarna difuzivnost za sistem ulje/ CO_2 (m^2/s).

Dinamička vizkoznost natkritičnog ugljenik(IV)- oksida izračunata je Jossi-evom empirijskom korelacijom:

$$[(\mu - \mu^*)\xi + 10^{-4}]^{\frac{1}{4}} = 0.10230 + 0.023364\rho + 0.058533\rho^2 - 0.040758\rho^3 + 0.0093324\rho^4 \quad (35)$$

Gde je:

$$\mu^* \xi^* = 34.0 \times 10^{-5} T_r^{0.94} \quad T_r \leq 1.50 \quad (36)$$

$$\mu^* \xi^* = 17.78 \times 10^{-5} (4.58 T_r - 1.67)^{5/8} \quad T_r > 1.50$$

μ^* - vizkoznost natkritičnog ugljenik(IV)- oksida na pritiscima 0.1 – 5 bar

$\xi^* = 0.0224$ za ugljenik(IV)-oksid.

Binarna difuzivnost za sistem pseudokomponenta/CO₂ izračunata je iz sledeće jednačine

$$D_{12} = 5.152 D_c T_r \left(\rho_r^{-\frac{2}{3}} - 0.4510 \right) R/X \quad 1 < \rho_r < 2.5 \quad (37)$$

$$\text{gde je: } X = \left(1 + \left(\frac{V_{c2}}{V_{c1}} \right)^{\frac{1}{3}} \right)^2 / \left(1 + \frac{M_1}{M_2} \right)^{1/2} \quad (38)$$

$$R = 1.0 \pm 0.1, \quad X < 2 \quad (39)$$

$$R = X^{0.17} \pm 0.1, \quad 2 < X < 10 \quad (40)$$

D_c - kritična difuzivnost ugljenik(IV)- oksida (m²/s) ; 4.937*10⁻⁸ m²/s

T_r - redukovana temperatura

ρ_r - redukovana gustina ugljenik(IV)- oksida

V_{c1}, V_{c2} - kritične molarne zapremine ugljendioksida i pseudokomponente respektivno (m³ / kmol)

M_1, M_2 - molarne mase ugljendioksida i pseudokomponente respektivno (kg / kmol).

Korišćena je standardna devijacija za određivanje optimalnih parametara. Data je jednačinom:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m [e_j - e_{mod,j}]^2}{m}} \quad (41)$$

Gde je: m - broj eksperimentalnih tačaka,

e_j - prinos u eksperimentalnoj tački j,

$e_{mod,j}$ - prinos u tački j, prema modelu.

3.3.4. Obrazovanje i detekcija DPPH radikala u cilju određivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata matičnjaka

Za određivanje antioksidacionog potencijala analiziranih ekstrakata matičnjaka primenjen je DPPH (1,1-difenil-2-5-pikril-hidrazil) test, pri čemu je . metoda koju su razvili Brand-Williams i sar, 1995 je primenjena sa manjim modifikacijama. Rastvori su pripremljeni rastvaranjem po 10 mg dobijenih ekstrakata matičnjaka u 1 ml rastvarača (hloroform:metanol = 7:3). 200 μ l ovog rastvora ekstrakta dodaje se u 1800 μ l sveže pripremljenog hloroform-metanolnog rastvora DPPH koncentracije 0,04 mg/ml.

Uzorak i slepa proba (uzorak bez ekstrakta) su ostavljeni na tamnom mestu i sobnoj temperaturi 20 min. Absorbanca je merena UV/VIS spektrofotometrom HP 8453 na 517 nm, sa hloroform:metanol smešom kao referentnim rastvorom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost tri uzastopna merenja.

Kapacitet neutralizacije slobodnih radikala (RSC %) je izračunavan korišćenjem jednačine (42):

$$\% \text{ RSC} = [(A_{sp} - A_s) / A_{sp}] \times 100 \quad (42)$$

gde je RSC-kapacitet neutralizacije slobodnih radikala,

A_{sp} - absorbanca DPPH radikala slepe probe i

A_s - absorbanca uzorka DPPH radikala sa ekstraktom.

3.4. Dobijanje ekstrakata grčkog semena bogatih jedinjenjima sa hipolipemijskim dejstvom

3.4.1. Dobijanje ekstrakata bogatih diosgeninom NKE grčkog semena

Natkritična ekstrakcija grčkog semena je primenjena sa ciljem dobijanja frakcije ekstrakta bogate diosgeninom. U cilju izolacije diosgenina iz grčkog semena, primenjen je predtretman biljnog materijala. Primenjeni predtretman grčkog semena se sastojao od hidrolize sterodinih saponina, pri čemu je dobijen aglikon diosgenin. Hidrolizi je prethodilo odmašćivanje semena, sa ciljem da obezbedi čistiji ekstrakt, kako bi se uklonili lipidi i omogućilo dobijanje ekstrakata sa većim sadržajem diosgenina..

3.4.1.1. Predtretman grčkog semena u cilju izolovanja diosgenina

Odmašćivanje

Oko 200 g samlevenog grčkog semena tretirano je sa 625 ml n-heksana u Sokslet aparaturi (Soxhlet apparatus). Ekstrakcija masnih i lipidnih komponenata iz grčkog semena je trajala 4h. Heksanski ekstrakti su uparavani do suva, kako bi se izračunao prinos odmašćenog ulja iz semena.

Hidroliza

Odmašćeno seme je sušeno na vazduhu provetranjem, nakon čega je hidrolizovano sa 2M HCl na 100°C, u sudu sa magnetnom mešalicom. Odnos biljnog materijala i kiseline bio je 1:4. Hidroliza biljnog materijala je trajala 3 h, nakon čega se hidrolizovana smeša hladi i filtrira na Bihnerovoj aparaturi. Dodavanjem 5%-tnog Na₂CO₃ i destilovane vode u filtriranu masu, vrši se konstantno pranje i filtriranje nataloženog materijala sve dok filter papir ne pokaže neutralnu pH vrednost. Neutralizovani i filtrirani materijal se zatim suši u sušnici pod vakuumom na 80°C, do konstantnog sadržaja vlage <5 %.

Postupak utvrđivanja vlage sušenjem pod vakuumom

U prethodno osušenom, ohlađenom i izmerenom vegeglasu stavi se oko 3.0000 g uzorka, poklopi i meri sa tačnošću ± 1 mg. Zatim se vegeglas sa uzorkom stavlja u sušnicu i nakon 90 min posuda se iz sušnice hladi u eksikatoru. Nakon 30-60 min hlađenja u eksikatoru posuda se meri . Postupak se ponavlja sve dok sadržaj vlage ne bude manji od 5 %.

Utvrđivanje procenta vlage odmašćenog, hidrolizovanog, neutralizovanog i osušenog biljnog materijala se vrši po jednačini (43):

$$\% \text{ vode} = \frac{a \times 100}{p} \quad (43)$$

gde je, a-razlika u masi posude sa uzorkom pre i posle sušenja , a p-odmerena količina uzorka u gramima.

3.4.1.2. Sokslet ekstrakcija grčkog semena

Odmašćeno i hidrolizovano grčko seme ekstrahovano je n-heksanom 4 h na Sokslet aparaturi. Efikasnost definisanih uslova NKE manifestovane prinosom diosgenina upoređivana je sa prinosom ostvarenim ekstrakcijom n-heksanom, pri čemu se prinos Sokslet ekstrakcije uzimao kao referentni čineći 100 %.

3.4.1.3. NKE dobijanja ekstrakata bogatih diosgeninom iz grčkog semena

Natkritična ekstrakcija izolovanja diosgenina iz grčkog semena izvedena je na laboratorijskom postrojenju (Autoclave Engineers Screening System) prethodno opisanim i prikazanim na slici 21.

U sistem za ekstrakciju je tokom svakog eksperimenta korišćeno 40 g odmašćenog i hidrolizovanog grčkog semena, prethodno osušenog na sadržaj vlage manji od 5 %. Natkritična ekstrakcija pripremljenog hidroizolata je vršena na različitim uslovima pritiska, temperature i utrošenog CO₂ tokom vremena ekstrakcije. Dobijeni ekstrakti su prikupljeni u bočicu, pri čemu je izračunat totalni prinos ekstrakcije. Ekstrakti su držani u frižideru na -5°C do kvalitativne i kvantitativne analize diosgenina u dobijenim ekstraktima na tečnoj hromatografiji visokih performansi (HPLC).

3.4.1.4. Izbor procesnih parametara NKE diosgenina iz grčkog semena

Natkritična ekstrakcija sa predtretmanom grčkog semena primenjena je sa ciljem da se dobiju frakcije sa većim sadržajem diosgenina, kao i da se nađu i definišu optimalni uslovi za njegovo izolovanje iz grčkog semena. Preliminarna studija nekoliko eksperimenata je utvrdila uticaj različitih gustina NK CO₂ na prinos dobijenog ekstrakta iz grčkog semena. Na osnovu preliminarnih studija, formirani su opsezi za testiranje pritiska, temperature i utrošenog NK CO₂ sa ciljem da se optimizuju radni uslovi NKE za izolaciju diosgenina. U tu svrhu primenjena je metodologija odzivnih površina (RSM) i centralno kompozitni dizajn (Ghoreishi i sar, 2012; Kaufmann i sar, 2007; Xiao i sar, 2007; Yang i sar, 2012). Preliminarni testovi su pokazali da u opsegu gustina NK CO₂ od 800-920 kg/m³, na određenim pritiscima, temperaturama i utrošenom CO₂, mogu biti definisani optimalni uslovi.

3.4.1.5. RSM/CCRD optimizacija dobijanja ekstrakata bogatih diosgeninom iz grčkog semena

Prema podacima dobijenim u preliminarnim testovima, izabran je opseg procesnih parametara NKE za RSM/CCRD analizu izolovanja diosgenina iz grčkog semena: pritisak od

16,6 do 33,4 MPa, temperatura od 30 to 50°C i utrošak NK CO₂ od 11,6 do 28,4 g_{CO2}/g_{bm.}. Istraživani procesni parametri pritiska, temperature i utrošenog NK CO₂ su bili definisani kao (X₁, MPa), (X₂, °C) i (X₃, mCO₂/m_{bm}), respektivno. CCRD dizajn je primenjen na tri promenljive, kao tri faktora od uticaja na prinos diosgenina iz grčkog semena. Dizajn se sastoji iz tri glavna dela. Prvi deo, faktorski, sastoji se iz dva nivoa vrednosti svakog od faktora i kodiraju se kao -1 i +1. Drugi, aksijalni, koji ima za cilj da poboljša preciznost modela sastoji se iz tačaka podjednako raspoređenih po obimu kruga čiji je radijus α . Kako se faktorske i aksijalne tačke ne ponavljaju, da bi se obezbedio određeni broj stepeni slobode za procenu eksperimentalne greške i utvrđivanje preciznosti odzivne veličine, kao treću komponentu potrebno je dodati određeni broj centralnih tačaka.

Plan primenjen u ovom radu sastoji se iz 20 eksperimentalnih tačaka od kojih je 8 faktorskih, 6 aksijalnih i 6 centralnih. Ispitan je uticaj pritiska, temperature i utrošenog NK CO₂ (vremena ekstrakcije). Dobijeni rezultati modelovani su jednačinom drugog reda za predikciju prinosa diosgenina u funkciji nezavisnih promenljivih pritiska (X₁), temperature (X₂) i utrošenog NK CO₂ (X₃) tokom ekstrakcije (44):

$$Y = \sum \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_j x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{jj} x_j^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (44)$$

gde je Y odzivna površina, β_0 , β_i , β_{ii} i β_{ij} odsečak, linearni, kvadratni i interaktivni koeficijent regresije, a x_i i x_j nezavisne promenljive.

Vrednost koeficijenata i njihov statistički značaj određeni su metodom najmanjih kvadrata pomoću programa Matlab (verzija 6.5) i razmatrani su samo članovi sa značajnim uticajem ($p \leq 0,05$). Za utvrđivanje adekvatnosti modela korišćen je Fišerov test, a za određivanje signifikantnosti koeficijenata Studentov. Stvarne i kodirane vrednosti faktora ispitivanih u NKE diosgenina iz grčkog semena dati su tabeli 4.

Tabela 4. Kodirane i stvarne vrednosti faktora u eksperimentalnom dizajnu optimizacije NKE diosgenina iz grčkog semena

Kodirane vrednosti	Pritisak (MPa, X_1)	Temperatura ($^{\circ}$ C, X_2)	Količina utrošenog NK CO ₂ (X_3) gCO ₂ /g
-1,682	16,6	30	11,6
-1	20	34	15
0	25	40	20
+1	30	46	25
+1,682	33,4	50	28,4

Na osnovu ovih kodiranih vrednosti datih u tabeli 4. formira se eksperimentalni dizajn od 20 eksperimenata koji je dat u tabeli 5.

Tabela 5. Eksperimentalni dizajn RSM/CCRD analize izolovanja diosgenina iz grčkog semena

Run	X_1 [MPa]	X_2 [$^{\circ}$ C]	X_3 [gCO ₂ /g _{bm}]
1	30	46	25
2	30	46	15
3	30	34	25
4	30	34	15
5	20	46	25
6	20	46	15
7	20	34	25
8	20	34	15

DOBIJANJE, KARAKTERIZACIJA I OPTIMIZACIJA HIPOLIPEMIJSKIH EKSTRAKATA MATIČNJAKA (*Melissa officinalis*) I GRČKOG SEMENA (*Trigonella foenum-graecum*) NATKRITIČNIM UGLJENIK (IV)-OKSIDOM

9	33,4	40	20
10	16,6	40	20
11	25	50	20
12	25	30	20
13	25	40	28,41
14	25	40	11,59
15	25	40	20
16	25	40	20
17	25	40	20
18	25	40	20
19	25	40	20
20	25	40	20

Na osnovu primenjene matrice eksperimenata na NKE grčkog semena, razmatran je uticaj pritiska, temperature i utrošenog CO₂ (kao vremena ekstrakcije) u vidu nezavisnih promenljivih, kao i njihove interakcije na prinos diosgenina kao izlazne veličine.

3.4.2. Dobijanje ekstrakata bogatih sterolima, vitaminom E i vitaminom D iz grčkog semena natkritičnom ekstrakcijom

Natkritična ekstrakcija izolovanja sterola, vitamina E i vitamina D iz grčkog semena izvedena je na laboratorijskom postrojenju (Autoclave Engineers Screening System) prethodno opisanim i prikazanim na slici 21.

U sistem za ekstrakciju je tokom svakog eksperimenta korišćeno 40 g samlevenog i prosejanog grčkog semena grčkog semena na veličinu čestica od 0,4 mm, neposredno pre ekstrakcije. Natkritična ekstrakcija grčkog semena je vršena na različitim uslovima pritiska, temperature i utrošenog NK CO₂ tokom vremena ekstrakcije. Dobijeni ekstrakti su prikupljeni u vajalicu, pri čemu je izračunat totalni prinos ekstrakcije. Ekstrakti su čuvani u frižideru na -5°C do analize sterola, vitamina E i vitamina D u dobijenim ekstraktima na tečnoj hromatografiji visokih performansi (HPLC).

3.4.2.1. Izbor procesnih parametara natkritične ekstrakcije grčkog semena u cilju dobijanja ekstrakata bogatih sterolima, vitaminom E i vitaminom D

Natkritična ekstrakcija grčkog semena primenjena je, u ovom slučaju za izolovanje ekstrakata bogatih sterolima, vitaminom E i vitaminom D. Prinos dobijenih ekstrakata i njegovih komponenata je određivan na različitim procesnim uslovima pritiska (16,6 do 33,4 MPa), temperature (30-50°C) i količini utrošenog CO₂ za vreme ekstrakcije po masi suvog grčkog semena (11,6-28,4 gCO₂/g_{bm}), kao i kod prethodne NKE grčkog semena u slučaju izolovanja diosgenina. Na osnovu hemijskog sastava dobijenih ekstrakata pri različitim uslovima procesnih parametara NKE, definisani su optimalni uslovi kako bi prinos sterola, vitamina E i vitamina D bio u što većem procentu.

3.4.2.2. RSM/CCRD optimizacija dobijanja ekstrakata bogatih sterolima, vitaminom E i vitaminom D iz grčkog semena

RSM i CCRD su primenjeni u analizi uticaja pritiska, temperature i vremena ekstrakcije (kroz utrošak NK CO₂), kao i njihova međusobna interakcija na prinos dobijenog ekstrakta i njegovog sadržaja sterola, vitamina E i vitamina D. Eksperimentalni dizajn se sastojao od 20 eksperimenata sa 8 faktorijelnih, 6 aksijalnih i 6 centralnih tačaka eksperimenata, kao i kod prethodnog izolovanja diosgenina iz grčkog semena. Tri nezavisne promenljive koje su uticale na prinos ekstrakta i sadržaj totalnih sterola, vitamina E i vitamina D su i pritisak, temperatura i vreme ekstrakcije.

Jednačina drugog reda primenjena je kako bi se razmotrio uticaj nezavisnih promenljivih pritiska (X₁), temperature (X₂) i količine utrošenog NK CO₂ (X₃) na prinos ekstrakcije (Y₁) kao i sadržaj totalnih sterola (Y₂), vitamina E (Y₃) i vitamina D (Y₄) kao što je prikazano u jednačini (45):

$$Y_i = \beta_{0,i} + \beta_{1,i}X_1 + \beta_{2,i}X_2 + \beta_{3,i}X_3 - \beta_{11,i}X_1^2 + \beta_{22,i}X_2^2 - \beta_{33,i}X_3^2 + \beta_{12,i}X_1X_2 + \beta_{13,i}X_1X_3 + \beta_{23,i}X_2X_3 \quad (45)$$

gde je i=1, 2, 3, i 4, a

Y odzivna površina,

β_0 , β_i , β_{ii} i β_{ij} odsečak, linearni, kvadratni i interaktivni koeficijent regresije, a

x_i i x_j nezavisne promenljive.

Stvarne i kodirane vrednosti faktora ispitivanih u NKE totalnih sterola, vitamina E i vitamina D iz grčkog semena dati su u prethodno definisanoj tabeli 4. kod NKE izolovanja diosgenina iz grčkog semena. Eksperimentalni dizajn je formiran po istom principu kao i kod izolovanja diosgenina, prikazan u prethodnom izolovanju diosgenina iz grčkog semena u tabeli 5.

3.4.2.3. Određivanje molarne rastvorljivosti ekstrakta, sterola, vitamina E i vitamina D

Izračunavanje i determinisanje molarne rastvorljivosti totalnog ekstrakta, totalnih sterola, vitamina E i vitamina D u NK CO₂ primenjeno je na različitim uslovima temperature i pritiska, odnosno gustine NK CO₂ (Chrastll, 1982; Fornari i sar, 2011; Keshmiri i sar, 2014).

Izračunavanje molarne rastvorljivosti totalnog ekstrakta, kao i njegovih komponenata, totalnih sterola, vitamina E i vitamina D u zavisnosti od gustine NK CO₂, korelisane parametrima pritiska i temperature, prvobitno je prethodilo određivanje parametra rastvorljivosti.

U cilju predikcije i objašnjenja molarne rastvorljivosti totalnog ekstrakta i molskih frakcija njegovih konstituenata, sterola, vitamina E i vitamina D (mol/mol_{CO2}) na različitim uslovima NKE, određivan je parametar rastvorljivosti komponenata dobijenog ekstrakta na određenim temperaturama NK CO₂. Kako bi se uporedili parametri rastvorljivosti komponenata ekstrakta i NK CO₂ na određenim uslovima pritiska i temperature (gustine NK CO₂), određivani su i parametri rastvorljivosti za NK CO₂ na primenjenim eksperimentalnim uslovima ekstrakcije (Kagliwal i sar, 2011; Li i sar, 2015; Li i sar, 2003). Sitosterol (molarne mase od 415 g/mol), je uzet kao predstavnik totalnih sterola, dok su α -tokoferol (vitamin E, 430 g/mol) i holekalciferol (vitamin D₃, 384 g/mol), primenjeni kako bi se izračunala stvarna molarna rastvorljivost sterola, vitamina E i vitamina D u dobijenim ekstraktima, a dobijeni rezultati su prikazani u Prilozima (prilog B).

Parametar ratsvorljivosti NK CO₂ na različitim procesnim uslovima pritiska i temperature je determinisan korišćenjem jednačine (46):

$$\delta \text{ (cam/cm}^3\text{)}^{1/2} = 1.25 * \sqrt{Pc} \frac{\rho_{r,SF}}{\rho_{r,L}} = 0.47 \rho_{r,SF} \sqrt{Pc} \quad (46)$$

gde je Pc kritični pritisak (bar),

$\rho_{r,SF}$ redukovana gustina (g/cm³) NK CO₂, i

$\rho_{r,L}$ je redukovana gustina fluida u tečnom stanju.

Parametar rastvorljivosti različitih grupa jedinjenja (δ) je izračunat metodom kontributornih grupa po Fedoru (Fedors, 1974), prema funkcionalnim grupama molekulske strukture jedinjenja po jednačini (47):

$$\delta \text{ (cam/cm}^3\text{)}^{1/2} = \sqrt{\frac{\sum i(\Delta E v) i}{\sum i(\Delta v) i}} \quad (47)$$

gde je $(\Delta E v)_i$ suma kohezivnih energija (cal/mol) i $(\Delta v)_i$ je suma molarnih zapremina (cm^3/mol).

Kritična temperatura jedinjenja je računata po jednačini (48):

$$T_c = 35 \log \sum \Delta T_i \quad (48)$$

gde je ΔT_i suma kritičnih temperatura kontributornih grupa.

Parametar rastvorljivosti različitih grupa jedinjenja u NK CO_2 kao funkcije temperature mogu biti determinisana jednačinom (49):

$$\delta \text{ (cm/cm}^3\text{)}^{1/2} = \delta_1 \left(\frac{V_1}{V_2} \right)^{1.13} = \delta_1 \left(\frac{\rho_1}{\rho_2} \right)^{1.13} = \delta_1 \left(\frac{T_c - T_2}{T_c - T_1} \right)^{0.33} \quad (49)$$

gde je T_c kritična temperatura,

T_2 temperatura na kojoj se preračunava parametar rastvorljivosti, a

T_1 temperatura na kojoj je definisan parametar rastvorljivosti δ_1 .

Metod kontributornih grupa po Fedoru je od značaja i koristi pri određivanju potencijala rastvaranja NK CO_2 u ekstrakciji komponenata sa kompleksnim molekulskim strukturama.

3.4.3. Dobijanje ekstrakata bogatih nezasićenim masnim kiselinama (FAME) postupcima SKE i NKE iz grčkog semena

3.4.3.1. Izbor procesnih parametara SKE i NKE u cilju izolovanja FAME

Za ekstrakciju grčkog semena primenjena je NKE na različitim uslovima temperature i pritiska. U tabeli 6. prikazani su ekstrakcioni uslovi za NKE iz grčkog semena. Primenjena je i tečna ekstrakcija grčkog (SKE) semena na uslovima od 25°C i 30 MPa, na temperaturi ispod kritične temperature, ali na povišenom pritisku iznad kritične vrednosti. Početna masa biljnog materijala grčkog semena bila je $50\text{g} \pm 5\text{g}$. Usitnjeni i prosejani biljni materijal je izlagan NK CO_2 sve dok ekstrakcione krive koje pokazuju zavisnost prinosa ekstrakta od specifične

potrošnje natkritičnog CO₂ ne zaustave rast na grafikonu što se meri izjednačavanjem u merenju tri uzastopne tačke.

Tabela 6. Procesni parametri SKE i NKE grčkog semena

Pritisak/ Temperatura (MPa / °C)	Masa uzorka, g	Protok CO₂, kg/h	Gustina CO₂, kg/m³	Vreme trajanja ekstrakcije, min
30/25	50	0,258	966,8	145
30/40	50	0,303	910,0	218
30/50	50	0,288	870,6	229
20/40	50	0,451	839,9	186
20/50	50	0,451	784,4	187

3.4.3.2. Derivatizacija ekstrakata grčkog semena

U slučaju analize nezasićenih masnih kiselina grčkog semena, uradjeno je metilovanje estara nezasićenih masnih kiselina kako bi se izvršila njihova kvalitativna i kvantitativna analiza u ekstraktima dobijenim natkritičnom ekstrakcijom, ekstrakcijom tečnim CO₂ i etanolnom ekstrakcijom po Soksletu.

Hidroliza uzoraka je vršena po metodi AOAC (AOAC, 1965).

Priprema uzoraka po metodi AOAC je primenjena dodavanjem 2g H₂SO₄ u 125 ml apsolutnog metanola dobijanjem rastvora za derivatizaciju. Uzorci se odmeravaju od 45-60 mg i rastvaraju u 60 ml rastvora (sumporne kiseline u metanolu). Derivatizacija se vrši zagrevanjem 3h. Nakon završenog refluktovanja, rastvor se hladi i u separatoru dekantuje dodavanjem destilovane vode, sve dok kisela reakcija ne izostane. Nakon toga se dodaje 100 ml petrol etra, i onda se sloj petrol etra odvaja i suši anhidrovanim Na₂SO₄. Rastvarač se zatim uparava na vodenom kupatilu i dobijeni ekstrakti odmeravaju i rastvaraju u metilenhloridu i tako pripremljeni rastvori stavljaju na GC/MS analizu.

3.5. Određivanje hemijskog sastava ekstrakata matičnjaka i grčkog semena

3.5.1. Određivanje hemijskog sastava komponenata potencijalnog hipolipemijskog dejstva iz ekstrakata matičnjaka

3.5.1.1. Gasna hromatografija (GC/FID)

Gasnohromatografska analiza rađena je na Hewlett-Packard gasnom hromatografu, model HP-5890 Series II analitičkom sistemu [Hewlett-Packard, Waldbronn (Germany)], opremljenom split-splitless injektorom i autosemplerom povezanim sa HP-5 kolonom (25 m x 0,32 mm, debljine filma 0,52 μ l) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Kao noseći gas korišćen je vodonik (1 ml/min), u split režimu od 1:30. temperatura injektora iznosila je 250 °C, a detektora 300 °C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturnog programiranja od 40-260 °C (4 °C/min), a potom držana konstantnom na 260 °C 10 min. Nakon postizanja zadatih uslova, injektovano je 1 μ l rastvora uzoraka u metilenhloridu. Za kvantifikacione svrhe procenti površina pikova dobijeni integracijom sa odgovarajućih hromatograma (GC/FID) uzeti su kao osnova.

3.5.1.2. Gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC/MS)

Isti analitički uslovi korišćeni su i za potrebe GC/MS analize rađene na HP G 1800C Series II GCD analitičkom sistemu [Hewlett-Packard, Palo Alto, CA (USA)], s tim što je tu rađeno sa HP-5MS kolonom (30m x 0,25mm x 0,25 μ m) i što je kao noseći gas korišćen helijum. Temperatura transfer linije iznosila je 260 °C. Maseni spektri snimani su u EI režimu (70 eV), u opsegu m/z 40-450.

Hloroformski rastvori uzoraka etarskih ulja i ekstrakata (0,2 μ l) injektirani su u split-režimu (1:30), a samo u posebno naznačenim slučajevima u splitless režimu. Identifikacija pojedinačnih komponenata vršena je masenospektrometrijski i preko Kovačevih indeksa, uz korišćenje različitih baza masenih spektara (NIST/Wiley), različitih načina pretrage (PBM/NIST/AMDIS ver 2.1) i raspoloživih literaturnih podataka (Adams, 2007).

3.5.2. Određivanje hemijskog sastava komponenata potencijalnog hipolipemijskog dejstva ekstrakata grčkog semena

3.5.2.1. Određivanje aktivne komponente diosgenina iz ekstrakata grčkog semena tečno masenom hromatografijom visokih performansi (HPLC)

Kvantifikacija sadržaja diosgenina u dobijenim ekstraktima je analizirana na uređaju HPLC (Agilent Technologies 1200). Detekcija signala je vršena na diodnom detektoru (DAD), a hromatogrami su snimljeni na $\lambda = 204$ nm. HPLC analiza ispitivanih uzoraka je postignuta korišćenjem kolone LiChrospher 100 RP 18e (5 μ m), 250x4 mm, primenom izokratskog eluiranja sa protokom 0,7 mL/ min. Mobilna faza je bila 95% metanol, sa temperaturom kolone od 30 °C. Uzorci su pripremljeni rastvaranjem 120 mg ekstrakta u 1 mL smeše MeOH/CHCl₃. Pripremljen rastvor uzoraka je filtriran kroz 0,2 μ m PTFE filtere. Zapremina injektovanog uzorka je bila 4 μ L. Standardni rastvor za kvantifikaciju diosgenina je pripremljen koncentracije od 0.35 mg/mL, rastvoren u metanolu. Injektovana zapremina standardnog rastvora je bila 4 μ L, kao i kod analiziranih uzoraka ekstrakata. Rezultati dobijenih hromatograma iz uzoraka ekstrakata se identifikuju po hromatogramu standardnog rastvora diosgenina. Kvantifikacija diosgenina u uzorcima ekstrakata je izvršena eksternom kalibracijom sa standardom. Prinos diosgenina u analiziranim uzorcima je računat i izražen kao mg diosgenina/ g bm (bm, biljni materijal).

3.5.2.2. Određivanje aktivnih komponenti totalnih sterola, vitamina E i vitamina D iz ekstrakata grčkog semena gasnom (GC/FID) I gasno-masenom hromatografijom (GC/MS)

3.5.2.2.1. Gasna hromatografija (GC/FID)

Gasnohromatografska analiza ekstrakata rađena je po sličnom principu kao i GC/FID analiza ekstrakata matičnjaka na Hewlett-Packard gasnom hromatografu, model HP-5890 Series II apparatus [Hewlett-Packard, Waldbronn (Germany)], opremljenom split-splitless injektorom i autosemplerom povezanim sa HP-5 kolonom (25m x 0,32 mm, debljine filma 0,52 μ l) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Kao noseći gas korišćen je vodonik (1 ml/min), korišćen je split režim, temperatura injektora iznosila je 250 °C, a detektora 300 °C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturnog programiranja od 40-260 °C (sa

po 4 °C/min), a od 260- 310 °C (10°C/ min), a nakon postizanja 310 °C, držana izotermički 10 min. Nakon postizanja zadatih uslova, injektovano je 1 µl rastvora uzoraka u metilen-hloridu. Za kvantifikacione svrhe procenti površina pikova dobijeni integracijom sa odgovarajućih hromatograma (GC/FID) uzeti su kao osnova.

3.5.2.2.2. Gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC/MS)

Isti analitički uslovi korišćeni su i za potrebe GC/MS analize rađene na HP G 1800C Series II GCD analitičkom sistemu [Hewlett-Packard, Palo Alto, CA (USA)], s tim što je tu rađeno sa HP-5MS kolonom (30m x 0,25mm x 0,25 µm) i što je kao noseći gas korišćen helijum. Temperatura transfer linije iznosila je 260 °C. Maseni spektri snimani su u EI režimu (70 eV), u opsegu m/z 40-450.

Injektirana je smeša ekstrakta u hloroformu i metanolu u količini od 0,2 µl. Identifikacija pojedinačnih komponenata vršena je masenospektrometrijski i preko Kovačevih indeksa, uz korišćenje različitih baza masenih spektara (NIST/Wiley), različitih načina pretrage (PBM/NIST/AMDIS ver 2.1) i raspoloživih literaturnih podataka (Adams, 2007). Relativna proporcija konstituenata je izražena preko procentualnog udela prema površini pika, tako što je zbir svih odziva komponenata u vidu površine pika predstavljao celinu u odnosu na koju je preračunavan udeo pojedinačne površine pika komponente.

3.5.2.3. Određivanje aktivnih komponenti nezasićenih masnih kiselina (FAME) iz ekstrakata grčkog semena gasnom (GC/FID) i gasno-masenom hromatografijom (GC/MS)

3.5.2.3.1. Derivatizacija ekstrakata grčkog semena

U slučaju analize grčkog semena, vršena je metanoliza u cilju metilovanja estara nezasićenih masnih kiselina kako bi se izvršila njihova kvalitativna i kvantitativna analiza u ekstraktima dobijenim natkritičnom ekstrakcijom, ekstrakcijom tečnim CO₂ i etanolnom ekstrakcijom po Soksletu. Derivatizovani uzorci su uparavani, kako bi se uklonili rastvarači, i zaostao metanolizovan ekstrakt za dalju analizu.

Hidroliza uzoraka je vršena po metodi AOAC (Official Surplus Method 965.4 Fatty Acids in Oils and Fats, Preparation of Methyl Esters, Final Action 1984, Surplus 1965).

Priprema uzoraka po metodi AOAC:

Dodavanjem 2g H₂SO₄ u 125 ml apsolutnog metanola dobija se rastvor za derivatizaciju. Uzorci se odmeravaju od 45-60 mg i rastvaraju u 60 ml rastvora (sumporne kiseline u metanolu). Derivatizacija se vrši zagrevanjem 3h na temperaturi od 100 °C. Nakon završenog zagrevanja uz refluks, rastvor se hladi i u separatoru dekantuje dodavanjem vode sve dok kisela reakcija ne izostane (što se registruje indikatorom metil-crveno). Nakon toga se dodaje 100 ml petrol etra (frakcije od 40-60), zatim se sloj petrol etra odvaja i suši anhidrovanim Na₂SO₄. Rastvarač se zatim uparava na vodenom kupatilu i dobijeni ekstrakti odmeravaju i rastvaraju u metilenhloridu i tako pripremljeni rastvori stavljaju na GC/ MS analizu.

Uzorci za analizu na gasno-masenoj spektrometriji pripremani su odmeravanjem 45-60 mg ekstrakata i etarskog ulja i njihovim rastvaranjem u metilenhloridu. U slučaju slabijeg rastvaranja ekstrakata, uzorci su tretirani u ultrazvučnom kupatilu 10 min nakon čega su rastvori bili transparentni.

3.5.2.3.2. Gasna hromatografija (GC/FID)

Gasnohromatografska analiza rađena je po istom principu kao i analiza ekstrakata matičnjaka na Hewlett-Packard gasnom hromatografu, model HP-5890 Series II analitičkog sistema [Hewlett-Packard, Waldbronn (Germany)], opremljenom split-splitless injektorom i autosemplerom povezanim sa HP-5 kolonom (25m x 0,32 mm, debljine filma 0,52 µl) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Kao noseći gas korišćen je vodonik (1 ml/min), korišćen je split režim od 1:30. temperatura injektora iznosila je 250 °C, a detektora 300 °C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturnog programiranja od 40-260 °C (4 °C/min), a potom držana konstantnom na 260 °C 10 min. Nakon postizanja zadatih uslova, injektovano je 1 µl rastvora uzoraka u metilen-hloridu. Za kvantifikacione svrhe procenti površina pikova dobijeni integracijom sa odgovarajućih hromatograma (GC/FID) uzeti su kao osnova.

3.5.2.3.3. Gasna hromatografija/masena spektrometrija (GC/MS)

Isti analitički uslovi korišćeni su i za potrebe GC/MS analize rađene na HP G 1800C Series II GCD analitičkom sistemu [Hewlett-Packard, Palo Alto, CA (USA)], s tim što je tu rađeno sa HP-5MS kolonom (30m x 0,25mm x 0,25 μ m) i što je kao noseći gas korišćen helijum. Temperatura transfer linije iznosila je 260 °C. Maseni spektri snimani su u EI režimu (70 eV), u opsegu m/z 40-450.

Hloroformski rastvori uzoraka etarskih ulja i ekstrakata (0,2 μ l) injektirani su u split-režimu (1:30), a samo u posebno naznačenim slučajevima u splitless režimu. Identifikacija pojedinačnih komponenata vršena je masenospektrometrijski i preko Kovačevih indeksa, uz korišćenje različitih baza masenih spektara (NIST/Wiley), različitih načina pretrage (PBM/NIST/AMDIS ver 2.1) i raspoloživih literaturnih podataka (Adams, 2007).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom radu korišćene su različite metode ekstrakcije poput hidrodestilacije, ekstrakcije organskim rastvaračima i ugušćenim CO₂ (SKE i NKE) za dobijanje ekstrakata iz matičnjaka i grčkog semena bogatih komponentama sa potencijalnom hipolipemičnom aktivnošću. Određivan je prinos i ispitivan hemijski sastav dobijenih ekstrakata. Analizom uticaja procesnih parametara na prinos ekstrakcije i sadržaj diosgenina, odnosno u natkritičnim ekstraktima primenom RSM utvrđeni su optimalni parametri procesa NKE.

Dvostepenom frakcionom SKE i NKE matičnjaka težilo se dobijanju ekstrakata bogatih komponentama sa antioksidativnom aktivnošću zbog toga što se hipolipemična aktivnost ekstrakata matičnjaka najčešće ispoljava antioksidativnim mehanizmom u sistemima povišenog krvnog pritiska, holesterola i triglicerida. S tim u vezi, analizirano je dejstvo ekstrakata matičnjaka dobijenih različitim metodama ekstrakcije na slobodne radikale.

Primenom modela Sovove (1994) simuliran je proces NKE kojim su dobijeni ekstrakti sa potencijalnim hipolipemijskim dejstvom. Analizom kinetike NKE procesa prikazani su odgovarajući matematički modeli koji su omogućili uvid u prenos mase u NK CO₂ i čvrstoj fazi. Primenom modela na NKE proces, omogućeno je objašnjenje i razumevanje ekstrakcionog procesa, kao i razumevanje dostupnosti komponenata iz biljnog materijala sadržanih u dobijenom ekstraktu, objašnjavajući selektivnost i afinitet SKE i NKE na različitim uslovima.

NKE grčkog semena, različitim postupcima predtretmana i procesnih uslova težilo se dobijanju ekstrakata sa većim sadržajem diosgenina, grupom sterola, vitamina E i vitamina D, kao i ekstrakata bogatih FAME. Dobijanje ekstrakata bogatih diosgeninom pomoću NKE u širokom opsegu parametara pritiska, temperature i vremena ekstrakcije, omogućeno je iz prethodno odmašćenog i hidrolizovanog semena. RSM metodologijom odzivnih površina definisani su uticaji i međusobne interakcije procesnih parametara pritiska, temperature i vremena ekstrakcije (kroz masu utrošenog CO₂ za vreme procesa) na prinos ekstrakta i sastav diosgenina, pri čemu je glavni cilj bio definisanje optimalnih uslova za dobijanje ekstrakata bogatih diosgeninom iz grčkog semena.

NKE grčkog semena pri istim procesnim uslovima, ali bez prethodnog tretmana dobijeni su ekstrakti sa većim sadržajem sterola, vitamina E i vitamina D. Primenom RSM metodologije, kao i u primeru dobijanja ekstrakata bogatih diosgeninom, razmatrao se uticaj procesnih

parametara na prinos i sastav ekstrakata i željenih komponenata, i definisani su optimalni uslovi ekstrakcije sterola, vitamina E i vitamina D. Determinisanjem molarne rastvorljivosti dobijenih ekstrakta, kao i molskih udela sterola, vitamina E i vitamina D na različitim uslovima NKE, omogućeno je definisanje i bolje razumevanje različitih prinosa i odnosa sastava željenih jedinjenja na različitim procesnim uslovima.

Težilo se i dobijanju ekstrakata sa većim sadržajem nezasićenih masnih kiselina (FAME) SKE i NKE grčkog semena na različitim procesnim uslovima. Određivanjem njihovog sastava u dobijenim ekstraktima, prethodno derivatizovanim, omogućen je uticaj procesnih parametara na sadržaj FAME u dobijenim ekstraktima. Analizom kinetike procesa, omogućen je jasniji uvid uticaja procesnih parametara na brzinu ekstrakcije FAME iz grčkog semena.

4.1. Dobijanje potencijalnih hipolipemičnih ekstrakata matičnjaka

4.1.1. Etarsko ulje i ekstrakti matičnjaka

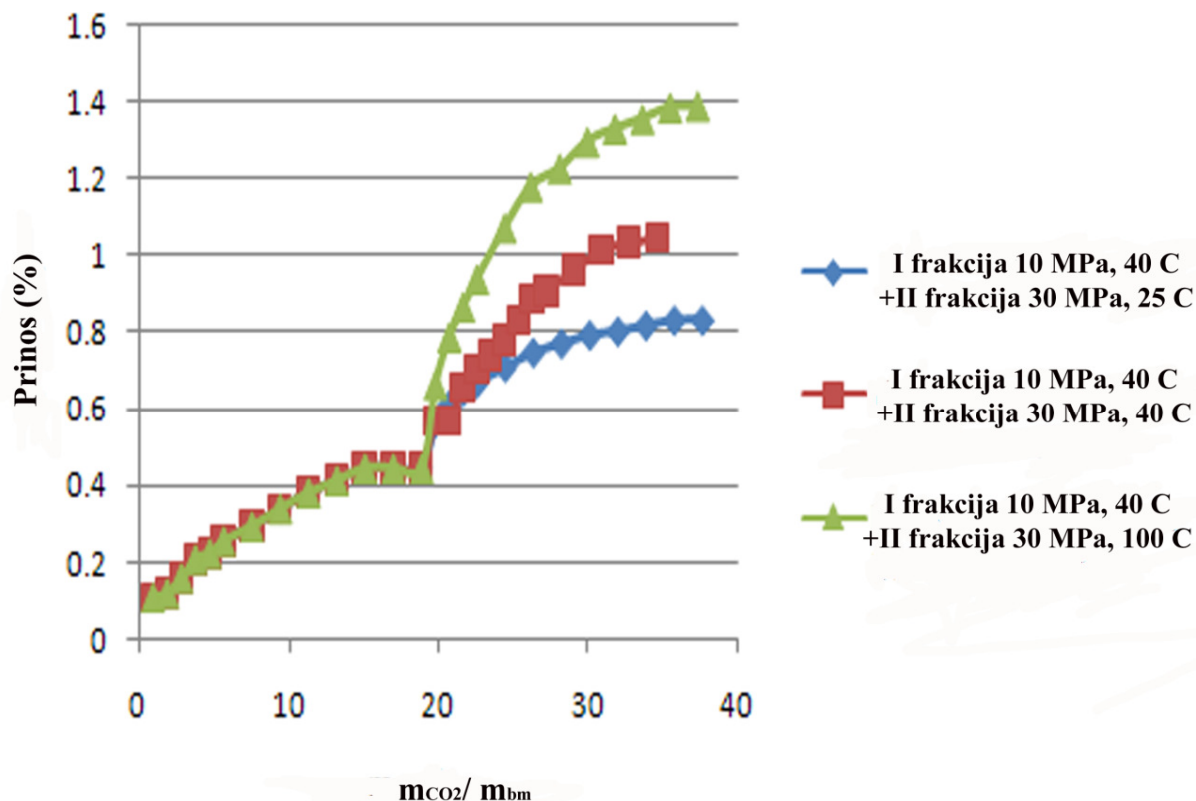
Ekstrakcijom etanolom i NKE dobijeni su smolasti ekstrakti zelene boje. Natkritični ekstrakti dobijeni na nižim pritiscima (10 MPa) bili su svetlije zelene boje u odnosu na ekstrakte dobijene na višim pritiscima (30 MPa). Prinosi ekstrakata matičnjaka dobijeni različitim metodama ekstrakcije prikazani su u tabeli 7.

Tabela 7. Prinosi ekstrakata izolovanih iz matičnjaka

Metoda	Temperatura (°C)	Pritisak (MPa)	Prinos (%)
Hidrodestilacija	/	/	0,03
Sokslet ekstrakcija	/	/	25,24
SKE	25	30	0,385
NKE	40	10	0,470
NKE	40	30	0,441
NKE	100	30	0,943

Metod dvostepene frakcione ekstrakcije je primenjen sa ciljem da se izoluju antioksidativni ekstrakti sa potencijalnim hipolipemičnim dejstvom. Prva frakcija ekstrakta dobijena NKE (10 MPa/40 °C) sadržala je uglavnom lako isparljive i aromatične komponente, koji čine sastav etarskog ulja. Ovom ekstrakcijom se ne omogućava i ne favorizuje izolacija komponenata koje su skladištene dublje u biljnom matriksu matičnjaka. Za razliku od uslova prve frakcije, druga frakcija primenjena na pritisku od 30 MPa i temperaturama od 40 ili 100 °C (NKE) ili 25 °C (SKE) omogućava efikasnije prodiranje rastvarača u biljni matriks (unutrašnji ćelijski materijal biljke) i ekstrahuje teže komponente koje čine antioksidativnu frakciju matičnjaka.

Ukupni prinos ekstrakta dobijen prvom i drugom frakcionom ekstrakcijom je činio između 0,83 % i 1,39 %, što je zavisio od ekstrakcionih uslova druge frakcije čiji je prinos varirao od 0,385% do 0,943% (g/100g_{bm}). Najveći prinos antioksidativnih, težih frakcija je ostvaren pri NKE na 100 °C i 30 MPa, što je činilo dvostruko veći prinos u poređenju sa prinosom ostvarenim NKE na 40 °C i 30 MPa, dok su ekstrakti sa antioksidativnim dejstvom dobijeni SKE na 25 °C i 30 MPa imali najmanji prinos. Ostvaren prinos teže frakcije sa antioksidativnim dejstvom SKE i NKE na različitim uslovima prikazan je na slici 27.



Slika 27. Prinos matičnjaka u zavisnosti od količine utrošenog rastvarača (kg CO₂/kg biljnog materijala) prve frakcije dobijene natkritičnom ekstrakcijom na 10 MPa i 40°C praćene drugom frakcijom na: 30 MPa, 25°C; 30 MPa, 40°C i 30 MPa, 100°C.

U tabeli 8. su dati rezultati prinosa etarskog ulja i teže, antioksidativne frakcije matičnjaka dobijeni ekstrakcijom, pri različitim pritiscima i temperaturama SKE i NKE u laboratorijskim uslovima.

Tabela 8. Prinos frakcija ekstrakcije matičnjaka

Frakcija	Pritisak/ temperatura	Vreme trajanja ekstrakcije, min	Prinos ekstrakta, mas %
I	10 MPa / 313 °K	87	0,447
II/1	30 MPa / 298 °K	191	0,385
II/2	30 MPa / 313 °K	198	0,597
II/3	30 MPa / 373 °K	248	0,943

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je za izdvajanje prve lakše frakcije bogate etarskim uljem potrebno znatno kraće vreme u odnosu na drugu težu frakciju bogatiju antioksidativnim komponentama. Takođe se može uočiti da se sa porastom temperature povećava prinos druge frakcije, kao i vreme izdvajanja.

4.1.2. Hemijski sastav ekstrakata matičnjaka

Hemijski sastav prve, odnosno lakše frakcije (etarskog ulja) i druge, teže (SKE ili NKE) frakcije dat je u tabeli 9.

Tabela 9. Hemijski sastav frakcija, mas%

Broj	Jedinjenje	KI	Metoda ekstrakcije				
			HD	NKE I	NKE II/1	NKE II/2	NKE II/3
1	linalol oksid	1063,3	0,2	/	/	/	0,1
2	linalol	1098,8	0,7	0,1	/	/	/
3	izopulegol	1141,6	1,2	0,2	0,1	/	/
4	citronelal	1151,0	2,4	1,7	0,1	0,2	0,1
5	<i>cis</i> -krisantenol	1156,0	/	0,2	/	/	0,3
6	Z-izocitral	1156,3	/	/	/	/	/
7	rosefuran epoksid	1166,9	/	/	/	/	0,1
8	mentol	1170,7	0,4	0,3	/	/	/
9	<i>cis-α</i> -nekrodol	1171,7	0,6	/	/	/	/
10	<i>E</i> -izocitral	1181,0	1,1	0,3	/	/	0,1
11	<i>neo</i> -dihidrokarveol	1193,0	0,4	/	/	/	/
12	citronelol	1230,5	1,1	0,3	/	/	0,2
13	neral	1241,0	5,2	1,9	0,1	/	0,4
14	piperiton	1244,1	/	/	/	/	0,5
15	geraniol	1257,1	2,1	0,5	0,1	2,5	0,2
16	metil citronelat	1258,7	t	/	/	/	/
17	geranial	1272,4	8,4	4,1	/	/	1,1
18	bornil acetat	1273,6	/	/	/	0,2	/
19	hidroksi citronelal	1274,7	/	/	/	/	0,3
20	timol	1294,2	/	/	0,2	0,3	1,7
21	<i>p</i> -ment-1-en-9-ol	1299,5	/	/	/		0,4
22	<i>cis</i> -karvon oksid	1299,9	/	/	/	0,2	/
23	metil geranat	1322,0	1,6	0,5	/	/	0,4
24	citronelinska kiselina	1329,4	/	/	0,2	/	0,4
25	eugenol	1350,7	/	/	/	/	0,2

26	α-kubeben	1361,1	/	/	/	/	0,5
27	geranil acetat	1373,7	2,6	1,2	/	/	0,2
28	α-kopen	1374,0	1,4	/	/	/	/
29	β-(E)-damaskenon	1381,5	0,2	/	/	/	/
30	etil geranat	1383,2	/	/	/	/	0,6
31	4α-α,7-α,7α-β-nepeta lakton	1389,0	/	/	/	/	0,3
32	citronelil oksii-acetaldehid	1394,2	/	/	/	/	0,2
33	(E)-kariofilen	1415,3	6,4	1,6	0,2	0,6	0,4
34	pinonska kiselina	1440,0	/	0,4	/	/	/
35	(Z)-jasmonil acetat	1452,0	/	/	/	/	0,2
36	α-humulen	1452,0	0,3	0,9	/	/	0,2
37	geranil acetan	1453,0	t	/	/	/	/
38	β-(E)-farnesen	1453,6	1,4	4,3	0,2	/	/
39	α-selinen	1479,7	/	/	/	/	0,6
40	β-(E)-jonon	1482,7	1,2	1,4	0,1	0,4	0,7
41	pentadekan	1485,4	/	0,6	/	/	0,6
42	10-<i>epi</i>-itlicen etar	1509,3	1,1	/	/	/	/
43	β-tujoplicinol	1517,6	/	2,1	0,3	/	0,7
44	italicen epoksid	1547,0	0,5	0,3	/	/	/
45	kariofilen oksid	1583,2	18,4	8	0,4	0,3	1,2
46	viridiflorol	1589,9	2,7	0,6	0,2	0,6	0,8
47	fokeinol	1597,0	0,4	/	/	/	/
48	heksadekan	1598,8	/	t	/	/	/
49	humulen epoksid II	1605,1	1,6	0,4	0,3	/	0,4
50	himakalol	1624,4	t	/	/	/	/
51	alo-aromadendren epoksid	1630,0	t	t	/	/	/
52	kariofila-4(12),8(13)-dien-5-β-ol	1634,4	2,2	0,4	0,2	/	/
53	5-hidroksi-izobornil izobutanoat	1655,0	/	t	0,4	/	0,7

54	α-bisabolol oksid B	1656,0	1,1	0,4	/	/	/
55	9-epi-14-hidroksi-(E)-kariofilen	1658,6	1,2	0,4	/	/	/
56	9-epi-14-hidroksi-(Z)-kariofilen	1662,5	/	1,2	0,6	0,5	0,6
57	(E)-10,11-dihidroatlanton	1671,7	3,7	/	/	/	/
58	lolidiol		/	/	15,4	9,3	9,7
59	amorfa-4,9-dien-2-ol	1673,3	/	/	/	/	1,6
60	heksil estar salicilne kiseline	1675,0	t	t	/	/	/
61	α-bisabolon oksid A	1679,5	0,8	0,7	/	/	/
62	α-germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-ol	1681,4	0,6	0,4	/	/	/
63	heptadekan	1684,1	/	0,3	/	/	/
64	oplapon	1726,1	/	0,3	0,3	/	/
65	eremofilon	1734,6	0,7	0,3	9,2	/	2,2
66	α-bisabolol oksid A	1748,0	/	1,1	2,6	/	/
67	oktadekan	1783,7	/	0,1	1,3	/	/
68	4α, 6α-eudesm-11-endiol	1796,1	/	2,2	5,4	/	/
69	izopropil tetradekanoat	1811,6	/	0,8	/	/	/
70	8-hidroksi eremofilon	1840,0	0,7	1,1	4,2	/	/
71	α-kenopodiol	1845,6	/	0,8	3,2	/	/
72	spiroetar	1868,7	/	0,8	/	/	/
73	5-(E),9-(E)-farnesil aceton	1914,4	0,6	0,7	2	/	/
74	metil heksadekanoat	1921,0	/	0,1	6,7	2,5	/
75	(Z, Z)-geranil lonalol	1960,1	0,2	0,3	/	/	/
76	heksadekanska kiselina	1991,1	5,3	17,5	11,6	16,9	14,2
77	abietetratrien	2048,8	0,3	0,9	1,9	/	/
78	manool	2051,3	1,5	/	/	/	/
79	metil linoleat	2079,0	/	0,3	2,5	1,7	4,6
80	heneikosan	2083,0	/	0,9	/	/	/

81	oktadekanol	2099,0	/		2,8	t	2,6
82	linoleinska kiselina	2132,0	/	13	11,4	20,2	13,6
83	trans-feruginol	2134,7	/	0,8	/	2,8	/
84	dehidro abietol	2314,7	/	2,1	/	2,1	3,0
85	labd-7,13-den-15-ol acetat	2367,2	/	0,3	/	2,6	0,9
86	tetrakosan	2379,9	/	/	/	2,1	4,1
87	pentakosan	2480,6	/	0,2	/	1,4	1,9
88	heksakosan	2758,8	/	0,3	/	4,0	/
89	heptakosan	2693,0	0,4	0,2	2,7	0,9	5,2
90	oktakosan	2779,1	/	0,5	1,6	2,0	
91	nonakosan	2879,6	/	3,8	1,1	2,0	2,2
92	triakontan	2873,3	/	0,4	1,4	2,9	/
93	untriakontan	3093,3	/	0,5	0,7	1,8	4,3
94	dotriakontan	3200,0	/	0,9	0,9	2,2	2,2
95	(3β, 4S)-stigma-5-en-3ol		/	/	2,9	3,6	6,3
96	tetratrikanontan	3400,0	/	8	2,8	2,5	4,7
Ukupno Identifikovano			82,9	94,9	98,3	89,3	98,7

Tragovi, $t < 0,01$; KI – Kovačev retencioni indeks; HD – hidrodestilacija;

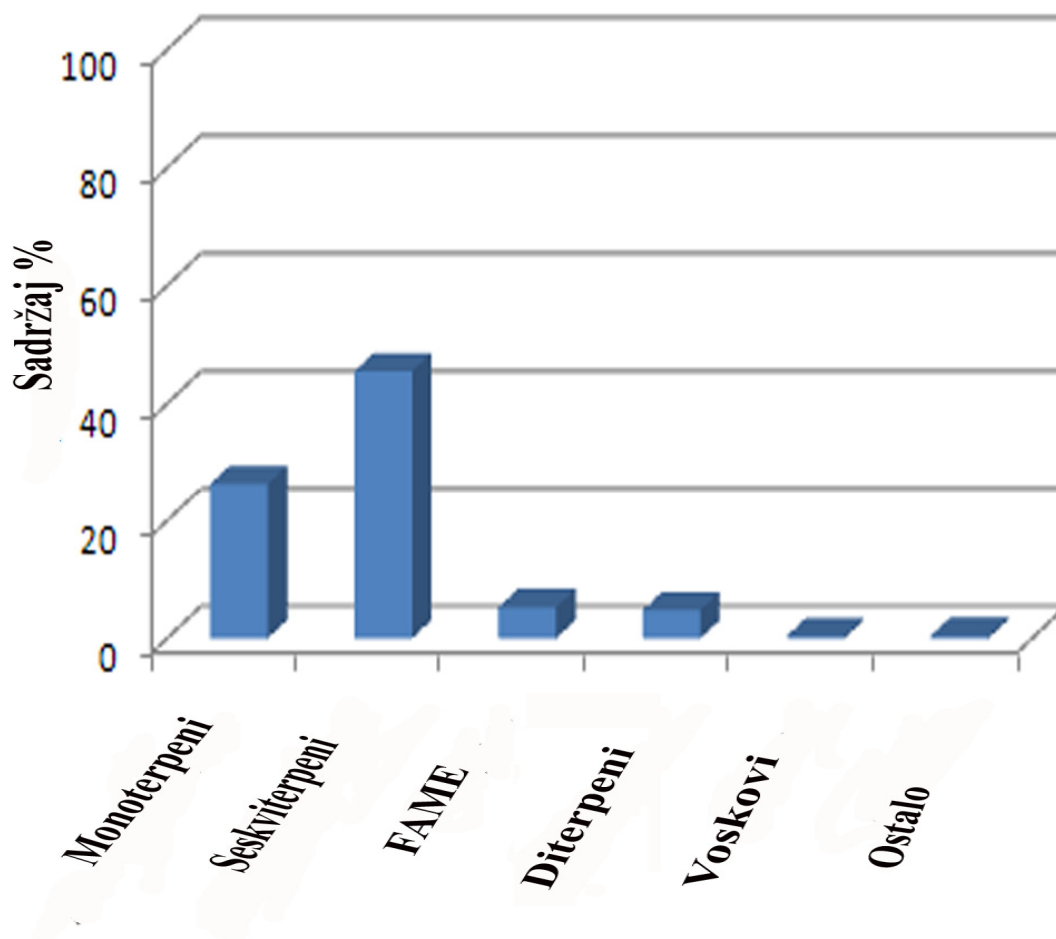
NKE – natkritična ekstrakcija [(1 - 10 MPa / 313 K); (2 - 30 MPa / 298 K); (3 - 30 MPa / 313 K); (4 - 30 MPa / 373 K)]

Kao što se vidi iz tabele 9 najzastupljenija komponenta etarskog ulja dobijena HD je kariofilen oksid (18,4%), a kod NKE palmitinska kiselina (11,6 – 17,5%). Iz tog razloga je za simulaciju ekstrakcije po modelu Sovove, palmitinska kiselina uzeta za pseudokomponentu. Može se zapaziti da je udeo monoterpena i seskviterpena veći u etarskom ulju dobijenom HD (26% i 45%) u odnosu na ekstrakte dobijene SKE i NKE (10-17%) i (2-30%). Eugenol i timol, za koje je dokazano da imaju antioksidativno dejstvo, bili su prisutni samo u ekstraktima dobijenim sa ugušćenim CO₂. Udeo timola i eugenola je bio znatno veći u ekstraktima dobijenim sa NK CO₂ u odnosu na ekstrakte dobijene pomoću SKE. Sadržaj terpena u ekstraktima dobijenim sa ugušćenim CO₂ (14-31%) bio je znatno veći nego u etarskom ulju (1%).

Hemijski sastav etarskog ulja dobijenog hidrodestilacijom

Nakon GC/MS hromatografske analize izvršena je karakterizacija određenih komponenata i predstavljena kroz specifične grupe jedinjenja monoterpena (M), seskviterpena (S), nezasićenih masnih kiselina (FA) ili metil estara nezasićenih masnih kiselina (FAME), diterpena (D), voskova (W) i ostalih grupa koje su determinisane kao procentualni udeo na odgovarajućim hromatogramima.

Etarska ulja dobijena HD matičnjaka sadržala su 44 komponente, od kojih je 14 monoterpena, 23 seskviterpena, 1 nezasićena masna kiselina, 5 diterpena, voskova i smola. Prinos etarskog ulja dobijenog HD bio je 0,03%. Hemijski sastav etarskog ulja prikazan je na slici 28.



Slika 28. Sastav etarskog ulja dobijenog HD

Analizom etarskog ulja matičnjaka dobijenog HD uočene su veće količine monoterpena kao što su citronelal (2,4%), neral (5,2%), geranial (8,4%), i seskviterpena kao što su (*E*)-kariofilen (6,4%) i kariofilen oksid (18,4%). Količine FAME su bile niže (palmitinska kiselina (5,3 %)), kao i diterpena (4,8%), voskova (0,4%) i ostalih (0,5%).

Hemijski sastav etarskog ulja i ekstrakata dobijenih SKE i NKE matičnjaka

U natkritičnim ekstraktima matičnjaka, u prvoj frakciji određeno je oko 20 komponenata koje uglavnom pripadaju grupi jedinjenja monoterpena i seskviterpena, dok određen broj komponenata pripada diterpenima, nezasićenim masnim kiselinama, metil-estrima nezasićenih masnih kiselina i alkoholima, kao i voskovima. U drugoj, težoj frakciji dobijenoj NKE ili SKE, identifikovan je znatno veći broj komponenata uključujući 23 komponente monoterpena, 33 seskviterpena, 9 diterpena, 4 nezasićene masne kiseline, njihovi metil estri i alkoholi i 12 voskova.

Prinos prve frakcije NKE je bio veći u odnosu na prinos ostvaren HD. Etarsko ulje dobijeno HD je imalo veći procenat monoterpena (26,4 %) i seskviterpena (45,5%), dok su ekstrakti dobijeni NKE imali veći udeo nezasićenih masnih kiselina (>30%) i ugljovodonika (>20%). Veće količine citronelala (2,8%), nerala (6,2%), geraniala (10,1%), (*E*)-kariofilena (7,7%) i kariofilen oksida (22,1%) su determinisane u etarskom ulju dobijenom prvom frakcijom NKE, dok su ekstrakti teže frakcije, frakcije sa neisparljivim liposolubilnim jedinjenjima, sadržali veće količine linolne kiseline (~15%) i palmitinske kiseline palmitic (~15%) kao i njihove metil estre (~3%) i alkohole (~2%).

Poređenjem sastava ekstrakata dobijenih drugom frakcijom na različitim uslovima NKE na 30 MPa i SKE, primećena je razlika u količini monoterpena i seskviterpena koji su bili u većoj količini u ekstraktu dobijenim na 30 MPa i 100°C, dok su ekstrakti dobijeni na 40°C sadržali veće količine nezasićenih masnih kiselina. Ekstrakti druge frakcije dobijeni SKE na 30 MPa i 25 °C pokazali su prilično različit sastav ekstrakta u odnosu na ekstrakt dobijen NKE na 30 MPa i 40 °C. Ekstrakt dobijen tečnim CO₂ na visokom pritisku (30 MPa/25 °C) je imao veće količine monoterpena, i znatno veće količine seskviterpena, dok su ekstrakti dobijeni NKE pokazali veće količine nezasićenih masnih kiselina i njihovih metil estara i alkohola, diterpena i voskova. Analiza etarskog ulja dobijenog i HD, a i prvom frakcijom NKE nije sadržala eugenol i timol, za razliku od druge frakcije, pri čemu je eugenol izolovan samo pri visokoj temperaturi NKE (30 MPa/100 °C).

Sadržaj izolovanih komponenata u dobijenim ekstraktima po pripadnosti specifičnim grupama jedinjenja je prikazan u tabeli 10.

Tabela 10. GC/MS analiza hemijskog sastava komponenata specifičnih grupa jedinjenja frakcija dobijenih NKE , SKE i HD

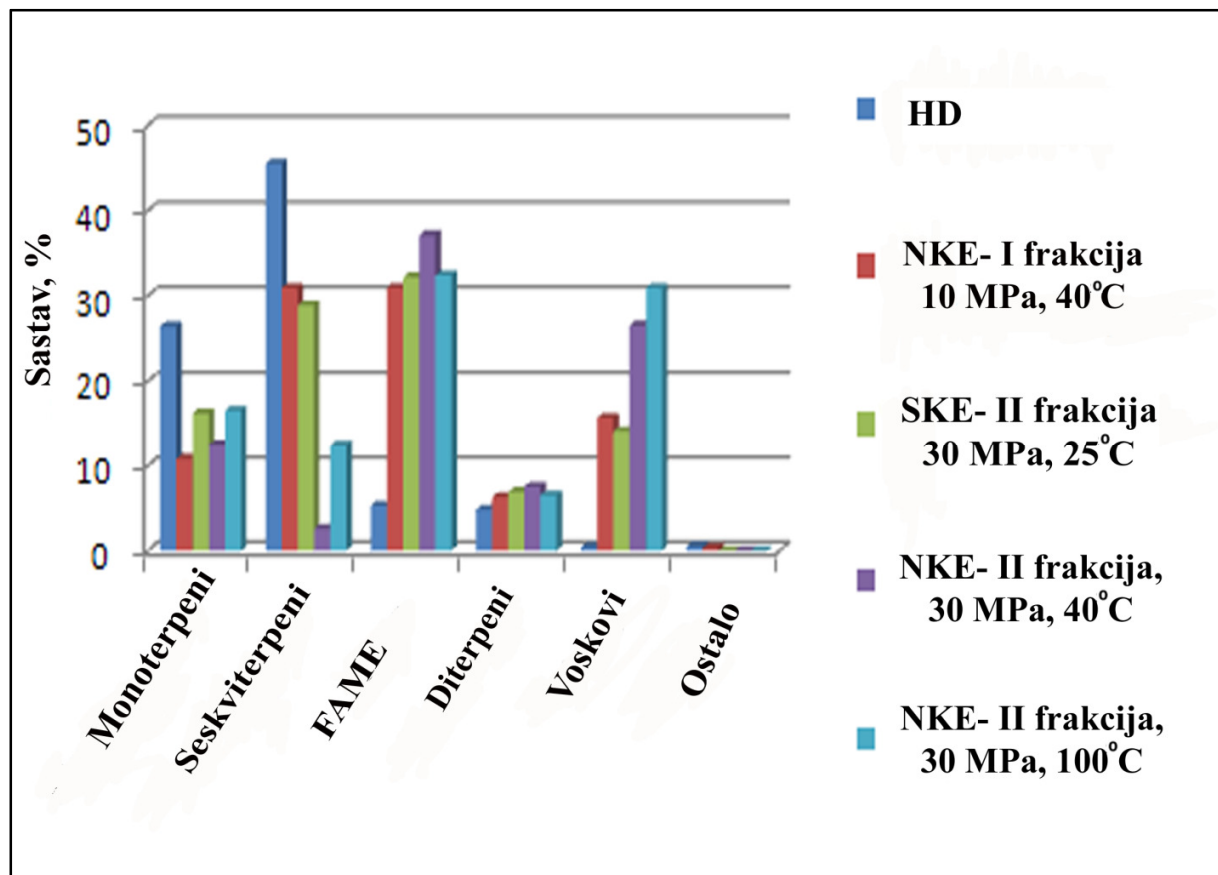
Konstituenti	SASTAV (mas %)					
	KI	HD	NKE- I frakcija 10MPa,40°C	SKE- II frakcija 30MPa,25°C	NKE- II frakcija 30MPa,40°C	NKE- II frakcija 30MPa, 100 °C
Monoterpeni						
Citronelal	1151,0	2,4	1,7	0,1	0,2	0,1
Neral	1241,0	5,2	1,9	0,1	/	0,4
Geranial	1272,4	8,4	4,1	/	/	1,1
Timol	1294,2	/	/	0,2	0,3	1,7
Eugenol	1350,7	/	/	/	/	0,2
Geranil acetat	1373,7	2,6	1,2	/	/	/
Ukupno (M)		26,4	10,8	16,2	12,5	16,5
Seskviterpeni						
α -kopaen	1374,0	1,4	/	/	/	/
α -kubeben	1361,1	/	/	/	/	0,5
α -humulen	1452,0	0,3	0,9	/	/	0,2
(E)-kariofilen	1415,3	6,4	1,6	0,2	0,6	0,4
Viridiflorol	1589,9	2,7	0,6	0,2	0,6	0,8
Karyofilen- oksid	1583,2	18,4	8,0	0,4	0,3	1,2
β -(E)-farnesen	1453,6	1,4	4,3	0,2	/	/
Ukupno (S)		45,5	30,9	28,9	2,6	12,4
Nezasićene masne kisljine, alkoholi i njihovi metil estri						

DOBIJANJE, KARAKTERIZACIJA I OPTIMIZACIJA HIPOLIPEMIJSKIH EKSTRAKATA MATIČNJAKA (*Melissa officinalis*) I GRČKOG SEMENA (*Trigonella foenum-graecum*) NATKRITIČNIM UGLJENIK (IV)-OKSIDOM

Palmitinska kiselina	1991,1	5,3	17,5	11,6	16,9	14,2
Linolna kiselina	2132,0	/	13,0	11,4	20,2	13,6
Metil heksadekanoat	1921,0	/	0,1	6,7	2,5	/
Metil linoleat	2079,0	/	0,3	2,5	1,7	4,6
Oktadekanol	2099,0	/	/	2,8	t	2,6
Ukupno (FA i estara)		5,3	30,9	35,0	41,3	35,0
Diterpeni						
Manol	2051,3	1,5	/	/	/	/
Trans-feruginol	2134,7	/	0,8	/	2,8	/
Ukupno (D)		4,8	6,3	4,1	7,5	3,9
Viši ugljovodnici						
Heptakozan	2693,0	0,4	0,2	2,7	0,9	5,2
Heksakozan	2758,8	/	0,3	/	4,0	/
Oktakozan	2779,1	/	0,5	1,6	2,0	/
Nonakozan	2879,6	/	3,8	1,1	2,0	/
Tetrakozan	2379,9	/	/	/	2,1	4,1
Pentakozan	2480,6	/	0,2	/	1,4	1,9
Ukupno (W)		0,9	16,0	14,1	25,4	30,9

*KI, Kovačevi indeksi

Sastav etarskog ulja dobijenog HD, prvom frakcijom NKE i ekstrakata dobijenih drugom frakcijom SKE ili NKE, predstavljen kao udeo specifičnih grupa jedinjenja (monoterpena, seskviterpena, nezasićenih masnih kiselina i njihovih metil estara i alkohola, diterpena, voskova i ostalih komponenata) je predstavljen na slici 29.



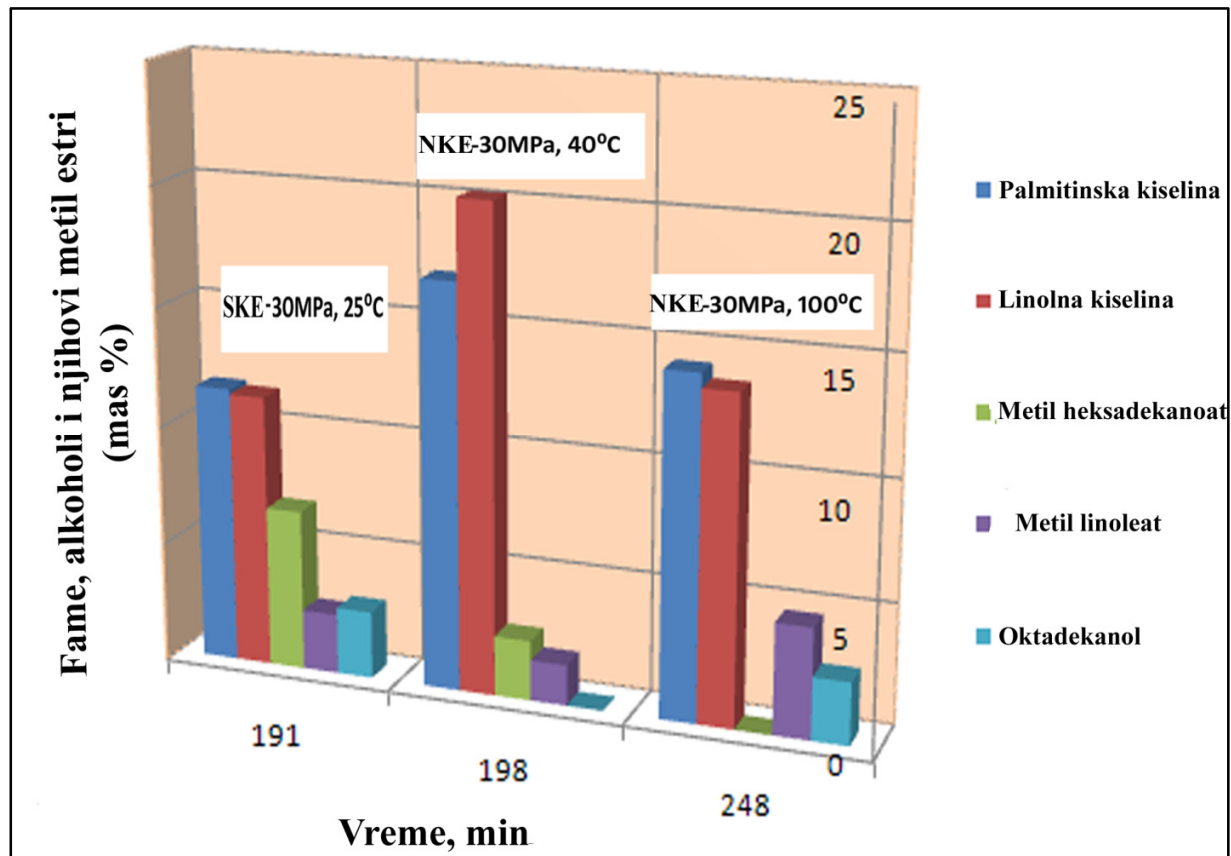
Slika 29. Sastav etarskog ulja i ekstrakata dobijenih HD, prvom frakcijom

NKE, drugom frakcijom SKE ili NKE

Na slici 29 se zapaža da je udeo monoterpena (26,4%) i seskviterpena (45,5%) najveći u etarskom ulju dobijenim HD, u poređenju sa udelom monoterpena i seskviterpena dobijenih SKE (16,2%) i (28,9%) i NKE (10,8-16,5%) i (2,6-30,9%), retrospektivno. Udeo FAME (11,6-17,5%), diterpena (3,9-6,3%) i voskova (14,1-30,9%) znatno je veći u ekstraktima dobijenim SKE i NKE, u odnosu na etarska ulja dobijena HD (5,3%), (4,8%) i (1%), retrospektivno. Iz profila hemijskog sastava ekstrakata dobijenih SKE, može se zaključiti da su najpribližniji sastavu etarskog ulja dobijenog HD po udelu monoterpena (16,2%) i seskviterpena (28,9%), ali po udelu FAME (35%), diterpena (4,1) i voskova (14,1%), takođe, imaju sastav približan ekstraktima dobijenim NKE. Udeo FAME u ekstraktima dobijenim SKE i NKE je znatno veći (30,9-41,3%) u odnosu na njihov sastav u etarskom ulju dobijenim HD (5,3%). Po udelu monoterpena i seskviterpena i

frakcija NKE na 10MPa i 40°C od 41,7% najpribližnija je, pored SKE sa njihovim udelom od 45,1%, sastavu etarskog ulja dobijenog HD (71,9%).

Udeo nezasićenih masnih kiselina, njihovih metil estara i alkohola u dobijenim ekstraktima druge frakcije predstavljen je na slici 30.



Slika 30. Udeo nezasićenih FA, FAME i alkohola u dobijenim ekstraktima druge frakcije u zavisnosti od procesnih uslova SKE ili NKE

Na osnovu profila FAME u ekstraktima dobijenim u drugoj frakciji SKE na 30 MPa i 25 °C, i NKE na 30 MPa, i temperaturama od 40 °C i 100 °C, može se uočiti najveći udeo palmitinske (11,6-16,9 %) i linolne kiseline (11,4-20,2 %) u dobijenim ekstraktima, pri čemu je njihov udeo bio najznačajniji na NKE pri 30 MPa i 40 °C, 16,9 % i 20,2 %, retrospektivno.

4.1.3. Rezultati modelovanja procesa ekstrakcije sa ugušćenim ugljenik(IV)- oksidom

U ovom delu prikazani su rezultati ispitivanja kinetike procesa NKE kojima su izolovani ekstrakti sa jakim antioksidativnim dejstvom iz matičnjaka. Za analizu kinetike NKE procesa korišćen je model Sovove u cilju određivanja rastvorljivosti ekstrakata matičnjaka u NKE-CO₂ i definisanja koeficijenta prenosa mase, koji određuju prinos i brzinu ekstrakcije.

Za izračunavanje parametara modela prema jednačinama (34) – (41) potrebni su sledeći podaci za biljni materijal: veličina čestice, masa uzorka, glavna komponenta ekstrakta (pseudokomponenta). Podaci koji predstavljaju karakteristike NK CO₂ i njegovog protoka kroz ekstraktor su: protok NKCO₂, površinska brzina kroz sloj biljnog materijala, gustina i viskoznost zajedno sa binarnom difuzivnosti sistema ulje/CO₂, odnosno pseudokomponenta/CO₂ (Tabela 11).

Tabela 11. Podaci za izračunavanje parametara modela.

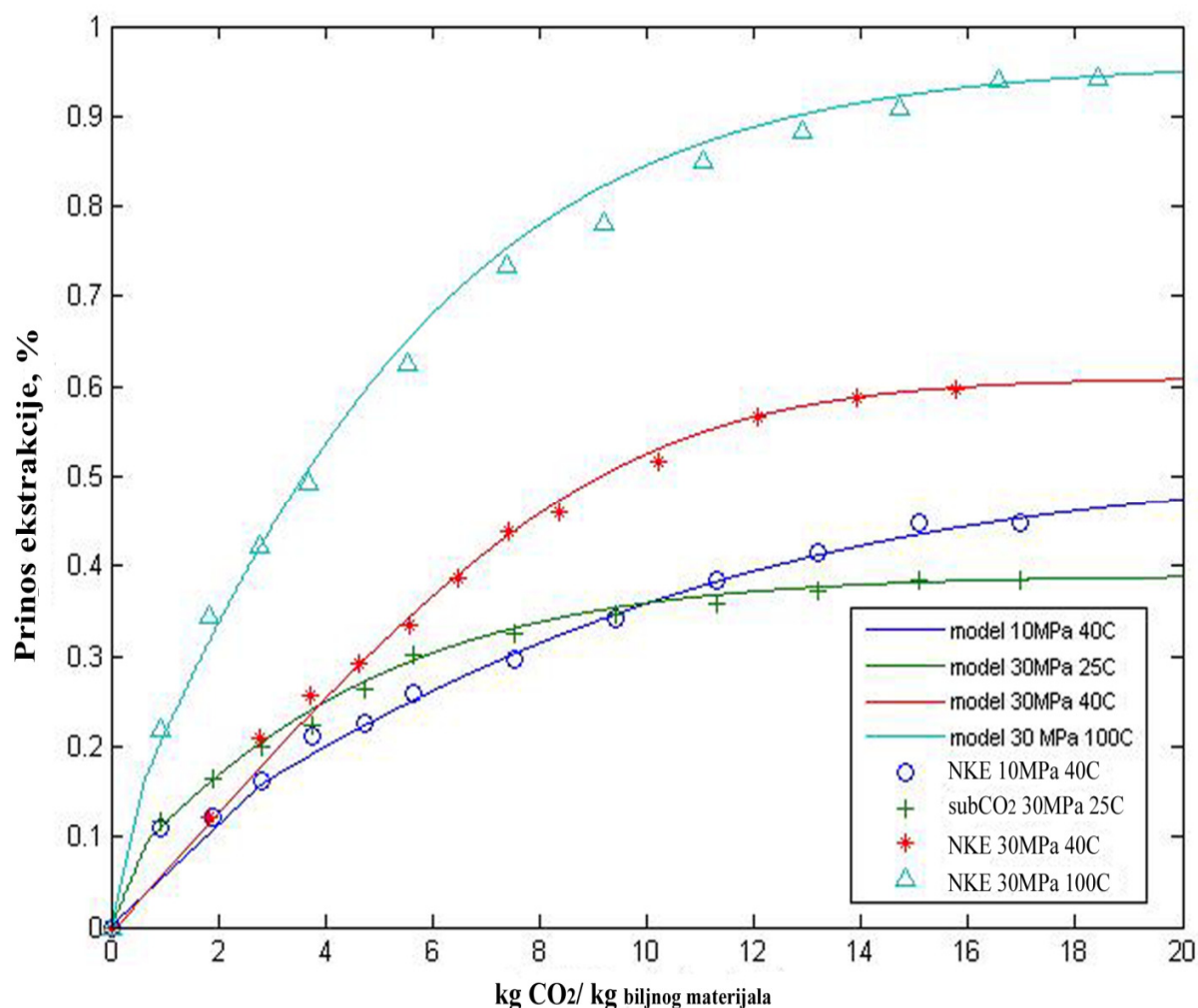
Frakcija	P (MPa)/ t (°C)	Protok CO ₂ (cm ³ /s)	Površinska brzina*10 ⁵ (m/s)	Viskoznost CO ₂ *10 ⁷ (Pa*s)	D ₁₂ *10 ⁹ (m ² /s)
I	10 / 40	0,274	17,21	5,483	15,354
II/1	30 / 25	0,0833	5,239	7,524	6,552
II/2	30 / 40	0,0702	4,412	7,259	7,923
II/3	30 / 100	0,101	6,328	6,287	16,93

Vrednosti Reynolds-ovog, Schmidt-ovog i Sherwood-ovog broja potrebne za izračunavanje koeficijenta prenosa mase u filmu oko čestice, k_f za sistem pseudokomponenta/CO₂ prikazane su u tabeli 12. Prikazane su izračunate prema jednačini (34) vrednosti parametra modela k_f takođe.

Tabela 12. Vrednosti Reynolds-ovog, Schmidt-ovog, Sherwood-ovog broja i k_f .

Frakcija	P (MPa)/ t (°C)	Re	Sc	Sh	$k_f \cdot 10^6$ (m/s)
I	10 / 40	79,003	0,057	0,542	20,791
II/1	30 / 25	26,928	0,189	0,502	8,217
II/2	30 / 40	22,135	0,101	0,448	8,865
II/3	30 / 100	26,669	0,056	0,389	16,487

Na slici 31 grafički su prikazane eksperimentalne ekstrakcione krive: udeo ekstrakta u zavisnosti od specifičnog utroška rastvarača (kg CO₂/ kg uzorka biljnog materijala) i modelom Sovove izračunate ekstrakcione krive za NKE dve frakcije etarskih ulja i sekundarnih metabolita iz matičnjaka. Udeo totalnog ekstrakta (etarsko ulje ili antioksidativna frakcija) dat je u odnosu na masu nerastvorljive čvrste faze biljnog materijala.



Slika 31. Poređenje izračunatih i eksperimentalnih ekstrakcionih krivih NKE matičnjaka na različitim uslovima ekstrakcije

Na ekstrakcionim krivama (slika 31) uočava se period brze ekstrakcije u kome brzina procesa limitirana rastvorljivošću ekstrakta u NK CO₂ i period spore ekstrakcije u kome je proces limitiran difuzijom unutar čestica. Ekstrakcione krive NKE obe frakcije imale su sličan oblik. Najveći uticaj na izgled ekstrakcione krive tokom eksperimenta imali su pritisak i temperatura.

Kriva u prvom periodu ekstrakcije ima pravolinijsku zavisnost što ukazuje na proporcionu zavisnost prinosa od ravnotežne rastvorljivosti. Rastvorljivost je uslovljena pritiskom i temperaturom pa se promena ovih veličina odražava najviše na prvi period

ekstrakcije. Može se primetiti da ekstrakcija u slučaju druge frakcije traje duže nego u slučaju ekstrakcije etarskog ulja.

Iz nagiba se može uočiti manja rastvorljivost sekundarnih metabolita antioksidativne frakcije u odnosu na etarska ulja na istoj temperaturi. Ekstrakciona kriva za prvu frakciju na 10 MPa/40 °C prikazala je postojanje dva perioda ekstrakcije; prvi je bio inicijalni i brz proces ekstrakcije limitiran rastvorljivošću lako dostupnog rastvorka; dok je drugi proces ekstrakcije bio determinisan difuzijom rastvoraka iz dubljeg dela matriksa biljnog materijala, predstavljajući sporiji proces ekstrakcije. Slična tendencija perioda ekstrakcije se pokazala i kod druge frakcije izolovane na 30 MPa/25 °C, ali je izraženost u nagibu krivih bila znatno manja kod ekstrakcija na istom pritisku (30 MPa), ali višim temperaturama (40 °C and 100 °C). Linije koje su predstavljale kratak inicijalni period ekstrakcije, prve i druge frakcije ekstrakcije, su bile linearne potvrđujući brzu ekstrakciju determinisanu primenjenim uslovima pritiska i temperature (jednačina 23). Etarsko ulje se izolovalo u prvoj frakciji na srednjim uslovima ekstrakcije i za kratko vreme ($P < 15$ MPa; 35-40 °C; 4 h). Za ekstrakciju druge frakcije je bilo potrebno duže vreme jer je izolacija antioksidativnih metabolita koji su skladišteni dublje u biljnom matriksu sporija. Rastvorljivost ekstrakata u $nkCO_2$ sekundarnih metabolita se mogla izračunati iz nagiba linija u inicijalnom periodu ekstrakcije.

Parametri modela Sovove dobijeni simulacijom eksperimentalnih rezultata prikazani su u tabeli 13. Početna pretpostavka za koeficijent prenosa mase kroz čvrstu fazu jeste da je približno jednak koeficijentu prenosa mase blizu površine čestica. Model je korišćen za izračunavanje ekstrakcione krive i poređenje iste sa eksperimentalnim rezultatima. Optimizacija gore pomenutih parametara se vrši podešavanjem ekstrakcione krive kako bi se što bolje poklopila sa eksperimentalnim vrednostima u periodu spore ekstrakcije, gde je k_s najuticajniji. Ravnotežni podaci se pretpostavljaju iz nagiba ekstrakcione krive u periodu brze ekstrakcije jer je prenos mase u tom periodu određen preko rastvorljivosti. Pod pretpostavkom da je tokom eksperimenta ekstrahovano celokupna količina ulja, x_0 se dodeljuje vrednost krajnjih eksperimentalno dobijenih prinosa koji dostižu maksimum pri kraju eksperimenta. Koncentraciji pri kojoj je iscrpljeno lako dostupno ulje, x_k , pretpostavlja se vrednost približna preostaloj količini nakon kraja prvog perioda ekstrakcije. U tabeli 13 su prikazane optimizovane vrednosti parametara zajedno sa standardnom devijacijom eksperimentalnih ekstrakcionih udela i izračunatih udela modelom Sovove, σ (jednačina 32). Matematički model Sovove je uspešno simulirao

eksperimentalne rezultate na datim uslovima (slika 28), pri čemu je **Standardna devijacija** bila reda veličine 10^{-4} - 10^{-5} (tabela 13).

Tabela 13. Optimizovane vrednosti parametara modela Sovove iz 1994 godine

Frakcija	Pritisak, temperatura	Optimizovane vrednosti				Standardna devijacija, $\sigma \cdot 10^{-4}$
		$k_s \cdot 10^8$	y_r	x_0	x_k	
I	10 MPa / 313 K	3,53	0,00056	0,0051	0,0042	1,876
II/1	30 MPa / 298 K	2,75	0,0014	0,0039	0,0032	0,7069
II/2	30 MPa / 313 K	3,11	0,0007	0,0061	0,0064	1,321
II/3	30 MPa / 373 K	2,02	0,0026	0,0096	0,0085	1,607

Najveći prenos mase je definisan pri NKE prve frakcije na 10 MPa/40 °C u poređenju sa prenosom mase određenim na 30 MPa i različitim temperaturama (25-100 °C). Koeficijent prenosa mase u čvrstoj fazi niži je od koeficijenta prenosa mase u natkritičnoj fazi.

Koeficijent prenosa mase u čvrstoj fazi kod NKE prve frakcije ukazao je na bolju dostupnost lakših komponentata natkr. fluidu. odnosu na sekundarne metabolite antioksidativne frakcije usled razlike molekulskih masa supstanci i skladištima u biljnoj strukturi, kako potvrđuju eksperimentalna istraživanja-referenca. Optimizovane vrednosti raspoloživog ekstrakta ne odstupaju mnogo od pretpostavljenih, što se ne može reći o teže dostupnom rastvoru. Na osnovu ovog modela prelazna oblast je uprošćena zamišljenom granicom koja ne postoji, jer se u realnosti prenos mase u natkritičnoj i čvrstoj fazi odigrava istovremeno celom dužinom ekstraktora. Prema tome x_k je moguće samo optimizovati, a ne tačno odrediti. Određena je rastvorljivost rastvoraka koja je približno ista kao i vrednost dobijena iz nagiba krive dobijene ekstrakcijom mlevenog biljnog materijala, što pokazuje da mlevenjem biljnog materijala dolazi do približno ravnotežnih uslova na početku ekstrakcije.

Frakcije sa izraženijim antioksidativnim dejstvom su izolovane tokom druge frakcije na procesnim uslovima od 30 MPa i temperaturama od 25 °C, 40 °C and 100 °C. S obzirom da su

antioksidativne frakcije je izolovane na istom pritisku, a različitim temperaturama, može se diskutovati i o uticaju temperature na ravnotežnu rastvorljivost sekundarnih metabolita u NK-CO₂. Uticaj temperature na izolaciju antioksidativne frakcije može se uporediti sa rastvorljivošću rastvoraka antioksidativne frakcije u natkritičnom fluidu (y_r). Uočava se prema podacima iz tabele 13. da je $y_r(T_2, p) > y_r(T_1, p)$ za $T_2 > T_1$, pri natkritičnim uslovima. Rastvorljivost u NK-CO₂ raste sa povećanjem temperature od 40 °C do 100 °C na istom pritisku (30 MPa) usled porasta napon pare koji ima veći od efekta smanjenja . gustine CO₂ (646 kg/m³ u odnosu na 929 kg/m³ na 100 °C i 40 °C, respektivno). Parametar rastvorljivosti y_r , za supkritičnu ekstrakciju primenjenu u drugom stepenu frakcije je bio između vrednosti determinisanih na 30 MPa i 40 °C i 30 MPa i 100 °C, kao što je prikazano u tabeli 13. Pri gustini supkritičnog CO₂ od 966,4 kg/m³ rastvorljivost ekstrakta je bila veća nego na istom pritisku na 40 °C, ali manja od vrednosti na 100 °C. U isto vreme ukoliko bi sastav ekstrakata bio isti, mogla bi se očekivati manja vrednost rastvorljivosti u odnosu na definisanu 30 MPa i 40 °C. Ekstrakt dobijen drugom frakcijom subkritične ekstrakcije na 30 MPa i 25 °C je sadržao veće količine lakših komponenti (45,1% monoterpena i seskviterpena) nego ekstrakt dobijen na 40°C (15,1% monoterpena i seskviterpena). Može se zaključiti da je vrlo mala promena temperature od 25 °C do 40 °C na istom pritisku 30 MPa, uzrokovala nezatno smanjenje u gustini CO₂, koliko je uticaj temperature bio značajan na polarnost CO₂ koja je drastično doprinela razlici u sastavu dobijenih ekstrakata. Sub CO₂ (30 MPa, 25 °C) se pokazao kao bolji rastvarač za ekstrakciju oksigenovanih komponenata, dok je NKE (40 °C) bila poželjnija za izdvajanje težih komponenata (nezasićene masne kiseline i njihovi estri, diterpeni i teži alkoholi, i voskovi).

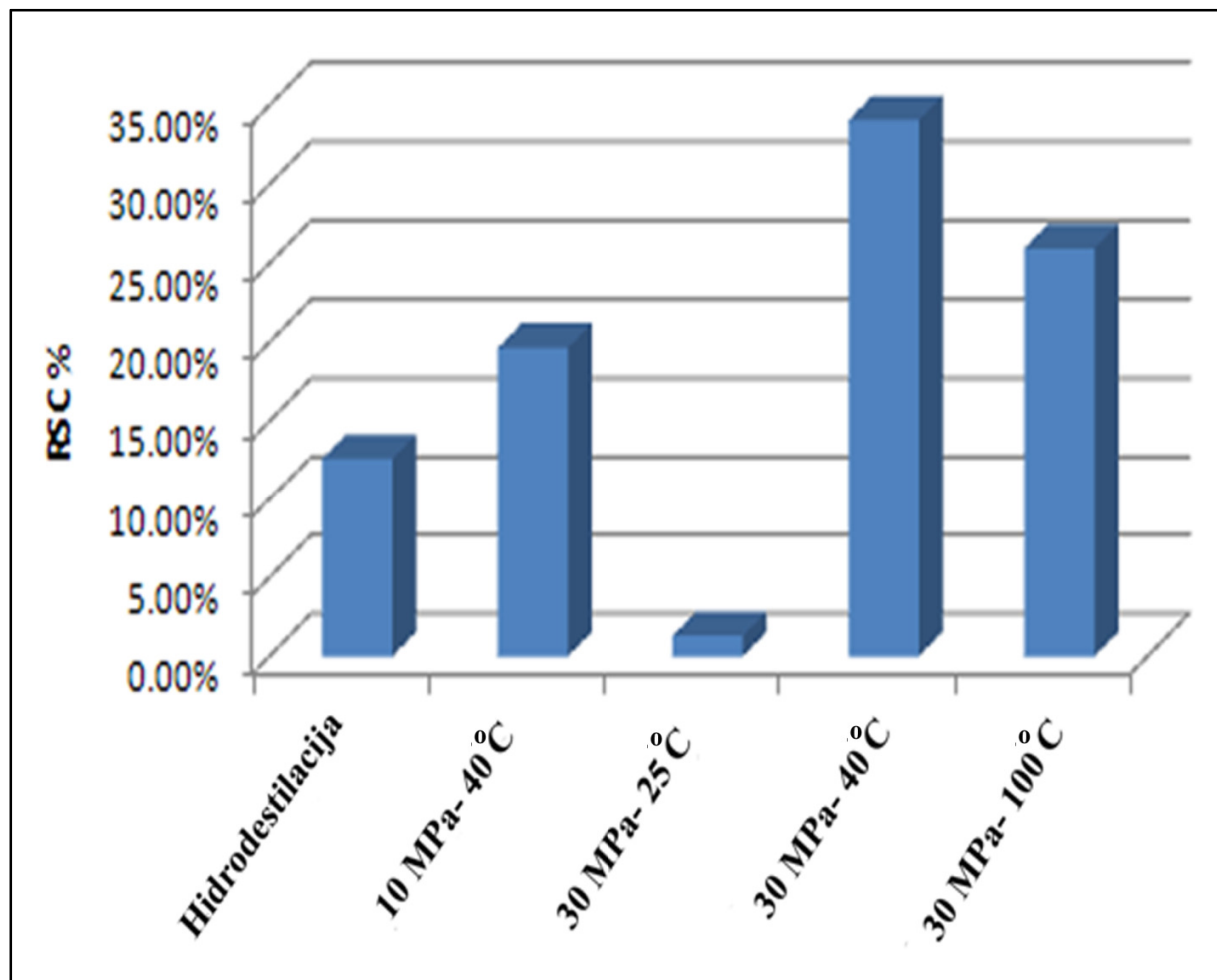
Ekstrakciona kriva izračunata modelom Sovove pokazujala je dobro poklapanje sa eksperimentalno dobijenim krivama ($\sigma \sim 10^{-4} - 10^{-5}$) bez obzira na to što ovaj model ne uzima u obzir interakcija matrice biljnog materijala i rastvorka. Od četiri optimizaciona parametra najbitnija je ravnotežna rastvorljivost kojom se definiše prvi period ekstrakcije, kada se proces odvija pri ravnotežnim uslovima. Na osnovu ekstrakcionih krivih i parametara modela brzo i lako se može doneti zaključak za različite operativne uslove eksperimenta što predstavlja najveću prednost ovog modela.

Sa stanovišta frakcija, koeficijent prenosa mase je veći u slučaju etarskog ulja što potvrđuje da je lakše dostupan u odnosu na sekundarne metabolite antioksidativne frakcije usled

razlike molekularnih masa supstanci i skladištima u biljnoj strukturi, kako potvrđuju eksperimentalna istraživanja.

4.1.4. Određivanje DPPH antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata matičnjaka

Karakterizacija dobijenih ekstrakata matičnjaka dvostepenom frakcionom ekstrakcijom SKE i NKE određivana je funkcionalnom analizom antioksidativne aktivnosti merenjem kapaciteta neutralizacije slobodnih radikala (% RSC). Primenjena metoda DPPH testa određuje antioksidativni kapacitet ekstrakata matičnjaka i omogućava bolje razumevanje hemijskog sastava dobijenih ekstrakata. Antioksidativna aktivnost ekstrakata je determinisana kao sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, korišćenjem DPPH metode, koja se zasniva na doniranju atoma vodonika slobodnim radikalima. Rezultati DPPH testa su izraženi kao % RSC, pri čemu veće vrednosti % RSC pokazuju veću antioksidativnu sposobnost. Antioksidativni kapacitet dobijenih ekstrakata matičnjaka je izražen kapacitet neutralizacije slobodnih radikala. Antioksidativna aktivnost dobijenih ekstrakata je prikazana na slici 32.



Slika 32. Kapacitet ekstrakata matiĉnjaka dobijenih HD, prvom frakcijom NKE na 10 MPa i 40 °C, drugom frakcijom NKE na 30 MPa i 40 °C, 30 MPa i 100 °C, i SKE na 30 MPa i 25 °C da neutrališu slobodne radikale

Pokazalo se da najveći antioksidativni kapacitet pokazuje ekstrakt dobijen drugom frakcijom NKE na 30 MPa i 40°C, zatim ekstrakt izolovan na NKE 30 MPa i 100°C, onda ekstrakt dobijen prvom frakcijom NKE 10 MPa i 40°C, dok je etarsko ulje dobijeno HD i ekstrakt dobijen SKE na 30 MPa i 25°C pokazali najslabiju antioksidativnu aktivnost od dobijenih ekstrakata matiĉnjaka, sa vrednostima neutralizacije slobodnih radikala od 34,1%, 26,0%, 19,7%, 12,6% i 1,3%, respektivno. Antioksidativna aktivnost se najĉešće vezuje za prisustvo i koliĉinu ukupnih fenola u ekstraktima po literaturnim podacima (Mimica-Dukic i sar, 2004; Atanassova i sar, 2011; Miron i sar, 2013; Babovic i sar, 2010; Babovic i Petrovic, 2011; Ćanadanović-Brunet i sar, 2008) pozitivna korelacija izmeĉu izraĉenije antioksidativne

aktivnosti dobijenih ekstrakata matičnjaka i hemijske kompozicije može biti pripisana prisustvu timola i eugenola i većih količina metil estara nezasićenih masnih kiselina (FAME) i njihovih alkohola za razliku od ekstrakata sa manjom antioksidativnom aktivnošću.

4.2. Dobijanje potencijalnih hipolipemičnih ekstrakata iz grčkog semena

4.2.1. Dobijanje ekstrakata bogatih diosgeninom iz grčkog semena

Dobijanje ekstrakata bogatih sadržajem diosgenina iz grčkog semena NKE sa prethodnim predtretmanom odmašćivanja i hidrolizom, imalo je za cilj da obezbedi čistiji ekstrakt bez dodatnih lipidnih komponenata, obogaćen diosgeninom, i kao takvog omogući njegovu efikasniju primenu u funkciji kako hipolipemične aktivnosti, tako i kao steroidnog prekursora.

4.2.1.1. Značaj predtretmana grčkog semena

U ekstraktima dobijenim NKE grčkog semena bez predtretmana (hidrolize) nije identifikovan diosgenina što je u skladu sa postojećim literaturnim podacima (Petit i sar, 1995; Liu i sar, 1995; Merkli i sar, 1997; Taylor i sar, 2000).

Proces odmašćivanja ulja i voskova nije neophodan za dobijanje ekstrakata bogatih diosgeninom, ali ova faza tretiranja grčkog semena je značajna da bi se dobio ekstrakt sa većim udelom diosgenina. Ekstrakti dobijeni NKE bez primenjene hidrolize grčkog semena, sa i bez odmašćivanja su potvrdili ovu tvrdnju, što je prikazano u tabeli 14.

Znatno veći prinos ekstrakta (50-60%) je dobijen iz hidrolizovanog semena bez odmašćivanja na 34 °C i 30MPa ili 20 MPa ($0,068 \text{ g}_{\text{ekstrakta}}/\text{g}_{\text{bm}}$ i $0,028 \text{ g}_{\text{ekstrakta}}/\text{g}_{\text{bm}}$, respektivno) u odnosu na ekstrakt dobijen iz hidrolizovanog semena sa odmašćivanjem ($0,061 \text{ g}_{\text{ekstrakta}}/\text{g}_{\text{bm}}$ i $0,022 \text{ g}_{\text{ekstrakta}}/\text{g}_{\text{bm}}$). Sličan efekat je prikazan i u ekstraktima dobijenim NKE na 25MPa i 40 °C i za različito vreme ekstrakcije: $0,081 \text{ g}_{\text{ekstrakta}}/\text{g}_{\text{bm}}$ za ekstrakt bez odmašćivanja i $0,071 \text{ g}_{\text{ekstrakta}}/\text{g}_{\text{bm}}$ za ekstrakt sa primenjenim odmašćivanjem. Veći prinos diosgenina od 60-100% ($\text{mg}_{\text{diosgenin}}/\text{g}_{\text{bm}}$) je ostvaren iz grčkog semena sa predtretmanom hidrolize, kojoj prethodi odmašćivanje ($0,56-1,36 \text{ mg}_{\text{diosgenin}}/\text{g}_{\text{bm}}$) u odnosu na ekstrakte dobijene NKE samo sa hidrolizom od predtretmana ($0,36-0,80 \text{ mg}_{\text{diosgenin}}/\text{g}_{\text{bm}}$). Prema pokazanim rezultatima, primena odmašćivanja kao predtretmana grčkog semena, iako postiže prinos diosgenina nešto niži nego u

ekstraktima dobijenim bez odmašćivanja, primenjen je kao optimalniji način iz razloga što omogućava dobijanje prečišćenijih ekstrakata sa udelom diosgenina iz hidrolizovanog grčkog semena.

Tabela 14. Prinos totalnog ekstrakta i diosgenina u ekstraktu dobijenom NKE u zavisnosti od predtretmana

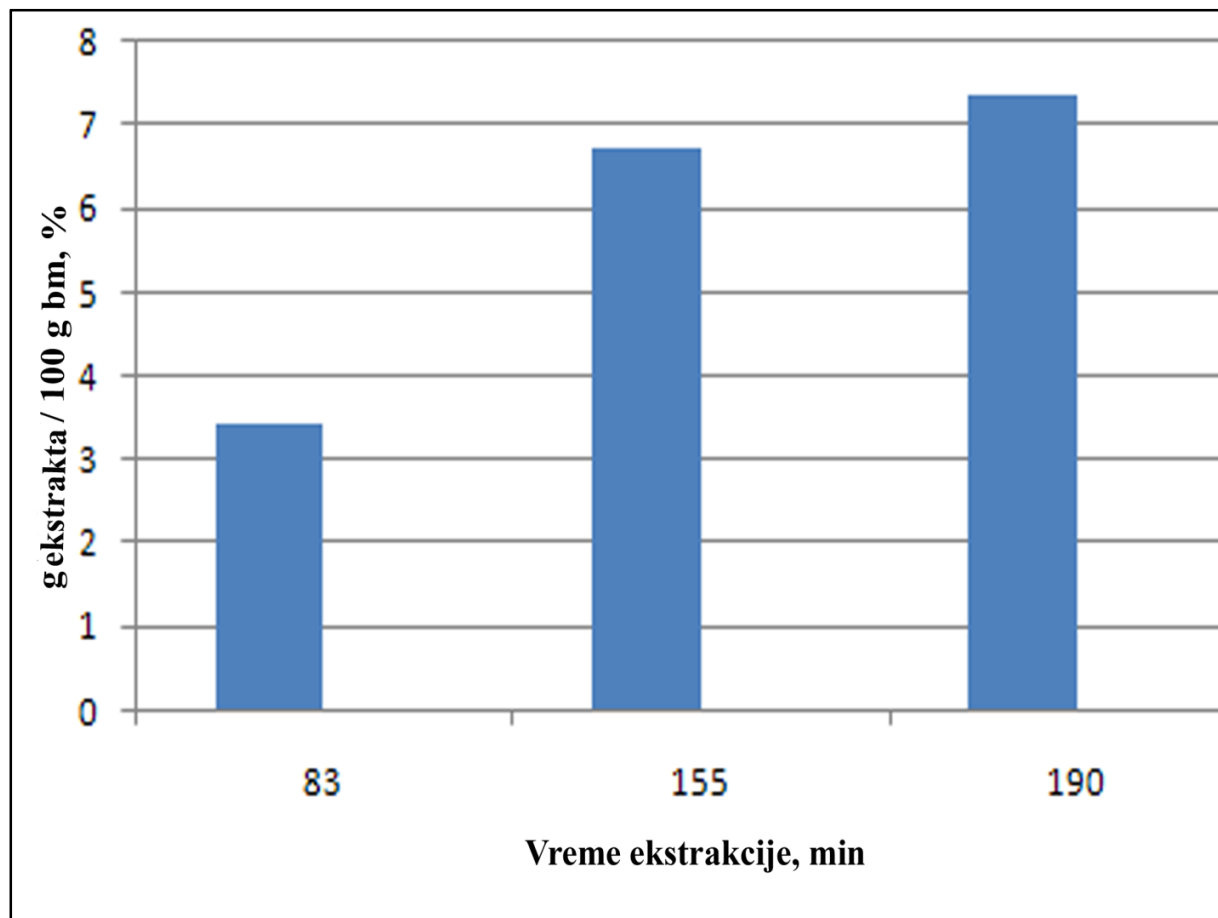
Uslovi NKE	Prinos totalnog ekstrakta (g _{ekstrakta} /g _{bm})		Prinos diosgenina (mg _{diosogenin} /g _{bm})	
	Bez odmašćivanja +hidroliza	Sa odmašćivanjem +hidroliza	Bez odmašćivanja +hidroliza	Sa odmašćivanjem +hidroliza
34°C i 30MPa	0,068	0,061	0,72	0,44
34°C i 20MPa	0,028	0,022	0,56	0,36
40°C i 25MPa	0,081	0,071	1,36	0,80

4.2.1.2. Preliminarna analiza procesnih parametara na prinos ekstrakta i diosgenina

Preliminarna analiza uticaja procesnih uslova NKE, pritiska i temperature kroz gustinu CO₂ dala je uvid na prinos ekstrakta iz grčkog semena. Razmatranje uticaja utrošenog CO₂ tokom ekstrakcije kao vremena ekstrakcije je takođe doprineo preliminarnoj analizi procesnih uslova NKE.

Uticaj vremena trajanja ekstrakcije na prinos ekstrakcije i sastav diosgenina

Prikazano je da veći prinos totalnog ekstrakta može biti ostvaren kada se vreme trajanja procesa ekstrakcije povećava od 83 min, što je predstavljalo utrošen NK CO₂ od 11 g_{CO2}/g_{bm}, do 155 min, 20 g_{CO2}/g_{bm} utrošenog NK CO₂ prema biljnom materijalu. Uticaj vremena trajanja ekstrakcije, odnosno količine utrošenog NK CO₂ po masi biljne sirovine u procesu ekstrakcije je predstavljen na slici 33.

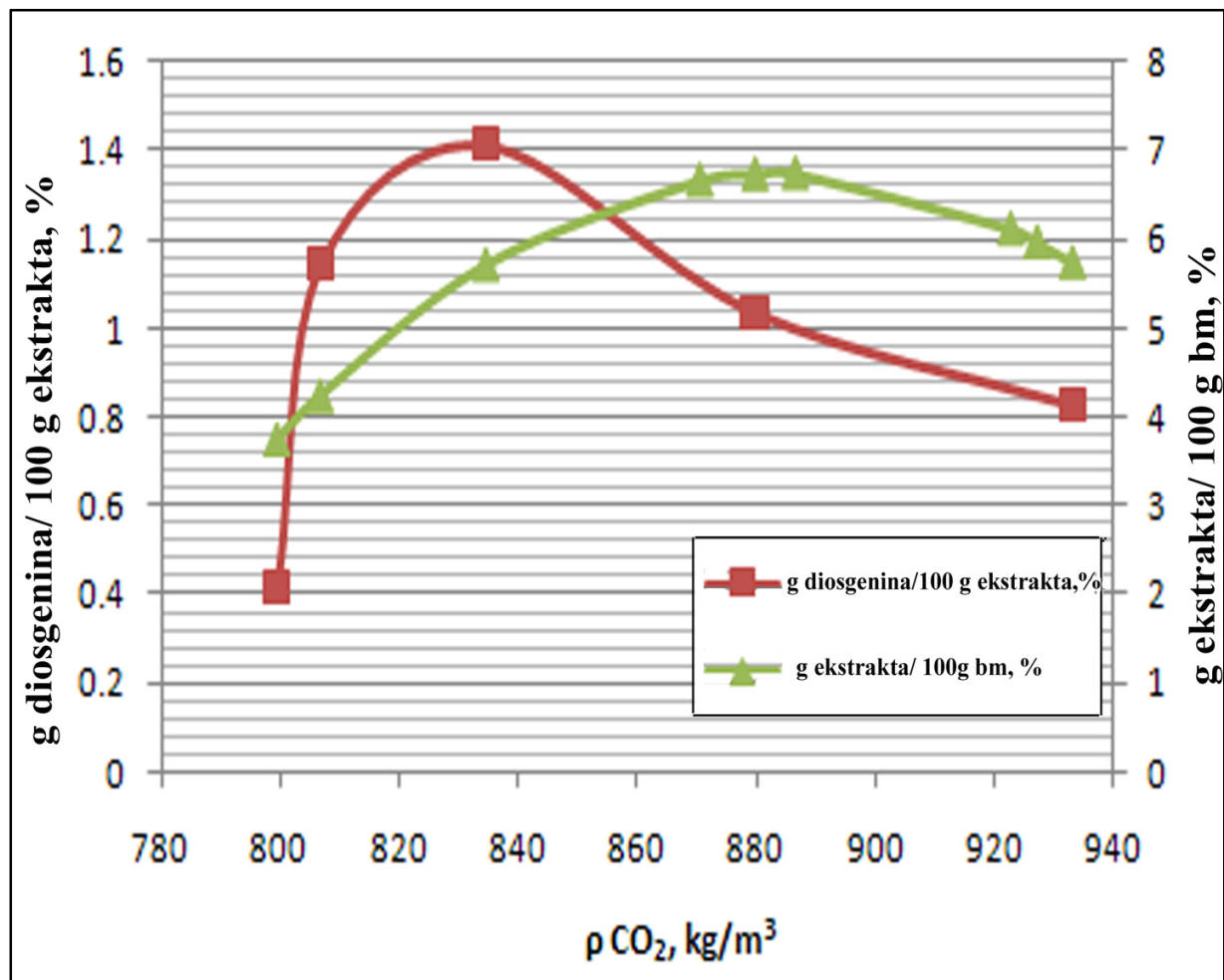


Slika 33. Prinos totalnog ekstrakta u funkciji vremena trajanja ekstrakcije

Dužom ekstrakcijom (155-190 min) ostvaren je duplo veći prinos u poređenju sa ekstrakcijom nakon 83 min. NKE na 190 min postignut je mali diferencijalni prinos ekstrakta na odnosu na 155 min (10%). U daljim eksperimentima, vreme NKE na 155 min (količinu utrošenog NK CO₂ od 20 g_{CO2}/g_{bm}) je uzeto kao orijentaciono za dalju analizu prinosa ekstrakta kao i sadržaja diosgenina na različitim gustinama CO₂ (800-930 kg/m³).

Uticaj gustine NK CO₂ na prinos ekstrakcije i sastav diosgenina

Prinosi ekstrakata kao i udeli diosgenina u ekstraktu su definisani na različitim gustinama NK-CO₂, što je prikazano na slici 31.



Slika 34. Prinos totalnog ekstrakta i udeo diosgenina u totalnom ekstraktu kao funkcija gustine NK-CO₂, za vreme trajanja ekstrakcije od 155 min, masa grčkog odmašćenog i hidrolizovanog semena je bila 40g ±10%; protok NK-CO₂ kroz ekstraktor je bio 0,35 kg/h ±5%.

Na gustini preko 830 kg/m³ prinos je bio iznad 6% a već sa porastom gustine na 880 kg/m³ ostvaren je maksimalni prinos totalnog ekstrakta (aproksimativno 7%). Iako se na osnovu ovoga već može pretpostaviti da se maksimalne veličine prinosa kao i udela diosgenina u njemu mogu postići na gustini od otprilike 880 kg/m³, mnogo relevantnije je poći od pretpostavke da se povećanje prinosa postiže na vrednostima gustina 830 kg/m³ i da povećanjem gustine iznad 880 kg/m³ prinos povećava između 6% i 7%.

Na osnovu rezultata ovih preliminarnih istraživanja, sa manjim brojem eksperimenata, određeni su radni uslovi pritiska i temeprature, u vidu gustine NK-CO₂ iznad 830-840 kg/m³ na

kojima se mogu definisati optimalni uslovi za izolovanje diosgenina iz grčkog semena. Ove pretpostavke izvedene iz preliminarne analize eksperimenata na istom ekstrakcionom vremenu (155 min), su dalje precizirane i detaljnije analizirane primenom većeg broja eksperimenata na različitim pritiscima, temperaturama (gustine NK-CO₂), kao i utroška NK-CO₂ (trajanja ekstrakcije) primenom RSM i CCRD metodologije.

4.2.1.3. Definisanje optimalnih parametara NKE grčkog semena za dobijanje ekstrakata bogatih diosgeninom

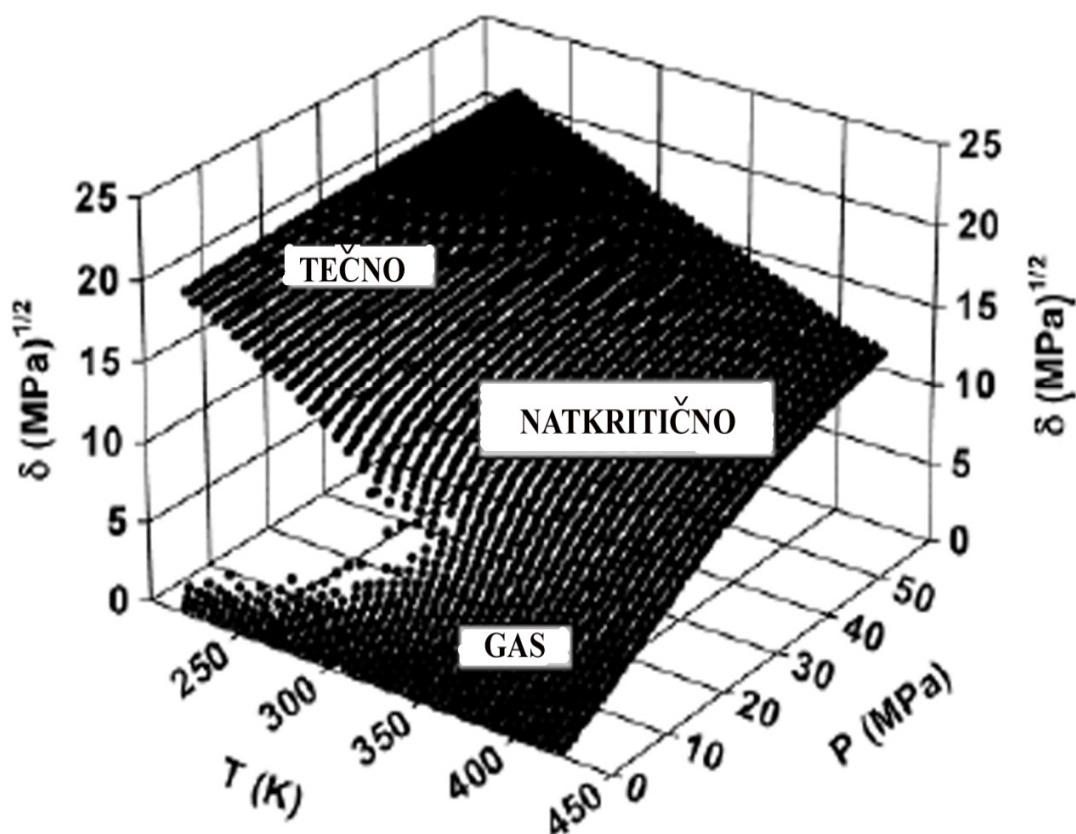
Preliminarnim istraživanjem određeni su radni uslovi pritiska i temperature u vidu opsega gustina između 830 i 880 kg/m³. Izbor parametara pritiska (X_1) i temperatura (X_2) je definisao malu razliku u gustinama. Povećanjem pritiska NKE povećava se gustina fluida i raste moć rastvaranja, dok se povećanjem temperature povećava napon pare određenih komponenata. Prema molarnoj masi diosgenina, nije se mogao očekivati veći uticaj temperature s obzirom da ima mali napon pare, pa je analiza RSM bila od interesa da utvrdi uticaj temperature (X_2) kao jednog od parametara čiji je uticaj bitan za sadržaj diosgenina u ekstraktu iz grčkog semena.

Na osnovu preliminarnih istraživanja sa formiranim ospegom radnih uslova, primenom odgovarajućeg seta eksperimenata po RSM i CCRD dizajnu, istraživani su uticaji različitih parametara pritiska, temperature i količine utrošenog NK-CO₂ na prinos totalnog ekstrakta i udeo diosgenina u njemu. Primenom seta kodiranih i nekodiranih promenljivih primenjenih u eksperimentalnoj matrici, po formiranom dizajnu eksperimenata, izvršena je RSM i CCRD analiza procesnih uslova na totalni prinos ekstrakta i izolovanje diosgenina.

Kombinacijom pritiska i temperatura iz seta eksperimenata formirane matrice, opseg gustina primenjenih eksperimenata se kretao između 800 to 930 kg/m³, obuhvatajući opseg radnih uslova gustine NK-CO₂ definisanim u preliminarnom istraživanju.

Temperatura od 40 °C je definisana kao centralna tačka u matrici eksperimenata, sa opsegom primenjenih vrednosti od ±10°C. Iako je temperatura od 30°C bila veoma blizu, ali ispod kritične tačke NK-CO₂ ($T_{cr}=31^\circ\text{C}$), primenjeni uslovi su definisani kao subkritični uslovi CO₂ na povišenom pritisku, s obzirom da je pritisak bio iznad kritične vrednosti ($P_{cr}=7,38\text{ MPa}$). Utvrđivanjem gustine na ovim subkritičnim uslovima na povišenom pritisku CO₂, utvrđeno je da

je gustina fluida znatno veća nego za NK-CO₂, ali da je moć rastvaranja bila slabija, što se objašnjava dijagramom parametra rastvorljivosti za različita stanja gasa, tečnosti i natkritičnog CO₂ prikazanog na slici 35 (Williams i sar, 2004).



Slika 35. Parametar rastvorljivosti CO₂ za različite faze stanja

Dizajn eksperimenata je primenjen sa tri nezavisne promenljive što je rezultiralo sa ukupno 20 eksperimenata. Rezultati dobijenih prinosa totalnog ekstrakta i udela diosgenina u odnosu na primenjene uslove matrice eksperimenata tri nezavisne promenljive (pritiska, temperature i utrošenog NK-CO₂) dati su u tabeli 15.

Tabela 15. Prinos totalnog ekstrakta i diosgenina dobijenog NKE grčkog semena

Run	X ₁ [MPa]	X ₂ [°C]	X ₃ [gCO ₂ /g _{bm}]	Prinos totalnog ekstrakta (g _{ekstrakta} /g _{bm})	Prinos diosgenina (mg _{diosgenin} /g _{bm})
1	30	46	25	0,0988	0,6892
2	30	46	15	0,0837	0,5366
3	30	34	25	0,0825	0,5493
4	30	34	15	0,0611	0,5096
5	20	46	25	0,0522	0,5071
6	20	46	15	0,0414	0,4638
7	20	34	25	0,0500	0,5072
8	20	34	15	0,0227	0,3589
9	33,4	40	20	0,0487	0,2229
10	16,6	40	20	0,0417	0,2141
11	25	50	20	0,0637	0,8083
12	25	30	20	0,0723	0,7958
13	25	40	28,41	0,0738	0,7655
14	25	40	11,59	0,0505	0,4380
15	25	40	20	0,0718	0,7828
16	25	40	20	0,0738	0,7872
17	25	40	20	0,0735	0,7971
18	25	40	20	0,0794	0,7880
19	25	40	20	0,0787	0,7822
20	25	40	20	0,0776	0,7917

Kao što je prikazano u tabeli 15, količina dobijenog ekstrakta koja se dobija iz tretiranog grčkog semena prethodnim odmaščivanjem i hidrolizom koja se mogla postignuti na primenjenim procesnim uslovima je bila od 0,214 mg_{diosgenin}/g_{bm} do 0,792 mg_{diosgenin}/g_{bm}, ili od 0,021% do 0,079%. Dobijeni rezultati su u rasponu sa literaturnim podatkom mikrotalasne ekstrakcije diosgenina iz grčkog semena od 0,097% do 0,159% (Kaufmann i sar, 2007).

Poređenje dobijenih ekstrakata i prinosa diosgenina je moguće sa podatkom natkritične ekstrakcije diosgenina iz *T. terrestris* (Ghoreishi i sar, 2012). Autori su prinos diosgenina u svom istraživačkom radu definisali “diosgenin recovery” definisan kao odnos prinosa ekstrakta dobijenog natkritičnom ekstrakcijom sa prinosom ostvrenim primenom klasične Sokslet ekstrakcije. Njihovi postignuti rezultati “diosgenin recovery” iz *T. terrestris* je bio od 20,7% do 84,2%, dok su vrednosti za diosgenin recovery izolovanja diosgenina iz grčkog semena bili od 11,3% do 42,7% što je definisano na osnovu našeg istraživanja. Za razliku od prethodnih literaturnih podataka o istraživanju izolovanja diosgenina mikrotalasnom ekstrakcijom iz grčkog semena, ili pak izolovanjem natkritičnom ekstrakcijom iz *T. Terrestris*, samo u slučaju našeg istraživanja izolovanja diosgenina iz grčkog semena primenjeni su predtretmani semena odmašćivanja .

4.2.1.4. RSM-CCRD analiza procesnih parametara na prinos ekstrakcije i sastav diosgenina

Efekat pritiska, temperature i utroška količine CO₂ na prinos diosgenina je definisan kvadratnom jednačinom u funkciji ovih procesnih parametara prikazanim u jednačini (50):

$$Y = +0,79 + 0,034X_1 + 0,021X_2 + 0,072X_3 - 0,20X_1^2 + 0,001564X_2^2 - 0,064X_3^2 + 0,007762X_1X_2 + 0,0000875 X_1X_3 + 0,0009875X_2X_3 \quad (50)$$

Gde je Y prinos diosgenina [mg diosgenin/g biljnog materijala], a nezavisne promenljive su: X₁, pritisak [MPa], X₂ temperatura [°C], i, X₃ količina utrošenog NK CO₂ [gCO₂/g_{bm}].

Primenom analize ANOVA determinisana je značajnost uticaja procesnih parametara preko određenih koeficijenata na prinos diosgenina. Linearni i kvadratni efekat promenljivih, kao i njihove međusobne interakcije su determinisane preko vrednosti koeficijenata dobijenih analizom ANOVA. Analiza (ANOVA) je omogućila određivanje prediktivnih vrednosti izlazne veličine (Y) iz jednačine (50) kao prinosa diosgenina, koji je predstavljao odnos empirijske

zavisnosti procesnih parametara i prinosa diosgenina i poređenje sa realnim eksperimentalnim rezultatima, radi određivanja statističke preciznosti.

Određeni regresioni koeficijenti analize ANOVA koji su predstavljali značajnost procesnih parametara na prinos diosgenina definisanih u jednačini (50), kao i statistički podaci analize su prikazani u tabeli 16.

Tabela 16. Regresioni koeficijenti kvadratne jednačine za prinos diosgenina

Promenljive	Suma kvadrata	Stepen slobode	Srednji kvadrati	F vrednosti	P vrednosti
X ₁	0,016	1	0,016	5,12	0,0472
X ₂	6,274E-003	1	6,274E-003	2,05	0,1828
X ₃	0,071	1	0,071	23,21	0,0007
X ₁ ²	0,60	1	0,60	197,32	< 0,0001
X ₂ ²	3,524E-005	1	3,524E-005	0,012	0,9167
X ₃ ²	0,059	1	0,059	19,25	0,0014
X ₁ X ₂	4,821E-004	1	4,821E-004	0,16	0,6999
X ₁ X ₃	6,125E-008	1	6,125E-008	2,000E-005	0,9965
X ₂ X ₃	7,801E-006	1	7,801E-006	2,548E-003	0,9607
Model	0,74	9	0,082	26,68	< 0,0001
Lack of fit	0,030	5	6,092E-003	193,22	< 0,0001
Greška	1,577E-004	5	3,153E-005		
Totalna greška	0,77	19			
R ² =0,9600, Adj-R ² =0,9240					

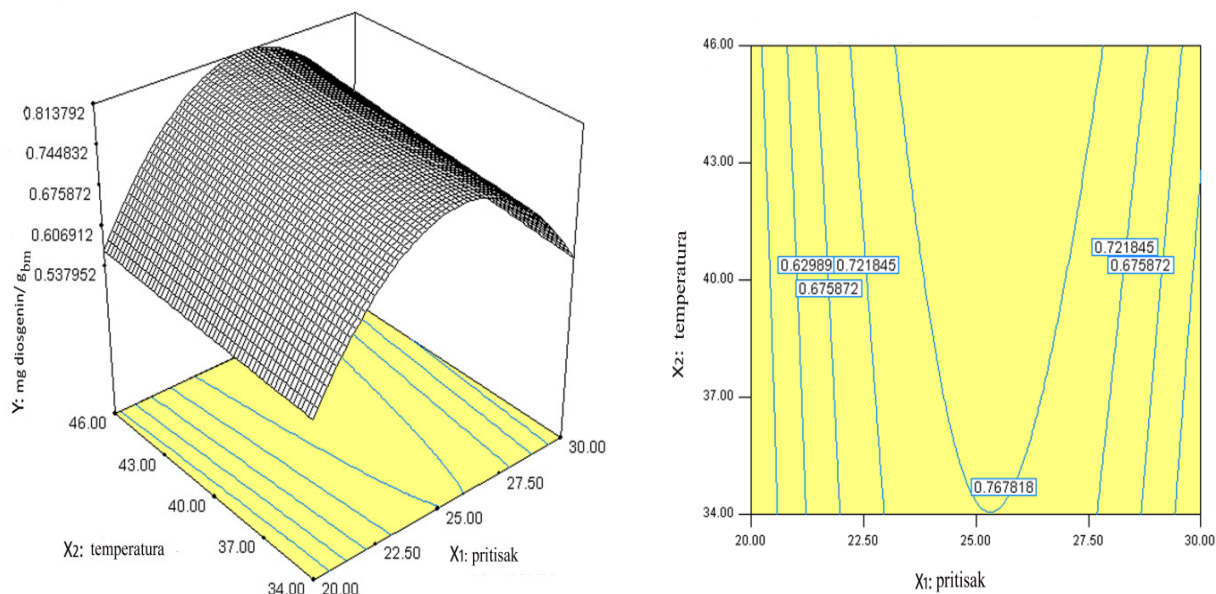
Statističkom analizom ANOVA testa determinisana vrednost R² (0,9233), je pokazala dobro slaganje modela sa eksperimentalnim podacima s obzirom da je njena vrednost veća od 0,8 (Andrich i sar, 2001).

RSM/CCRD analizom uticaja procesnih parametara na prinos diosgenina pokazalo se da je značajan linearni i kvadratni uticaj utrošenog NK CO₂, što se ogleda u vrednosti koeficijenata statističke analize gde je $p < 0,05$. Interakcija procesnih uslova pritiska, temeprature i utrošenog NK CO₂ nije bila od značajnog uticaja na prinos diosgenina. Primenjena RSM analiza je potvrdila rezultate preliminarnih istraživanja i predviđanja, da su pritisak i utrošak NK CO₂, definisani kao X_1 , X_3 , X_1^2 , X_3^2 značajni parametri modela, što ukazuje da determinisanjem ovih nezavisnih promenljivih mogu biti definisani optimalni uslovi za izolovanje diosgenina iz grčkog semena.

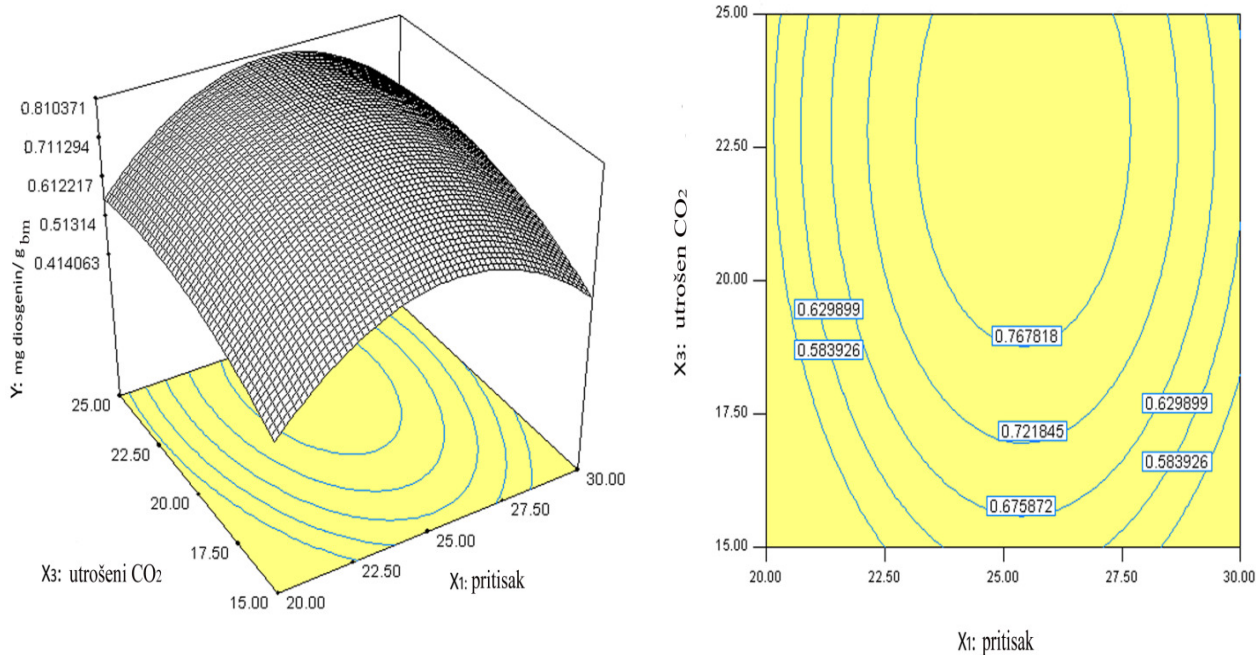
Analiza odzivnih površina 3-D dijagrama

Rezultati RSM analize uticaja analiziranih procesnih parametara na prinos diosgenina prikazani su na slici 36.

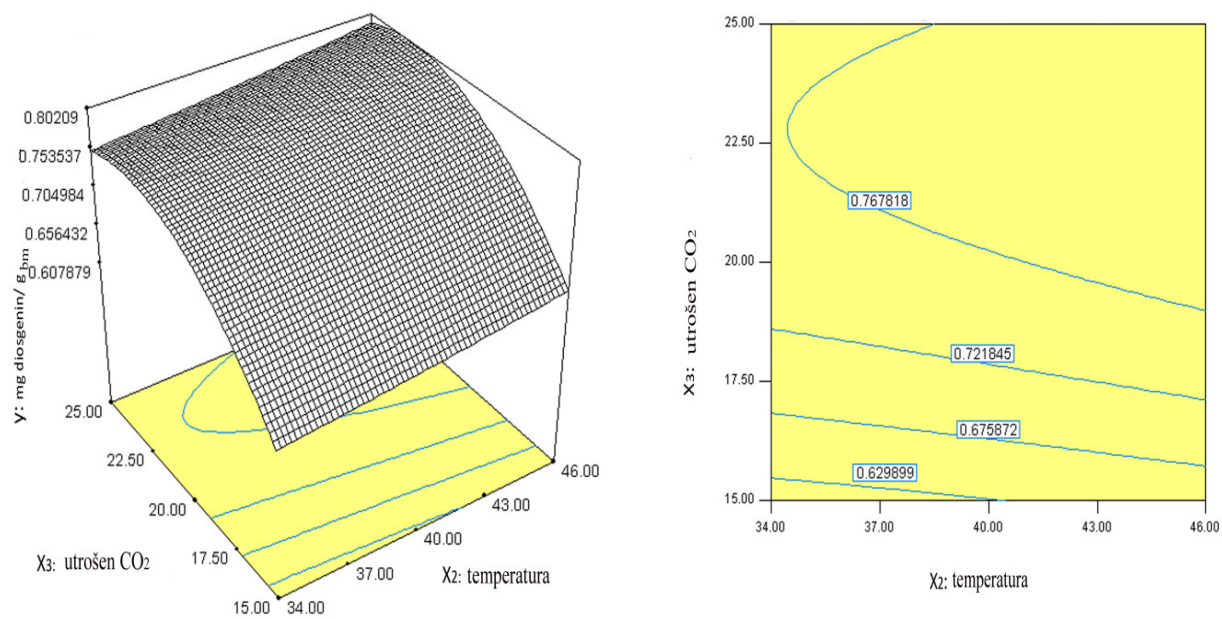
a)



b)



c)



Slika 36. Odzivne površine 3-D prikaza i konturni 2-D grafici za efekat a) temperature i pritiska b) količine utrošenog NK CO₂ i pritiska c) količine utrošenog NK CO₂ i temperature na prinos diosgenina

3-D i 2-D odzivne površine uticaja pritiska i temperature na prinos diosgenina su prikazani na slici 36a. Na slici se zapaža da se prinos diosgenina povećava sa povećanjem pritiska, ali do vrednosti od 25MPa, nakon čega se prinos diosgenina smanjuje sa svakim daljim povećanjem pritiska za bilo koju vrednost temperature. Ovaj prikaz potvrđuje prediktivne tvrdnje preliminarne analize postizanja optimalnog prinosa diosgenina u dobijenim ekstraktima na primenjenim vrednostima gustina u opsegu od 830 do 870 kg/m³.

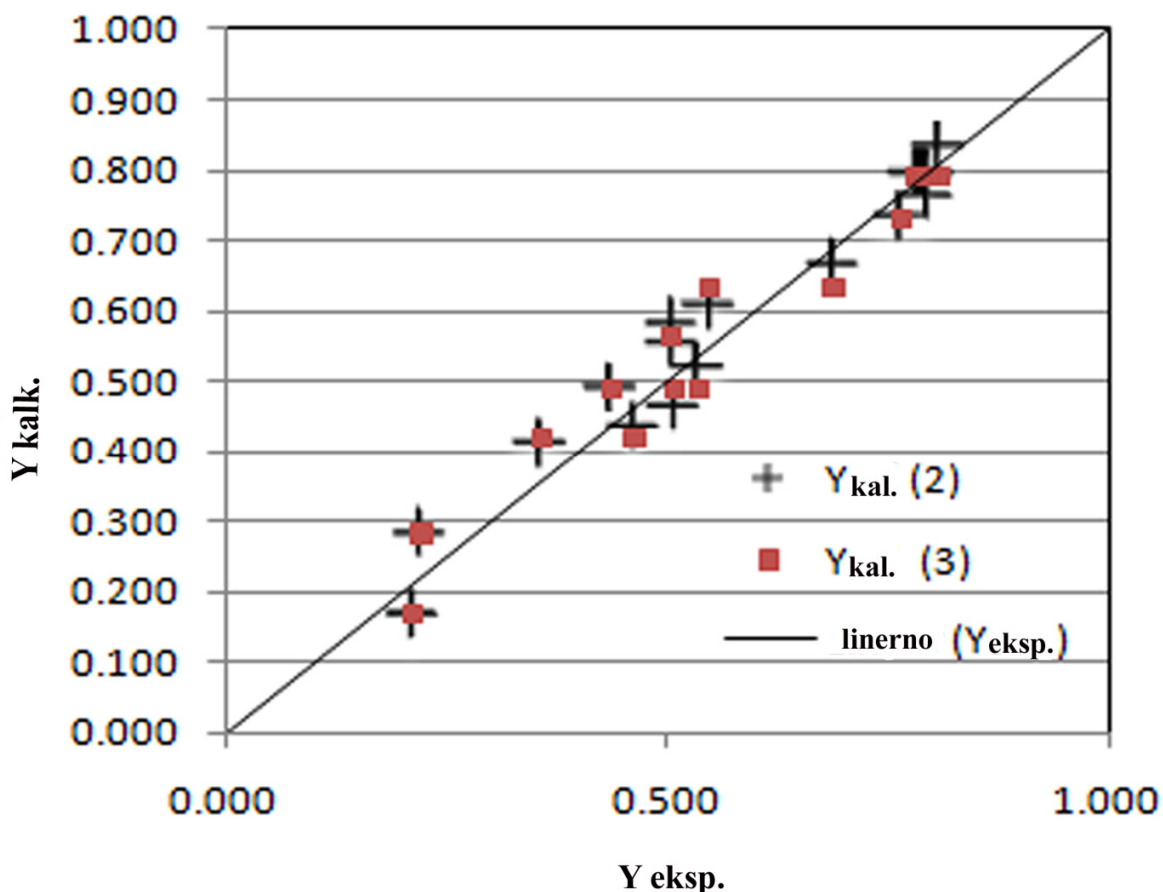
Slika 36b predstavlja 3-D i 2-D odzivne površine uticaja pritiska i količine utrošenog NK CO₂ na prinos diosgenina. Uticaj količine NK CO₂ za ekstrakciju odnosno vreme ekstrakcije pokazuje da sa povećanjem utrošenog NK CO₂ značajno se povećava i prinos diosgenina. Ovaj prikaz potvrđuje zapažanja preliminarne analize uticaja vremena ekstrakcije kroz količinu utrošenog NK CO₂, na prinos ekstrakta kao što je prethodno predstavljeno na slici 33, gde povećanjem vremena trajanja ekstrakcije od 83 do 155min ima mnogo veći efekat, nego nakon 155 min, što predstavlja utrošak NK CO₂ od 15 do 25g_{CO2}/g_{bm}. Nakon vrednosti utrošenog NK CO₂ po masi bilje sirovine za vreme ekstrakcije od 25g_{CO2}/g_{bm}, znatno manje povećanje se postiže u prinosu diosgenina u odnosu na povećanje utrošenog NK CO₂, odnosno povećanjem vremena ekstrakcije. Daljim povećavanjem vremena ekstrakcije bi dovelo do povećanja prinosa koji bi bili neznatni, a to bi s druge strane vodilo do povećanja troškova.

Na slici 36c. Predstavljen je 3-D i 2-D prikaz dejstva temperature na prinos diosgenina. Povećanjem temperature smanjuje se gustina NK CO₂, što smanjuje sposobnost rastvaranja, dok sa druge strane povećanje temperature dovodi do povećanja napona pare diosgenina koji može imati pozitivan efekat na rastvorljivost jedinjenja u NK CO₂. Na 3-D dijagramu je zapaženo povećanje prinosa diosgenina sa povećanjem temperature, ali definitivno to povećanje nije bilo od značaja.

Zbog određene značajnosti uticaja linearnih i kvadratnih vrednosti procesnih parametara, kao i njihove međusobne interakcije RSM analizom na prinos diosgenina, definišući pritisak i utrošak NK CO₂ od značaja, moguće je formirati pojednostavljenu jednačinu zavisnosti prinosa diosgenina od uticaja procesnih parametara prikazanu po jednačini (51):

$$Y = 0,79 + 0,034x_1 + 0,072x_3 - 0,20x_1^2 - 0,064x_3^2 \quad (51)$$

Ova jednačina se primenjuje za dobijanje ekstrakta bogatih diosgeninom (Y) na pritiscima od 16,7 do 33,4 MPa (kodirane vrednosti za x_1 od $-1,682$ do $+1,682$) i za količinu utrošenog $NK-CO_2$ po masi biljnog materijala od 11,59 do 28,41 (kodirane vrednosti za x od $-1,682$ do $+1,682$). Poređenje prinosa diosgenina, determinisanih jednačinom (50), sa koeficijentima svih procesnih parametara ili jednačinom (51), gde figurišu samo procesni parametri od značaja determinisani RSM analizom, (Y_{cal}) i eksperimentalno dobijenih vrednosti izolovanog diosgenina (Y_{exp}) predstavljen je na slici 37. Veoma male razlike u koeficijentima korelacije između izračunatih i eksperimentalnih vrednosti Y ($r = 0,979$ korišćenjem jednačine (50) i primenom jednačine (51), $r = 0,981$) ukazuju na značaj i efikasnost primenjene RSM/CCRD analize.



Slika 37. Poređenje vrednosti prinosa diosgenina Y , računane jednačinom (50) i jednačinom (51).

4.2.1.5. Definisane optimalnih procesnih uslova NKE za dobijanje ekstrakata sa visokim sadržajem diosgenina

Prema primenjenoj RSM analizi optimalni uslovi za postizanje najvećeg prinosa diosgenina od 0,81 mg_{diosgenin}/g_{bm} su: 24,6 MPa; 43,5°C; i 20,87g_{CO2}/g_{bm} (količina utrošenog NK CO₂ po masi biljne sirovine, ili aproksimativno vremena trajanja ekstrakcije od 160 min). Gustina NK CO₂ definisana na određenim optimalnim uslovima pritiska i temperature je 860 kg/m³, što potvrđuje pretpostavke na osnovu preliminarne analize korelacije prinosa diosgenina i gustine NK CO₂. Prethodno definisani optimalni uslovi za natkritičnu ekstrakciju diosgenina iz *T. terrestris* su bili 23,1MPa, 55°C i 139,4min koji su približni definisanim uslovima za diosgenin ekstrakciju iz grčkog semena.

Rezultati optimizacije NKE diosgenina iz grčkog semena, kao i prethodne studije izolovanja diosgenina iz drugih biljaka, su pokazale da je uticaj temperature najmanji ili zanemarljiv na prinos diosgenina.

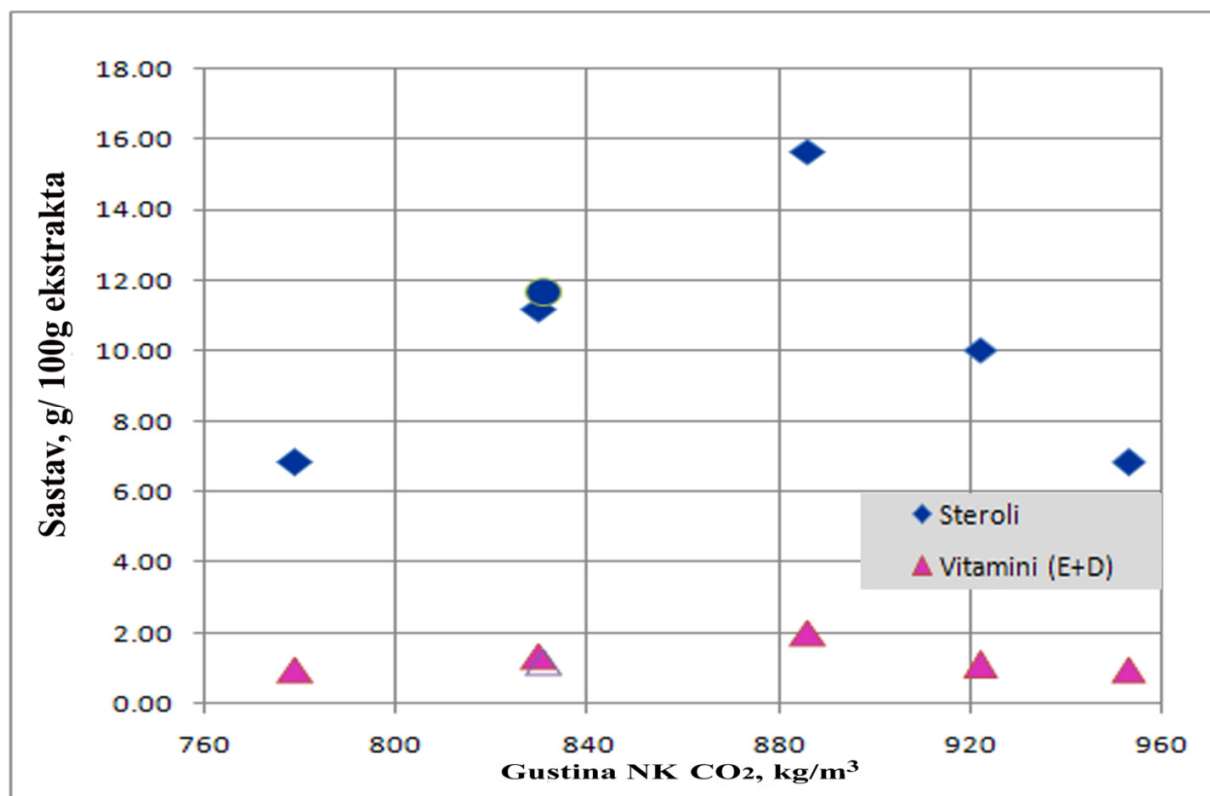
4.2.2. Dobijanje ekstrakata bogatih sterolima, vitaminom E i vitaminom D iz grčkog semena

Dobijanje ekstrakata bogatih sadržajem totalnih sterola, vitamina E i vitamina D iz grčkog semena NKE u širokom opsegu primenjenih procesnih uslova pritiska, temperature i vremena ekstrakcije, imalo je za cilj da omogući dobijanje hipolipemičnih ekstrakata na najefikasniji način, u što većoj koncentraciji dobijenih aktivnih komponenata pri optimalnim procesnim uslovima. Upravo razmatranje uticaja procesnih parametara na dobijanje ekstrakata kako bi se postigao maksimalan sadržaj sterola, vitamina E i vitamina D, kao i razumevanje njihovih molarnih rastvorljivosti dovelo je do boljeg razumevanja i definisanja optimalnih uslova za dobijanje ekstrakata bogatih ovim aktivnim komponentama, kako bi se najpribližnije odredili uslovi za dobijanje ekstrakta sa što većom koncentracijom sterola, vitamina E i D.

4.2.2.1. Preliminarna analiza uticaja procesnih parametara na prinos ekstrakta i sastava totalnih sterola, vitamina E i vitamina D

Uticaj gustine NK CO₂ na prinos ekstrakta i njegovog sastava

Primenjen princip preliminarne analize je bio sličan kao i na primeru dobijanja ekstrakata sa bogatim sadržajem diosgenina iz grčkog semena u odeljku 4.2.1.1. Uticaj procesnih parametara pritiska i temperature u vidu gustine NK CO₂ na prinos totalnog ekstrakta iz grčkog semena, kao i na determinisan sadržaj sterola, vitamina E i vitamina D u dobijenim ekstraktima. U eksperimentima gustina NK CO₂ je bila u opsegu od 780 do 960 kg/m³, a prinos totalnog ekstrakta definisan je nakon utrošenih 20 gCO₂/g_{bm}. Standardna devijacija ove analize je bila 0,2%. Definisane količine totalnih sterola, vitamina E i D u dobijenom ekstraktu u zavisnosti od gustine NK CO₂ za vreme ekstrakcije su prikazani na slici 38.



Slika 38. Sastav sterola i vitamina E i D u dobijenim ekstraktima iz grčkog semena u funkciji gustine NK CO₂

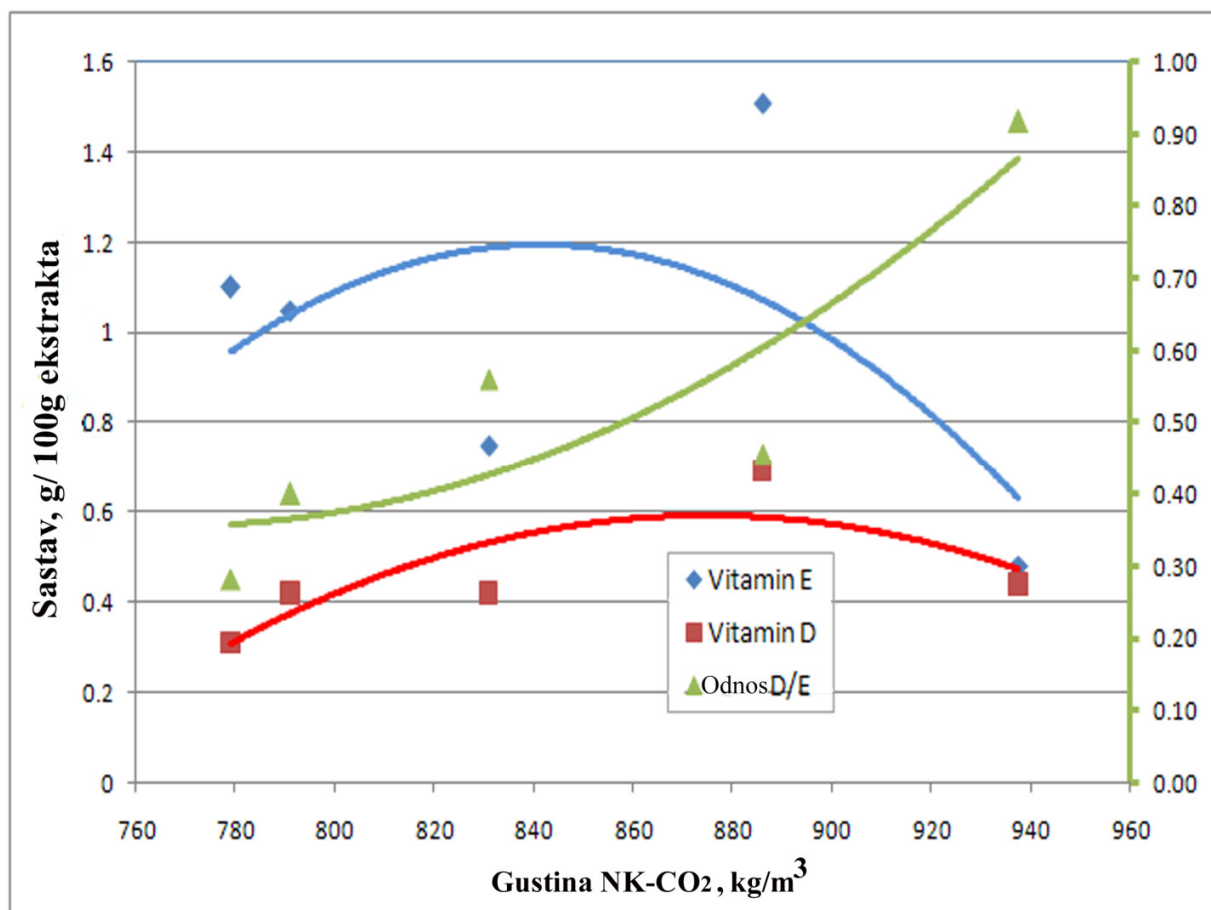
Ostvaren prinos totalnog ekstrakta je bio 4 puta manji u odnosu na ostvaren prinos tokom ekstrakata bogatih diosgeninom iz tretiranog grčkog semena, kada je grčko seme prethodno tretirano odmaščivanjem i hidrolizom (Bogdanovic i sar, 2016). Kao i kod NKE ekstrakta bogatih diosgeninom, pošlo se od pretpostavke da se na NKE pri gustini CO₂ od 860-886 kg/m³ mogu dobiti ekstrakti sa maksimalnom koncentracijom totalnih sterola, vitamina E i D. Određen sastav različitih vrsta sterola u ekstraktu dobijenim iz grčkog semena je bio između 6,83% i 16,22%, što se slaže sa prethodnim literaturnim podacima, što je i prikazano u tabeli 17.

Tabela 17. Eksperimentalni podaci determinisanih komponenata u ekstraktu dobijenom iz grčkog semena

	Sadržaj g/100 g ekstrakta	Mw (g/mol)	Reference
Totalni steroli	6,83-16,22%		Ciftci, 2011; Cerdon, 1995; Brenac, 1996;
Kampesterol	0,19-1,17	400,7	Ciftci, 2011; Cerdon, 1995; Brenac, 1996;
Sitosterol	2,48-6,47	414,7	Ciftci, 2011; Cerdon, 1995; Brenac, 1996;
Fukosterol	0,06-0,27	412,7	Cerdon, 1995; Brenac, 1996;
Cikloartenol hanolijanoli	1,87-2,17	426,7	Ciftci, 2011; Cerdon, 1995; Brenac, 1996;
Stigmastan-3,5 dien	1,01-2,17	396,7	Ciftci, 2011; Cerdon, 1995; Brenac, 1996;
Ostali	1,00-3,79		Ciftci, 2011; Cerdon, 1995; Brenac, 1996;
Tokoferol (vitamin E)	0,2-0,6%	430,71	Ciftci, 2011;
Triacilgliceroli^a	89,1-90,0%	793-845	Ciftci, 2011;
Masne kiseline (FA) (Ln; L; O; P, S)	<5%	256-284	Ciftci, 2011;

^avrste triacilglicerola: LnLnLn, LnLnL, LLLn, LnLnO, LnLnP, LLL, LnLO, PLLn, OLL, PLL, OOL, PLO, PLP, OOO: skraćenice: Ln-linoleinska, L-linolna, O-oleinska, P-palmitinska, S-stearinska kiselina.

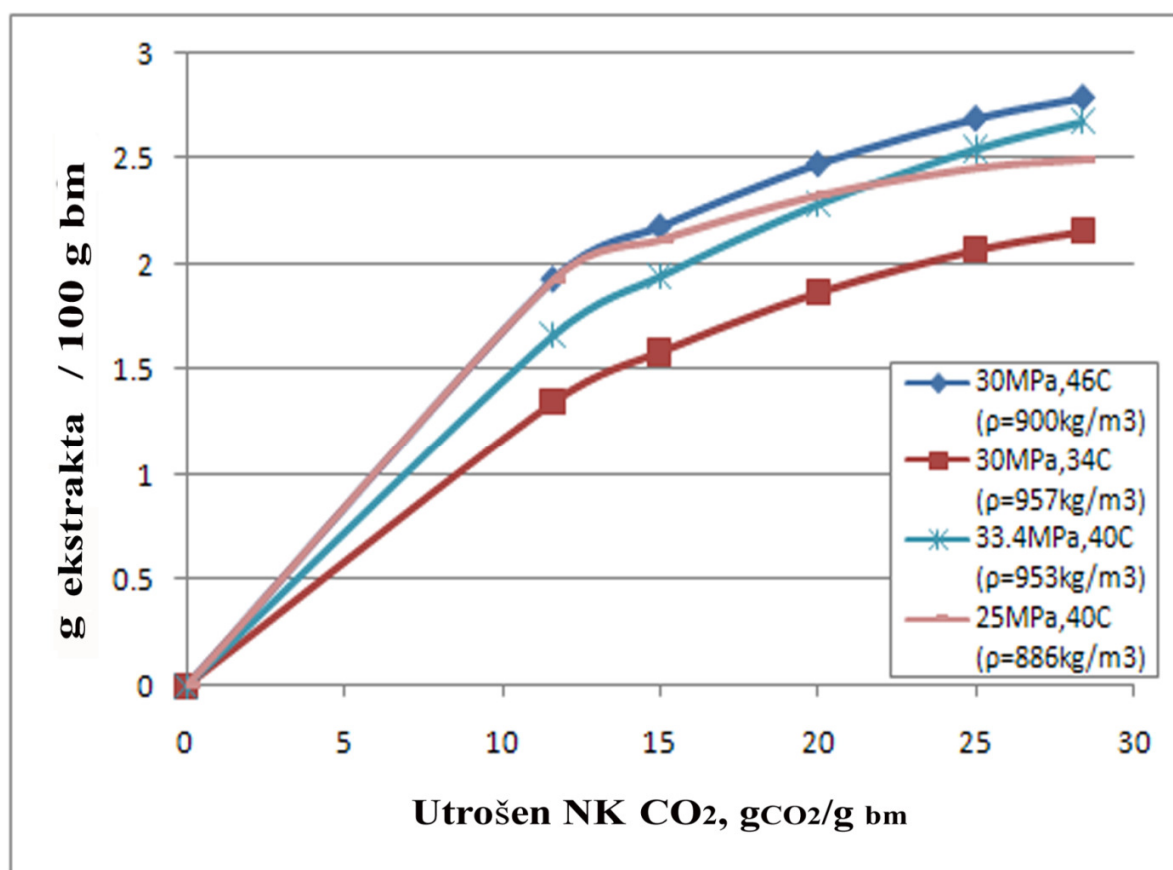
Zavisnost udela vitamina D i E, kao i njihovog odnosa od gustine CO₂ u procesu NKE prikazana je na slici 36. Maksimalan prinost ekstrakata bogatih vitaminima E i D je ostvaren pri gustini od 886 kg/m³ (1,30% i 0,68% za vitamine D i E, redom). Sadržaj oba vitamina u dobijenom ekstraktu raste sa povećanjem gustine NK CO₂ na 886 kg/m³ (400% i 50%, za vitamine D i E, redom) u odnosu na srednju vrednost sadržaja vitamina pri drugim vrednostima gustina CO₂. Interesantno je i zapažanje da odnos vitamina D i E gradijentno raste sa povećanjem gustine NK CO₂.



Slika 39. Procentualni udeo vitamina E i D u totalnom ekstraktu iz grčkog semena

Uticaj vremena ekstrakcije na prinos ekstrakta i njegovog sastava

Preliminarna analiza uticaja vremena ekstrakcije odnosno količine utrošenog NK CO₂ po masi biljne sirovine na gustini od 886 kg/m³ na prinos ekstrakta prikazana je na slici 40. Uticaj vremena ekstrakcije je ispitan za utrošak NK CO₂ do 28,4 gCO₂/ g_{bm}. Primećeno je da se priraštaj prinosa ekstrakta nakon utrošenih 11,6 gCO₂/ g_{bm} ne menja značajno. Zapažen je linearni trend odnosa između prinosa ekstrakta i vremena ekstrakcije, odnosno utroška NK CO₂ po biljnoj masi grčkog semena za vreme procesa ekstrakcije.



Slika 40. Prinos ekstrakta na gustini od 886 kg/m³ u zavisnosti od količine utrošenog NK CO₂ (vremena ekstrakcije)

4.2.2.2. RSM-CCRD analiza procesnih parametara na prinos ekstrakcije i sastav totalnih sterola, vitamina E i vitamina D

Na osnovu preliminarnih rezultata istraživanja uticaja različitih gustina NK CO₂ promenom pritiska i temperatura, i vremena ekstrakcije, odnosno utroška NK CO₂ na prinos ekstrakta, pristupljeno je detaljnijoj analizi uticaja procesnih parametara natkritične ekstrakcije na prinos ekstrakta, i sadržaj totalnih sterola, vitamina E i D, primenom RSM i CCRD analize, definisanjem pritiska, temperature i utroška NK CO₂ kao kodiranih parametara X₁, X₂ i X₃ formirajući set eksperimenata po sistemu CCRD dizajna matrice prikazanim u tabeli 18.

Tabela 18. Kodirani i nekodirani nivoi nezavisnih promenljivih u RSM dizajnu optimizacije.

Kodirani nivoi X _i ; i=1,2,3	Pritisak (MPa)	Temperatura (°C)	Utrošak NK CO ₂ (gCO ₂ /g bm)
-1,682	16,6	30	11,6
-1	20	34	15
0	25	40	20
+1	30	46	25
+1,682	33,4	50	28,4

Na osnovu matrice formiran je set od 20 eksperimenata, nakon kojih je određen prinos totalnog ekstrakta dobijenog iz 40 g grčkog semena i analiziran udeo totalnih sterola, vitamina E i vitamina D u ekstraktu (%), dobijenom primenom različitih procesnih uslova prikazanim u tabeli 19.

Tabela 19. Eksperimentalni dizajn primenom CCRD analize, sa rezultatima prinosa ekstrakta, totalnih sterola, vitamina E i vitamina D u njima.

Broj	Kodirane promenljive			Prinos ekstrakta (g _{eks} /100g _{bm})	Totalni steroli	Vitamin		Gustina NK CO ₂ , (kg/m ³)
	X1	X2	X3			E	D	
				Udeo u ekstraktu, %				
1	1	1	1	2,5	9,49	0,73	0,31	900
2	1	1	-1	2,09	11,20	0,84	0,53	900
3	1	-1	1	2,00	8,74	0,57	0,42	957
4	1	-1	-1	1,47	10,60	0,65	0,39	957
5	-1	1	1	2,34	11,86	1,08	0,39	791
6	-1	1	-1	2,09	11,41	1,01	0,45	791
7	-1	-1	1	2,07	10,90	0,86	0,56	869
8	-1	-1	-1	2,00	10,61	0,76	0,38	869
9	1,682	0	0	2,55	6,83	0,71	0,25	953
10	-1,682	0	0	1,97	8,83	1,10	0,31	779
11	0	1,682	0	2,36	11,66	0,75	0,42	834
12	0	-1,682	0	1,50	10,36	0,38	0,45	922
13	0	0	1,682	2,56	13,32	1,07	0,60	886
14	0	0	-1,682	1,95	14,50	1,08	0,63	886
15	0	0	0	2,14	16,21	1,41	0,72	886
16	0	0	0	2,23	16,20	1,43	0,71	886
17	0	0	0	2,21	16,31	1,40	0,72	886
18	0	0	0	2,44	16,08	1,43	0,71	886
19	0	0	0	2,41	16,18	1,42	0,72	886
20	0	0	0	2,55	16,22	1,42	0,70	886

Primenom ANOVA analize determinisana je značajnost uticaja procesnih parametara preko regresionih koeficijenata na izlazne veličine kao što su prinos totalnog ekstrakta, i udeli totalnih sterola, vitamina E i D u dobijenom ekstraktu. Linearni i kvadratni efekat promenljivih, kao i njihove međusobne interakcije su determinisane preko vrednosti koeficijenata dobijenih analizom ANOVA. Analiza (ANOVA) je omogućila određivanje prediktivnih vrednosti izlazne veličine (Y) po kvadratnoj jednačini (45) kao prinosa totalnog ekstrakta, udela totalnih sterola, vitamina E i D, koji je predstavljao odnos empirijske zavisnosti procesnih parametara i izlaznih veličina i poređenje sa realnim eksperimentalnim rezultatima, radi određivanja statističke preciznosti.

Regresioni koeficijenti koji su predstavljali vrednosti uticaja procesnih parametara na izlazne veličine po kvadratnoj jednačini prikazani su u tabeli 20.

Zbog određene značajnosti linearnih i kvadratnih vrednosti procesnih parametara, kao i njihove međusobne interakcije, RSM analizom definisani regresioni koeficijenti su omogućili formiranje jednačine uticaja procesnih uslova pritiska, temperature i utrošenog CO₂ na prinos totalnih sterola, vitamina E i vitamina D (52a-d):

$$Y_{\text{totalni ekstrakt}} = 2,33 + 0,039X_1 + 0,21X_2 + 0,17X_3 - 0,039X_1^2 - 0,16X_2^2 - 0,041X_3^2 + 0,095X_1X_2 + 0,078X_1X_3 + 7,5 \cdot 10^{-3}X_2X_3 \quad (52a)$$

$$Y_{\text{totalni steroli}} = 16,20 - 0,59X_1 + 0,39 - 0,35X_3 - 2,96X_1^2 - 1,83X_2^2 - 0,81X_3^2 - 0,051X_1X_2 - 0,54X_1X_3 + 0,039X_2X_3 \quad (52b)$$

$$Y_{\text{vitamin E}} = 1,42 - 0,12X_1 + 0,11X_2 - 2,7 \cdot 10^{-3}X_3 - 0,18X_1^2 - 0,30X_2^2 - 0,12X_3^2 - 0,015X_1X_2 - 0,045X_1X_3 - 7,5 \cdot 10^{-3}X_2X_3 \quad (52c)$$

$$Y_{\text{vitamin D}} = 0,71 - 0,017X_1 - 8,82 \cdot 10^{-3}X_2 - 8,82 \cdot 10^{-3}X_3 - 0,15X_1^2 - 0,098X_2^2 - 0,034X_3^2 + 0,016X_1X_2 - 0,039X_1X_3 - 0,061X_2X_3 \quad (52d)$$

Tabela 20. Značaj regresionih koeficijenata kvadratne jednačine za izlazne veličine prinosa totalnog ekstrakta, sterola, vitamina E i vitamina D

Promenljive	Prinos totalnog ekstrakta (%)		Prinos totalnih sterola (% m/m)		Prinos vitamina E (% m/m)		Prinos vitamina D (% m/m)	
	RC	p-vrednost	RC	p-vrednost	RC	p-vrednost	RC	p-vrednost
Konstante	2,33	0,0102	16,20	< 0,0001	1,42	< 0,0001	0,71	< 0,0001
X ₁	0,039	0,4521	-0,59	< 0,0001	-0,12	< 0,0001	-0,017	< 0,0001
X ₂	0,21	0,0016	0,39	< 0,0001	0,11	< 0,0001	-8,82·10 ⁻³	0,0003
X ₃	0,17	0,0075	-0,35	< 0,0001	-2,70·10 ⁻³	0,3128	-8,82·10 ⁻³	0,0003
X ₁ ²	-0,039	0,4431	-2,96	< 0,0001	-0,18	< 0,0001	-0,015	< 0,0001
X ₂ ²	-0,16	0,0097	-1,83	< 0,0001	-0,30	< 0,0001	-0,098	< 0,0001
X ₃ ²	-0,041	0,4234	-0,81	< 0,0001	-0,12	< 0,0001	-0,034	< 0,0001
X ₁ X ₂	0,095	0,1774	-0,051	0,0201	-0,015	0,0011	0,016	< 0,0001
X ₁ X ₃	0,078	0,2639	-0,540	< 0,0001	-0,045	< 0,0001	-0,039	< 0,0001
X ₂ X ₃	7,5·10 ⁻³	0,9111	0,039	0,0633	7,5·10 ⁻³	0,0471	-0,061	< 0,0001
Lack of fit	0,2889		1,00		0,9023		0,9893	
R ²	0,8155		0,9998		0,9996		0,9993	
Adj R ²	0,6495		0,9997		0,9992		0,9986	
Pred-R ²	0,0115		0,9998		0,9988		0,9985	

RC-regresioni koeficijenti

Fitovanje modela ANOVA sa rezultatima totalnog ekstrakta, sterola, vitamina E i vitamina D izraženo kroz vrednost "lack of fit" nije bilo značajno ($p > 0,05$), ukazujući na dobro slaganje rezultata i modela. Vrednosti koeficijenta R^2 za statističku preciznost modela i rezultata za totalni ekstrakt, sterole, vitamin E i vitamin D (Tabela 20) ukazuju na dobro slaganje izračunatih vrednosti izlaznih veličina po RSM modelu kvadratne jednačine sa

eksperimentalnim rezultatima za NKE na različitim različitim procesnim uslovima pritiska, temperature i utrošenog NK CO₂ tokom procesa ekstrakcije (Andrich i sar, 2001).

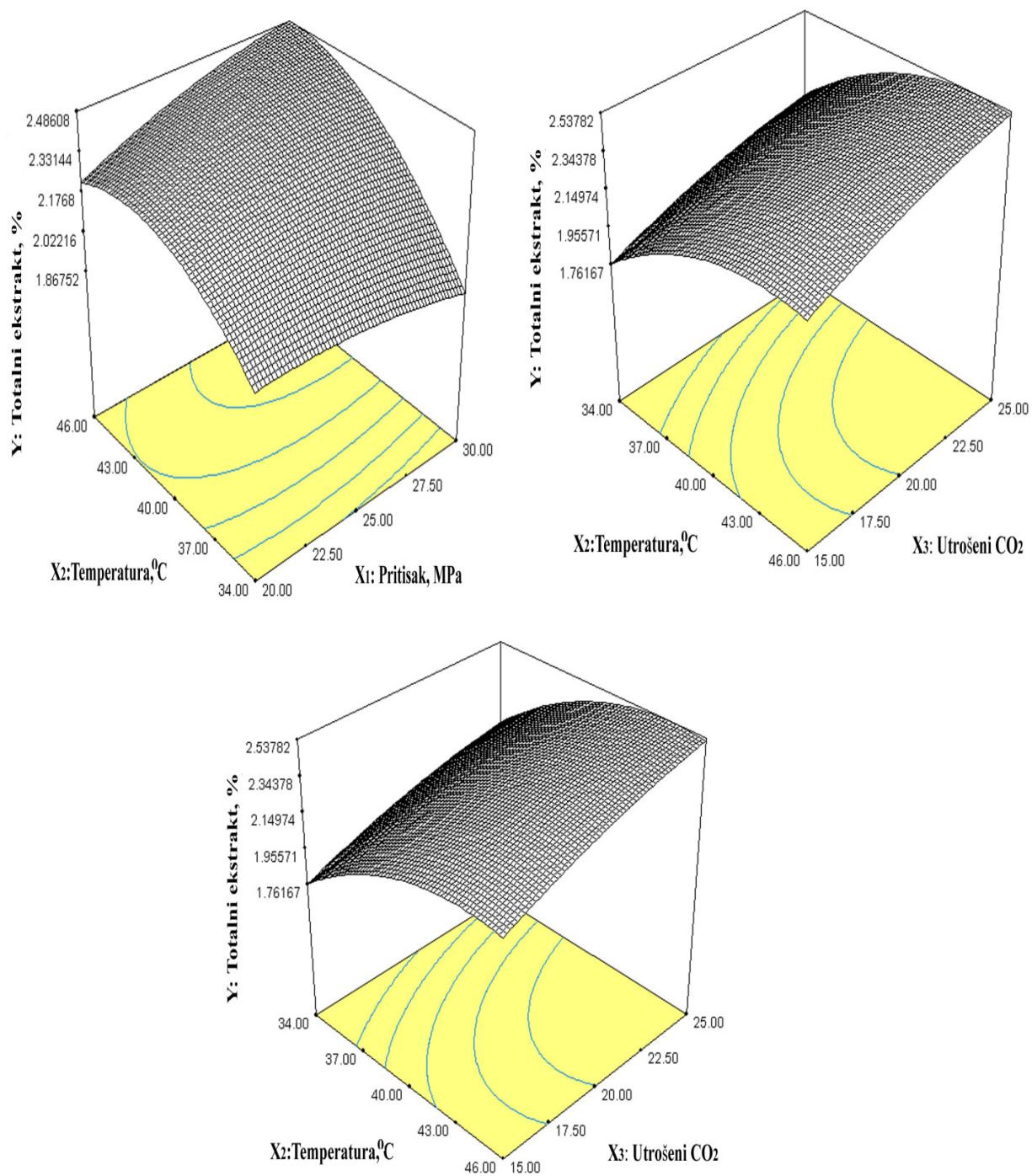
Nezavisne promenljive koje su značajno uticale na prinos totalnog ekstrakta (jednačina 52a) su linearna i kvadratna forma temperature (X₂) i linearna forma utroška NK CO₂ (X₃). Koeficijenti R², adj R², i predR², sa vrednošću od 0,9998, 0,9996 i 0,9986 (jednačine 52b-d), su ukazali na dobro slaganje prediktivnih i dobijenih rezultata prinosa sterola, vitamina E i vitamina D, prema metodologiji odzivnih površina. Značajan uticaj nezavisnih promenljivih (p < 0,05) na sve tri izlazne veličine totalnih sterola, vitamina E i vitamina D su pokazale linearne i kvadratne forme pritiska i temperature (X₁, X₁², X₂, X₂²) i kvadratna forma utroška NK CO₂ (X₃²), kao i forme koje predstavljaju interakcije među nezavisnim promenljivim veličinama (Tabela 20).

Ove podatke podržavaju prethodni rezultati koji pokazuju da su prinosi sterola i vitamina E i D, uslovljeni pritiskom pri konstantnoj temperaturi (Slika 38). RSM analiza pokazuje da se optimalnim pritiskom i temperaturom NKE dobija ekstrakt sa najvećim sadržajem sterola i vitamina.

Analiza odzivnih površina 3-D dijagrama

3-D odzivne površine i konturni dijagrami za svaki od fitovanih modela su konstruisani kako bi dali vizuelni uvid u uticaj pritiska, temperature i utroška NK CO₂ na totalni prinos (slika 41) i udeo totalnih sterola, vitamina E i vitamina D u totalnom ekstraktu (slika 42a, 42b i 42c).

Temperatura je značajno uticala na prinos ekstrakta sa fenomenom zvanim "crossover" prikazanim na slici 41. Taj fenomen predstavlja pojavu da na nižoj temperaturi (oko kritične tačke NK CO₂) postoji negativan uticaj povećanjem pritiska, dok sa druge strane na višim temperaturama (iznad kritičnih NK CO₂) prinos ekstrakta raste sa porastom pritiska tokom svih zadatih eksperimentalnih vrednosti (Xu i sar, 2011; Ozkal i sar, 2005; Liu i sar, 2009).



Slika 41. Odzivne površine prinosa totalnog ekstrakta izraženog u funkciji pritiska, temperature i utroška NK CO₂, respektivno.

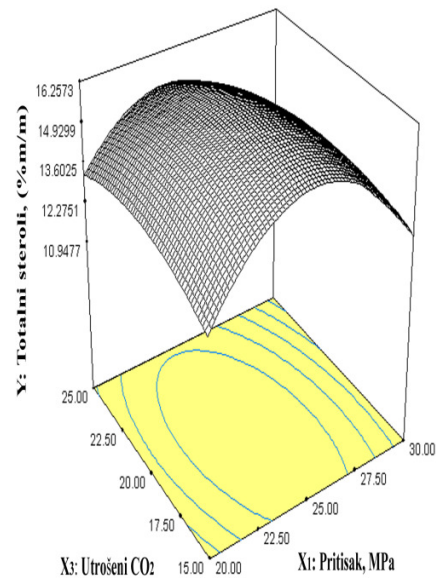
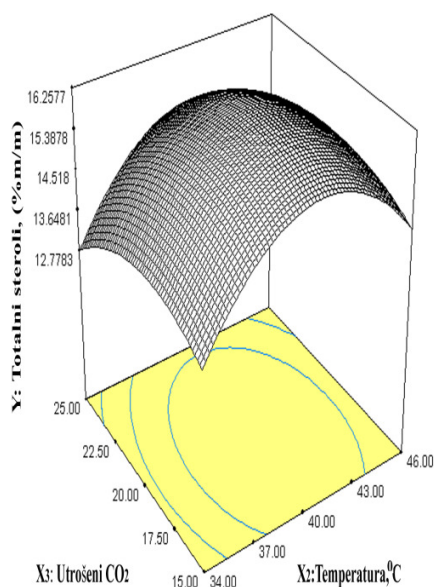
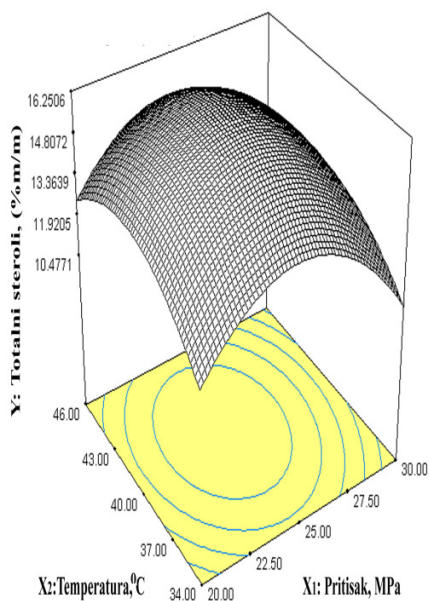
Odzivne površine koje su pokazale zavisnost prinosa totalnog sterola u odnosu na procesne parametra NKE pritiska, temeprature i utroška NK CO₂ prikazane su na slici 42a. Na osnovu ovih površina može se zaključiti da i pritisak i temperatura utiču na povećanje prinosa totalnih sterola, ali samo do vrednosti pritiska od 25 MPa; odakle daljim povećanjem pritiska dolazi do smanjenja sadržaja sterola u ekstraktu na svim vrednostima temperature. Sličan uticaj pritiska i temperature na sadržaj vitamina E i vitamina D u ekstraktu je prikazan na slikama 42b i 42c. Poznato je da napon pare određenih jedinjenja zavisi od temperature, koja ima uticaj na njihovu rastvorljivost u NK CO₂, dok gustina NK CO₂ uslovljena pritiskom i temperaturom ima generalni uticaj na efikasnost ekstrakcije i određuje moć rastvarača.

3-D ilustracije pokazuju i uticaj pritiska i utroška NK CO₂ na sadžaj totalnih sterola u ekstraktu . Prinos totalnih sterola raste sa povećanjem utroška NK CO₂, ali samo do vrednosti od 25 gCO₂/g_{bm} i nakon ove vrednosti dolazi do smanjenja sadržaja sterola u ekstraktu . Sličan uticaj temperature i količine utrošenog NK CO₂ je prikazan za prinos totalnih sterola, pri čemu je zapažen stalni porast u prinosu totalnih sterola sa porastom oba parametra temperature i utroška NK CO₂ sve do vrednosti od 40 °C i 25 gCO₂/ g_{bm} ali nakon ovih vrednosti prinos sa njihovim daljim povećanjem opada. Slična tendencija uticaja procesnih parametara (pritiska, temperature i utroška NK CO₂) je uočena na prinos vitamina E i vitamina D kao i što je prikazano na slikama 42b i 42c.

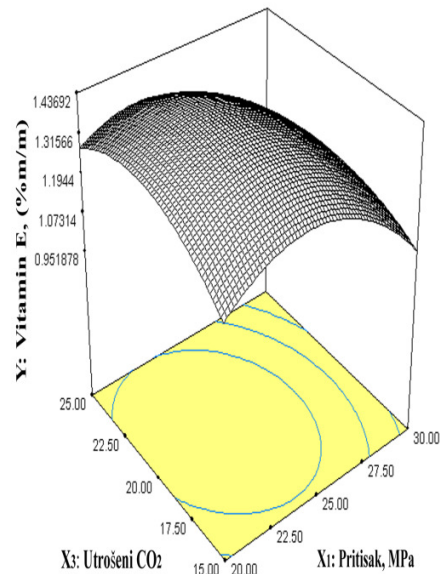
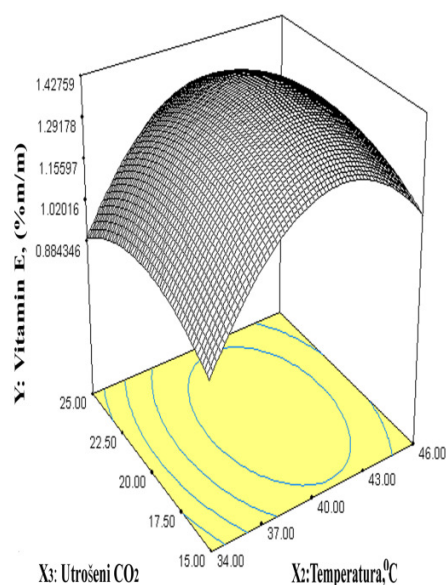
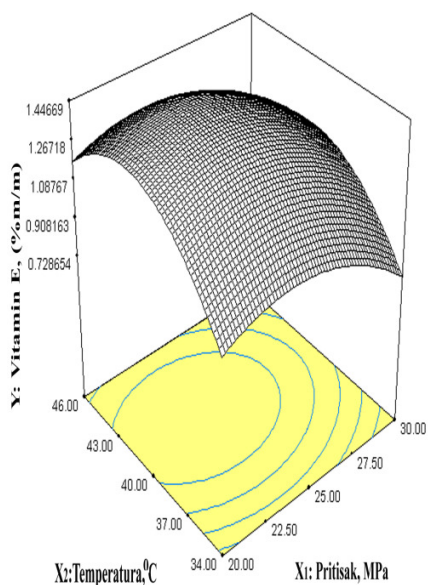
Na povišenim temperaturama, komponente sa većim molarnim masama (kao što su triacilgliceroli u poređenju sa sterolima i vitaminom E i vitaminom D, u slučaju grčkog semena) su neznatno prisutnije u ekstraktu kao rezultat njihove povećane isparljivosti na ovim uslovima. Steroli i vitamini prisutni u grčkom semenu su u manjim i ograničenim količinama u odnosu na triacilglicerole. S toga, kao komponente sa većom isparljivošću, one su prisutne u većoj količini i u ekstraktima dobijenim na nižim temperaturama. Efikasnost NKE se povećava sa povećanjem pritiska i temperature, ali se menja i sastav dobijenog ekstrakta i dolazi do smanjenja količine prisutnih sterola i vitamina u ekstraktu. Ovi rezultati potvrđuju preliminarnu analizu, pri kojoj su definisane određene vrednosti gustine NK CO₂ pri kojima se dobija ekstrakt sa najvećim sadržajem sterola i vitamina, kao što je i prikazano na Slici 38.

DOBIJANJE, KARAKTERIZACIJA I OPTIMIZACIJA HIPOLIPEMIJSKIH EKSTRAKATA MATIČNJAKA (*Melissa officinalis*) I GRČKOG SEMENA (*Trigonella foenum-graecum*) NATKRITIČNIM UGLJENIK (IV)-OKSIDOM

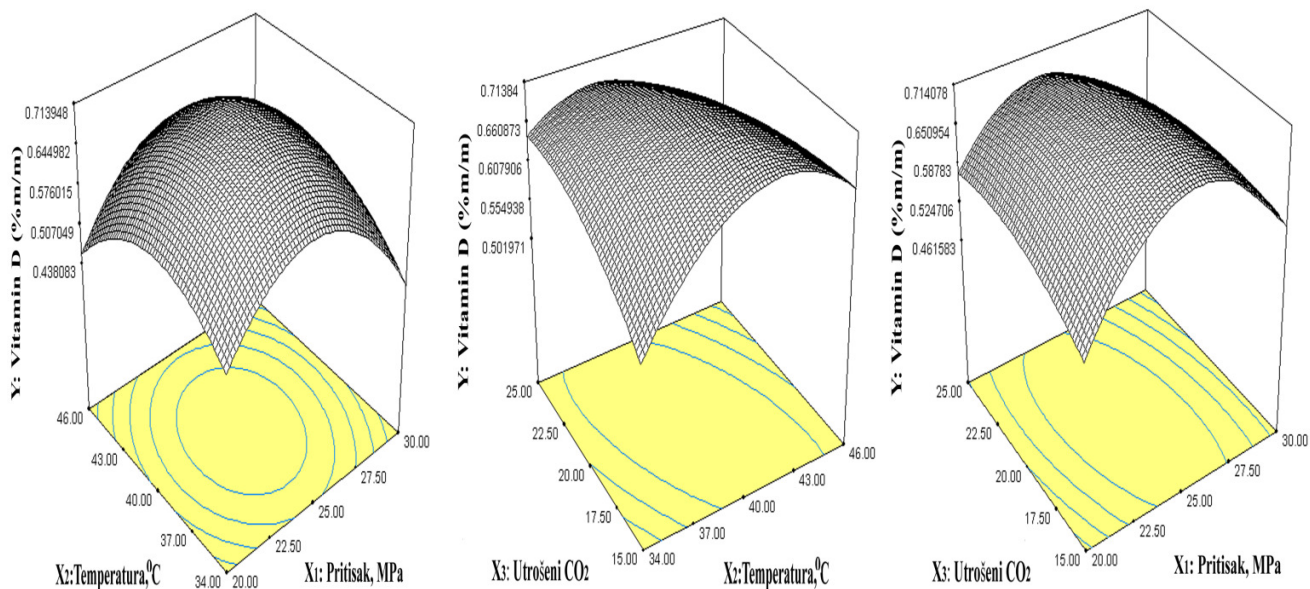
a)



b)



c)



Slika 42. Odzivne površine kao ilustracija uticaja pritiska, temperature i utroška NK CO₂ na izolaciju: a) totalnih sterola b) vitamina E i c) vitamina D.

4.2.2.3. Definisane optimalne procesne uslove za NKE izolovanje totalnih sterola, vitamina E i vitamina D

RSM analiza je primenjena sa ciljem da se definišu optimalni uslovi NKE za postizanje maksimalnih vrednosti u isto vreme za sve izlazne veličine totalnog prinosa ekstrakta, izolaciju sterola, vitamina E i vitamina D.

Vrednosti pritiska, temperature i utroška NK CO₂, koji predstavljaju uslove na kojima je moguće postići optimalne uslove NKE, kao i maksimume za pojedinačne veličine totalnog ekstrakta, totalnih sterola, vitamina E i vitamina D kao sub-optimumi prikazani su u tabeli 21.

Prema RSM analizi zajednički optimalni uslovi za postizanje maksimuma i najvećeg prinosa totalnog ekstrakta (2,573g/100g_{bm}) su bili: 27,0 MPa; 42,6 °C; i 24,6 gCO₂/g_{bm} (količina utrošenog NK CO₂). Niži pritisak (22,8- 24,8 MPa), kao i temperatura (39,9- 42,0 °C) i količina

utrošenog NK CO₂ (19,0-19,7 gCO₂/g_{bm}) su bili potrebni za postizanje maksimalnih količina totalnih sterola, vitamina E i vitamina D u dobijenim ekstraktima, kako je prikazano u Tabeli 21.

Primenjena je i globalna optimizacija za definisanje sub-optimalnih vrednosti za postizanje maksimalnih vrednosti istovremeno za sve četiri zavisne promenljive (prinos totalnog ekstrakta, totalnih sterola, vitamina E i vitamina D). Rezultat ove optimizacije ima neznatno različite vrednosti u poređenju sa rezultatima optimizacije za postizanje pojedinačnih maksimuma svake od zavisnih promenljivih, prikazanih u Tabeli 21. Pri optimalnim vrednostima globalne optimizacije za sve zavisne promenljive, postignut je prinos totalnog ekstrakta od 2,39g/100g_{bm}, koji sadrži 16,14%, 1,43% i 0,70% totalnih sterola, vitamina E i vitamina D u dobijenom ekstraktu, respektivno. Količinu dobijenog ekstrakta je moguće ostvariti pri sledećim procesnim uslovima: 24,7 MPa, 41,1 °C i utroškom NK CO₂ od 21,0 gCO₂/g_{bm}.

Tabela 21. RSM rešenja optimizacije (globalni optimumi i sub-optimalni uslovi)

Uslovi NKE za postizanje maksimalnog prinosa sterola, vitamina E i D prema dobijenom ekstraktu						
NKE parametri za maksimalne veličine			Maksimalan prinos totalnog ekstrakta (g/100g _{bm}) i njegovih specifičnih sastojaka (%m/m)			
Pritisak (MPa)	Temperatura (°C)	Utrošak NK CO ₂ (gCO ₂ /g)	Totalni ekstrakt	Totalni steroli	Vitamin E	Vitamin D
24,7	41,1	21,0	2,39	16,14	1,43	0,70
NKE parametri za postizanje pojedinačnih maksimuma prinosa totalnog ekstrakta, i odgovarajućih maksimuma sterola ili vitamina E ili vitamina D						
27,00	42,58	24,62	2,573			
24,59	40,62	19,05		16,278		
22,81	42,01	19,66			1,436	
24,77	39,85	19,59				0,714

4.2.2.4. Određivanje molarne rastvorljivosti totalnog ekstrakta

Molarna rastvorljivost totalnog ekstrakta je definisana korišćenjem podataka o njihovim postignutim prinosima za utrošak NK CO₂ od 11,6 g/g_{bm}. Merenjem prinosa ekstrakta od početka do vremena ekstrakcije za koju se utroši NK CO₂ u vrednosti od 11,6 g/g_{bm}, čiji je odnos bio linearan za različite vrednosti pritiska i temperature, određena je masena rastvorljivost totalnog ekstrakta (s , g/g_{CO2}). Određen sadržaj sterola, vitamina E i vitamina D u totalnom ekstraktu je primenjen u matematičkoj simulaciji određivanja njihovih masenih rastvorljivosti u NK CO₂. Na osnovu molarne mase CO₂ (44 g/mol) i molarne mase totalnog ekstrakta (računate na osnovu njegovih konstituenata i njihovih udela, a najveći udeo su činili triacilgliceroli sa oko 85% sastava prikazanim u tabeli 17, iz čega je molarna masa ekstrakta izračunata kao 850 g/mol), zatim molarne mase sitosterola kao predstavnika totalnih sterola (415 g/mol), molarne mase tokoferola (vitamin E, 430 g/mol) i vitamina D₃ (384 g/mol), određivana je molarna rastvorljivost totalnog ekstrakta kao i njegovih molskih frakcija izolovanih sterola, vitamina E i vitamina D (S_i ; i =totalni ekstrakt, steroli, vitamin E i vitamin D, mol/mol_{CO2}) i prikazan u tabeli 23.

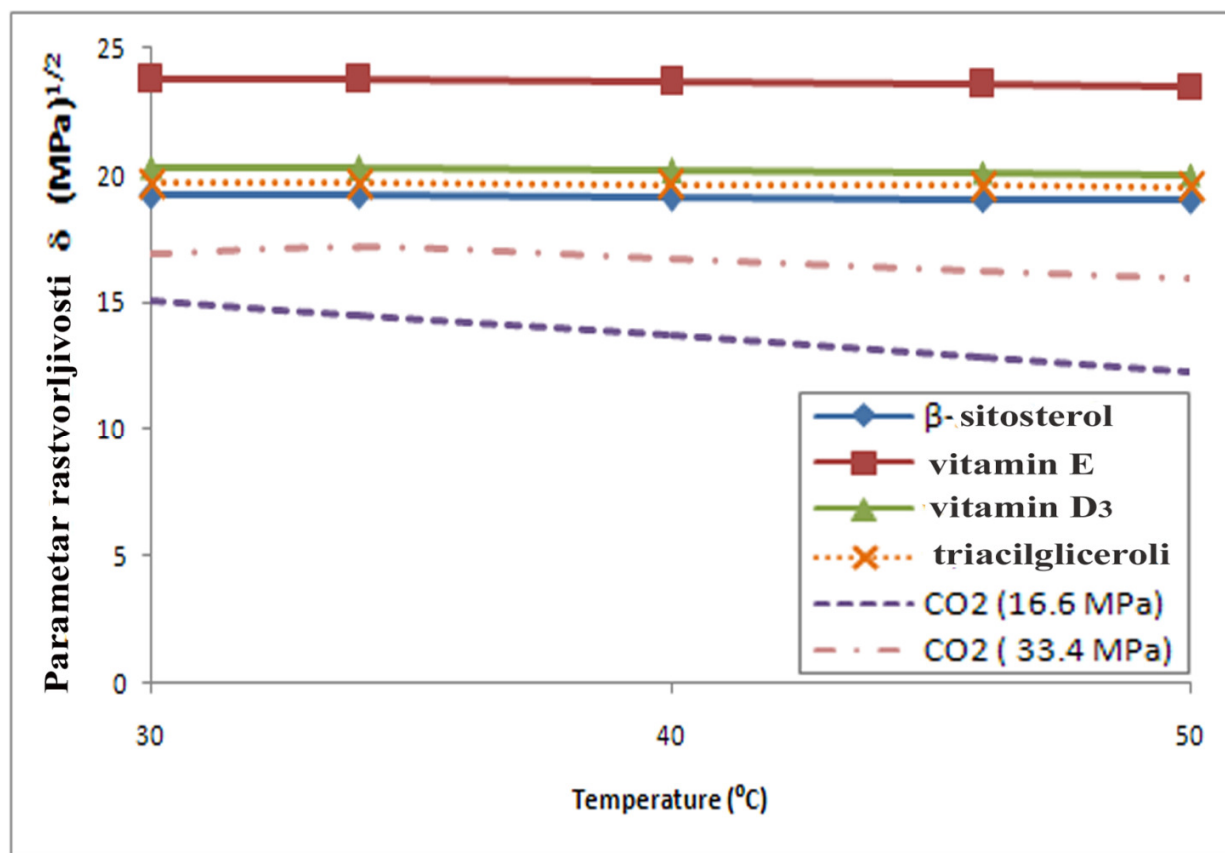
Pokušaj korelisanja molarne rastvorljivosti ekstrakta u zavisnosti od gustine NK CO₂ u log-log sistemu po Krastilovoj jednačini, nije dao zadovoljavajuće rezultate (Chrastil, 1982). Polazna tvrđenja i hipoteze za definisanje molarne rastvorljivosti su bile na osnovu preliminarnih istraživanja zavisnosti prinosa ekstrakta od gustine NK CO₂ (slika 40) pri čemu je definisano postizanje maksimuma prinosa ekstrakta pri gustini CO₂ od 880 kg/m³. Primenjene su i ostale korelacije i jednakosti koje su iskorišćene za korelaciju logaritamske vrednosti NK CO₂ rastvorljivosti pojedinih organskih jedinjenja i gustine NK CO₂, kao i odnos logaritamskih vrednosti NK CO₂ gustine i pritiska na ekstrakciju jedinjenja velikih molekulskih masa pri konstantnoj temperaturi (Fornari i sar, 2011). Ovaj oblik korelacije dat je kao zavisnost logaritamske vrednosti molarne rastvorljivosti totalnog ekstrakta $[\ln(pCO_2)/P]$ pri ekstrakciji na različitim temperaturama ali ni on nije dao zadovoljavajuće rezultate. Još neki od empirijskih modela za korelaciju molarne rastvorljivosti različitih jedinjenja natkritičnom ekstrakcijom na različitim pritiscima i temperaturama su prikazani u literaturi (Keshmiri i sar, 2014).

Analiza različitih uslova ekstrakcije i optimizacije NKE različitih bioaktivnih komponenata (β -karoten, likopen i a, b, c i α -tokoferol) iz semena je omogućena primenom metodologije bazirane na određivanju Hildebrandovog parametra rastvorljivosti (SP) (Kagliwal,

2011; Hildebrand, 1936). Po sličnoj metodologiji je određivan i upoređivan SP triacilglicerola, sitosterola, tokoferola i vitamina D₃ kao i NK CO₂ na različitim vrednostima pritiska i temperature u našem istraživanju određivanja rastvorljivosti totalnog ekstrakta, sterola, vitamina E i vitamina D u NK CO₂ na različitim uslovima pritiska i temperature.

Sa ciljem da se objasni i razume molarna rastvorljivost totalnog ekstrakta i molskih udela sterola, vitamina E i vitamina D (mol/mol_{CO₂}) na različitim uslovima NKE, kao i da se utvrđene zavisnosti koriste u prediktivne svrhe za neke druge uslove NKE, određivani su parametri rastvorljivosti komponenata ekstrakta dobijenog iz grčkog semena (triacilglicerola, sitosterola, tokoferola, i vitamina D₃), kao i NK CO₂. Poređena je rastvorljivost različitih grupa jedinjenja identifikovanih u ekstraktima dobijenim na različitim uslovima NKE (Kagliwal, 2011; Li i sar, 2015, Li i sar, 2003).

Zavisnost rastvorljivosti pojedinih grupa jedinjenja u ekstraktu izračunata korišćenjem jednačina (46)-(49) od temperature i pritiska NKE prikazana je na slici 43.



Slika 43. Parametar rastvorljivosti β -sitosterola, α -tokoferola i vitamina D₃ kao funkcija temperature i parametar rastvorljivosti NK CO₂ kao funkcija temperature i pritiska.

Upoređivanjem definisanih vrednosti parametara rastvorljivosti različitih grupa jedinjenja (sterola, vitamina E, vitamina D, triacilglicerola) u odnosu na izračunate vrednosti za NK CO₂, bi predstavljali veću rastvorljivost određenih grupa jedinjenja u NK CO₂ na različitim procesnim uslovima p i T, ukoliko je bila manja razlika u definisanim vrednostima parametara rastvorljivosti, što je omogućilo i postizanje većeg prinosa datih komponenata u dobijenim ekstraktima (Kagliwal i sar, 2011).

Određivanje parametra rastvorljivosti triacilglicerola je poistovećeno sa mogućnošću da se predvidi parametar rastvorljivosti totalnog ekstrakta, s obzirom da je njihov udeo u ekstraktu bio oko 85% . Parametar rastvorljivosti triacilglicerola je definisan uzimanjem linolne kiseline (LLL) kao najviše zastupljene, za predstavnika svih triacilglicerola.

Sa slike 43 vidi se da se pritisak pozitivno utiče na prinos ekstrakta iz grčkog semena dok porast temperature u prikazanom opsegu od 30 °C do 50 °C ne utiče značajno na prinos. Na konstantnoj temperaturi, smanjuje se razlika između parametara rastvorljivosti rastvoraka i rastvarača, što bi značilo postizanje većih prinosa ekstrakta, kao i njegovih komponenata triacilglicerola, sterola, vitamina E i vitamina D. Povećanjem pritiska, povećava se i temperatura formirajući određene uslove na kojima se među parametrima rastvorljivosti definiše najmanja razlika, pa postoji razlog da ti uslovi predstavljaju optimalnu gustinu, koja je u preliminarnom istraživanju ukazivala na optimalne vrednosti ekstrakcije (886 kg/m³), odnosno optimalna vrednost parametra X koji je određen uslovima temperature i pritiska.

Prema ovim pretpostavkama, odnos molarne rastvorljivosti totalnog ekstrakta i molskih udela njegovih konstituenata je analiziran i korelisan sa parametrom X po jednačini (53):

$$X=T^{0.5}/(SP^*/\rho_{CO_2}) \quad (53)$$

Ovaj parametar zavisi od pritiska, gustine NK CO₂ i odnosa parametara rastvorljivosti (SP*) različitih komponenata, koje su glavni sastojci ekstrakata dobijenih iz grčkog semena (Spi; i = triacilgliceroli, sitosterol, vitamin E i vitamin D) i parametra rastvorljivosti NK CO₂ (SP_{CO2}). Određivanje SP*, izračunavanjem i poređenjem SP triacilglicerola, sitosterola, vitamina E i vitamina D kao i NK CO₂ na različitim procesnim uslovima pritiska i temperature je prikazan u prilogu b, a rezultati prikazani u tabeli 22.

Tabela 22. Temperatura, gustina NK CO₂ i izračunat parametar SP*

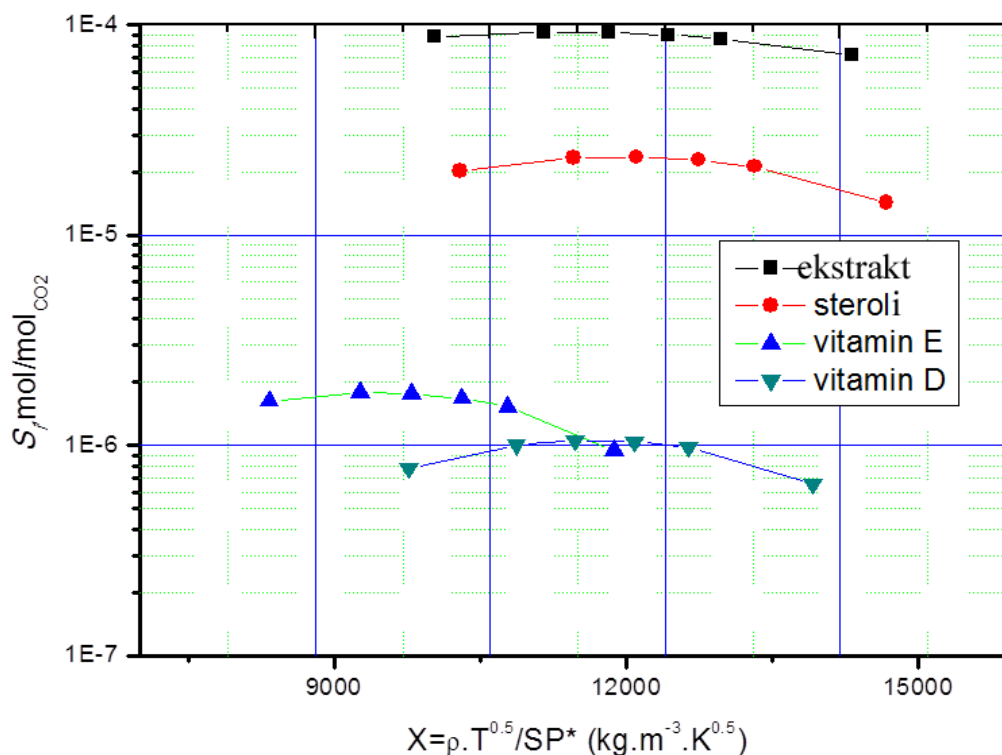
	Temperatura (K)	Gustina (kg/m ³)	(SP*) = (SP _{ex} /SP _{CO2})			
			Ekstrakt	Steroli	Vitamin E	Vitamin D
1	319,15	791	1,409	1,373	1,697	1,447
2	323,15	831	1,339	1,304	1,612	1,374
3	307,15	869	1,289	1,258	1,555	1,327
4	313,15	886	1,261	1,230	1,520	1,297
5	319,15	900	1,239	1,207	1,491	1,272
6	307,15	957	1,171	1,143	1,412	1,205

Određene determinisane X vrednosti i odgovarajuće eksperimentalne stvarne vrednosti molarne rastvorljivosti totalnih ekstrakata i molskih udela komponenata prikazani su u tabeli 23. Ideja o definisanju X parametra kao nezavisne veličine potiče od činjenice da su definisane količine sterola i vitamina uspešno korelisane sa gustinom NK CO₂ (što je prikazano na slici 38), kao i da je parametar X linearna funkcija gustine NK CO₂. X parametar uključuje i temperaturu, kao bitan procesni parametar. S toga korelacija eksperimentalno određenih molarnih gustina sa parametrom X mora biti približna relaciji prikazanoj na slici 38.

Tabela 23. Izračunate vrednosti X parametra i eksperimentalno određene molarne rastvorljivosti totalnog ekstrakta, sterola, vitamina E i vitamina D

	$X=T^{0,5}/(SP^*/\rho_{CO2})$				Molarna rastvorljivost ekstrakta, sterola i vitamina (mol/mol _{CO2})			
	Ekstrakt	Steroli	Vit E	Vit D	Ekstrakt 10 ⁵	Steroli 10 ⁵	Vit E 10 ⁵	Vit D 10 ⁵
1	10,029	10,292	8,327	9,766	8,904	2,12	0,184	0,083
2	11,156	11,456	9,267	10,872	9,486	2,26	0,141	0,088
3	11,815	12,106	9,794	11,476	8,180	1,80	0,131	0,085
4	12,433	12,747	10,314	12,088	9,320	3,03	0,252	0,144
5	12,977	13,321	10,784	12,640	9,200	1,95	0,143	0,086
6	14,323	14,674	11,878	13,919	6,970	1,38	0,084	0,063

Slika 44 predstavlja odnos između molarne rastvorljivosti totalnog ekstrakta kao i molskih udela sterola i vitamina, kao funkcije parametra $X=T^{0.5}/(SP^*/\rho_{CO_2})$.



Slika 44. Molarna rastvorljivost ekstrakta, sterola, vitamina E i vitamina D kao funkcija parametra X.

Molarna rastvorljivost totalnog ekstrakta (S_i), i molskih udela sterola, vitamina E i D (y_i) definisana je polinomom drugog reda prema parametru X po jednačini (54):

$$S_i \text{ (ili } y_i) = a_i + b_i \cdot X + c_i \cdot X^2 \quad (54)$$

gde je i=totalni ekstrakt, steroli, vitamin E i vitamin D.

Definisane vrednosti koeficijenata a , b i c iz jednačine (54) prikazane su u tabeli 24.

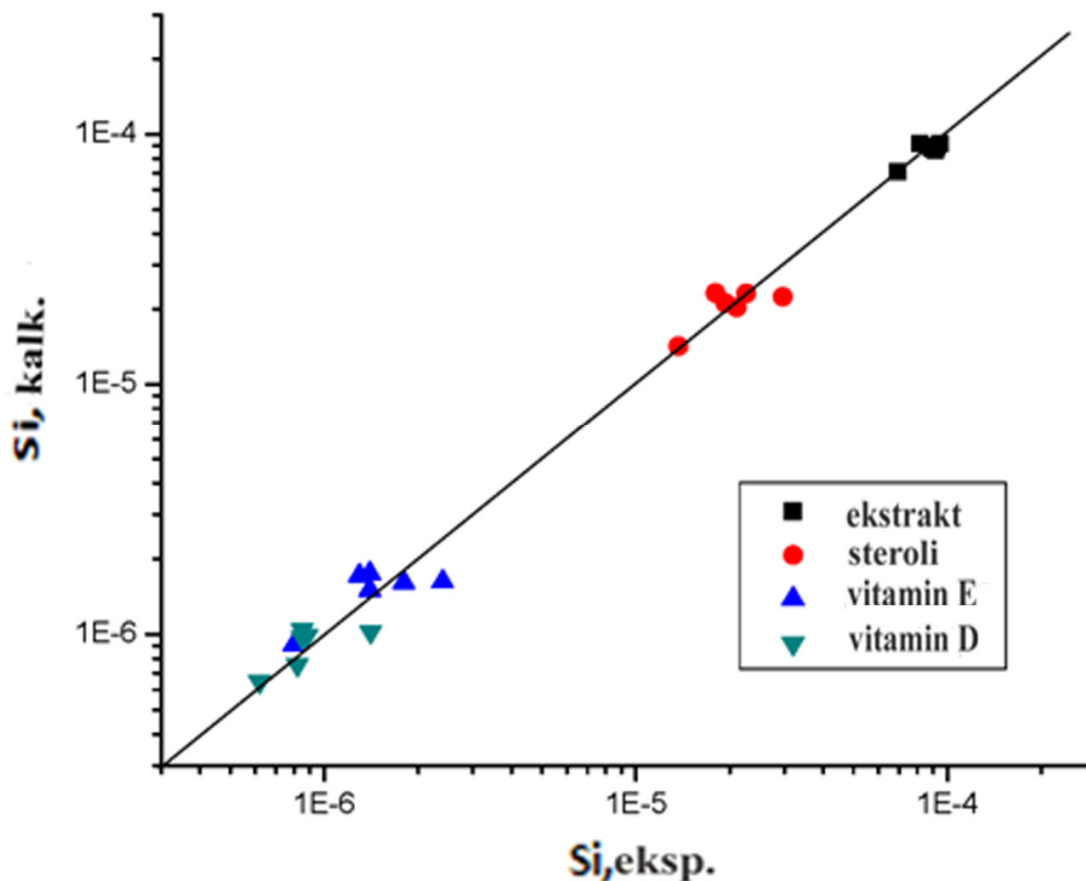
Tabela 24. Koeficijenti a , b i c polinoma drugog reda (Jednačina 54)

Koeficijent	Totalni ekstrakt	Steroli	Vitamin E	Vitamin D
$a10^5$	-22,10	-15,39	-1,044	-0,947
$b \cdot 10^8$	5,493	2,972	0,260	0,0181
$c \cdot 10^{12}$	-2,412	-1,244	-0,138	-0,0775
X koef. koji definiše $S_{i,max}$ ili $y_{i,max}$	11386	11945	9410	11652
Optimalna ρ_{CO_2} kg/m ³ koja definiše $S_{i,max}$ ili $y_{i,max}$	830-870	870	830	886
Optimalna temperatura, K	310-320	310	315-320	310-315
Optimalni pritisak, MPa	20-25	20-25	20-25	20-25

Određivanje optimalnih uslova na kojima je najveća molarna rastvorljivost totalnog ekstrakta kao i molskih udela sterola, vitamina E i vitamina D u ekstraktu potvrđuju rezultate prethodnih istraživanja, analize prinosa totalnog ekstrakta u odnosu na gustinu NK CO₂ i mnogo sveobuhvatniju i detaljniju analizu, RSM i CCRD metodologiju analize uticaja procesnih parametara na prinos ekstrakta i njegovog sastava i definisanja optimalnih uslova NKE. Pokazalo se da definisana optimalna vrednost parametra X, može biti od koristi za određivanje i definisanje optimalne molarne rastvorljivosti totalnog ekstrakta, kao i molskih udela njegovih konstituenata sterola, vitamina E i vitamina D, kao što je i prikazano u Tabeli 24.

Odnos između određenih vrednosti molarne rastvorljivosti totalnog ekstrakta i molskih udela sterola, vitamina E i vitamina D i eksperimentalnih vrednosti stvarnih molarnih

rastvorljivosti totalnog ekstrakta, molskih udela sterola, vitamina E i vitamina D, izračunat pomoću jednačine 54, je prikazan na slici 45.



Slika 45. Poređenje izračunatih (jednačina 54) i eksperimentalnih stvarnih vrednosti molarnih rastvorljivosti totalnog ekstrakta, i molskih udela sterola, vitamina E i vitamina D. Koeficijent korelacije ove zavisnosti je $r^2=0,992$.

Rezultati eksperimentalno definisanih stvarnih molarnih rastvorljivosti totalnog ekstrakta su približni podacima drugih autora za njihovo definisanje iz drugih biljnih sirovina. Stvarna rastvorljivost totalnog ekstrakta odnosno triacilglicerola kao glavne komponente ekstrakta (85%) grčkog semena je u opsegu $0,7-1 \cdot 10^{-4}$ (mol/mol_{CO2}), dok su rezultati drugih autora zabeležili vrednosti od $0,7-8,8 \cdot 10^{-3}$ u slučaju ekstrakcije kukuruza i $0,2-9,9 \cdot 10^{-3}$ u slučaju ekstrakcije suncokreta (Yu i sar, 1994; Temell i sar, 2000; Soares i sar, 2007). Definisana

molarna rastvorljivost molskih udela sterola je bila u u opsegu od $1-3 \cdot 10^{-5}$, što je približno vrednostima zabeleženim za stigmasterol i holesterol, $0,2-6 \cdot 10^{-5}$ i $0,23-14,5 \cdot 10^{-5}$, respektivno (Li i sar, 2015; Yun i sar, 1991; Güçlü-Üstündağ i sar, 2004). Veća razlika je primećena u determinisanim vrednostima molskog udela vitamina E i vitamina D₃, u opsegu od $1-2,5 \cdot 10^{-6}$ i $6-15 \cdot 10^{-7}$, respektivno, po prethodnim istraživanjima molarne rastvorljivosti ovih komponenata kao čistih jedinjenja bile u opsezima od $0,6-3,5 \cdot 10^{-3}$ i $0,56-5,26 \cdot 10^{-3}$ (Li i sar, 2015; Yun i sar, 1991, Güçlü-Üstündağ i sar, 2004). Razlika u vrednostima eksperimentalno određenih molarnih rastvorljivosti totalnog ekstrakta, i molskih udela njegovih konstituenata sterola, vitamina E i D, iz grčkog semena u odnosu na ove literaturne podatke može biti jer je u njima molarna rastvorljivost komponenata određivanja u njihovoj čistoj formi jedinjenja, za razliku od ekstrakta koji je dobijen NKE ekstrakcijom iz grčkog semena i koji se definiše kao molski udeo u totalnom ekstraktu po molu NK CO₂. Količina i matriks grčkog semena takođe ima veliku i specifičnu ulogu u ekstrakciji sterola i vitamina E i D i definisani podaci molarne rastvorljivosti su različiti od definisanih molarnih rastvorljivosti čistih komponenata. Njihova izolacija je uslovljena i prisustvom drugih komponenata, kao i njihovim položajem i skladištenjem u biljnom matriksu grčkog semena.

4.2.3. Dobijanje ekstrakata bogatih nezasićenim masnim kiselinama (FAME) iz grčkog semena

4.2.3.1. Ekstrakti grčkog semena bogati nezasićenim masnim kiselinama (FAME)

Dobijeni natkritični ekstrakti iz grčkog semena bili su žućkaste boje i u viskoznijem tečnom stanju, kao i njegovi etanolni ekstrakti koji su pokazali veću viskoznost. Prinosi ekstrakcija dobijenih Sokslet ekstrakcijom, SKE i NKE na različitim uslovima pritiska i temperature prikazani su u tabeli 25. Primenjeni su različiti uslovi SKE i NKE na različitim vrednostima procesnih parametara pritiska i temeprature koji su definisali i različitu gustinu CO₂, a samim tim i njegovu moć rastvaranja.

Tabela 25. Prinosi ekstrakata izolovanih NKE iz grčkog semena *Trigonella foenum graecum*

Metoda	Temperatura (°C)	Pritisak (MPa)	Prinos (%)
Sokslet ekstrakcija	/	/	29,217
SKE	25	30	1,916
NKE 1	40	20	2,163
NKE 2	40	30	2,110
NKE 3	50	30	2,235
NKE 4	50	20	1,829

Najveći prinos potencijalnih hipolipemičnih ekstrakata, sa znatnim sadržajem nezasićenih masnih kiselina (FAME) ostvaren je pri NKE 3 na 50 °C i 30 MPa, neznatno više od prinosa ostvarenim pri NKE 1 na uslovima od 40 °C i 20 MPa, i pri NKE 2 na 40 °C i 30 MPa. Najniži prinos ostvaren je pri NKE 4 na 50 °C i 20 MPa. Neznatno veći prinos od NKE 4 na 50 °C i 20 MPa, postignut je primenom SKE na 25 °C i 30 MPa.

4.2.3.2. Sadržaj FAME u ekstraktima dobijenim SKE i NKE grčkog semena

Derivatizacijom ekstrakata grčkog semena ekstrakcijom po Soksletu uz upotrebu etanola kao ekstragensa, SKE i NKE na različitim uslovima temperature i pritiska dobijeni su metil estri nezasićenih masnih kiselina sa ciljem njihove kvalitativne i kvantitativne identifikacije. Ekstrakti dobijeni NKE na različitim procesnim uslovima, ekstrakcijom po Soksletu i SKE su sadržali slične profile sastava FAME, sa tim što su u najvećem procentu zastupljeni metil linoleat (~40 %), metil linolenat (~40 %) i metil palmitat (~10 %), metil stearat (~4 %) dok su ostali metil estri nezasićenih kiselina bili zastupljeni u ekstraktima procentualno od 0,09 do 2,4 %.

U tabeli 26. prikazan je hemijski sastav identifikovanih FAME ekstrakata sa potencijalnim hipolipemijskim dejstvom izolovanih iz grčkog semena (Kahn i sar, 1963; Yu i sar, 1995). Identifikovano je 10 metil estara nezasićenih masnih kiselina. Kvalitativan i kvantitativan sastav metil estara nezasićenih masnih kiselina predstavljen je u tabeli 26. U najvećoj količini su bili zastupljeni metil linoleat (37,63-40,68%), metil linolenat (38,89-41,98%) i metil palmitat (9,37-

10,62%), dok je količina ostalih metil estara nezasićenih masnih kiselina bila u znatno manjem procentu.

Tabela 26. Identifikovane FAME u ekstraktima dobijenim Sokslet ekstrakcijom, SKE i NKE grčkog semena

Metil estri nezasićenih masnih kiselina	KI	SKE % m/m	NKE₁ % m/m	NKE₂ % m/m	NKE₃ % m/m	NKE₄ % m/m	Sokslet % m/m
Metil palmitat	1921	9,37	10,13	9,44	9,82	9,90	10,62
Metil margarat	2030	0,32	0,33	0,33	0,36	0,34	0,53
Metil linoleat	2095	40,68	38,89	40,46	39,98	39,84	37,63
Metil linolenat	2101	41,98	41,93	41,57	41,13	41,88	38,89
Metil oleat	2103	0,09	0,85	0,58	0,72	0,54	0,67
Metil stearat	2124	4,30	4,60	4,40	4,47	4,30	3,87
Metil 11-eikozanoat		0,57	0,82	0,53	0,59	0,54	1,29
Metil-eikozanoat	2332	1,23	1,26	1,30	1,33	1,23	0,99
Metil heneikozanoat	2430	0,15	0,19	0,14	0,12	0,19	1,00
Metil behenat	2530	0,81	0,77	0,71	0,84	0,69	2,40

SKE-ekstrakcija subkritičnim CO₂ na 25°C i 30 MPa

NKE₁- natkritična ekstrakcija na 40°C i 20 MPa

NKE₂- natkritična ekstrakcija na 40°C i 30 MPa

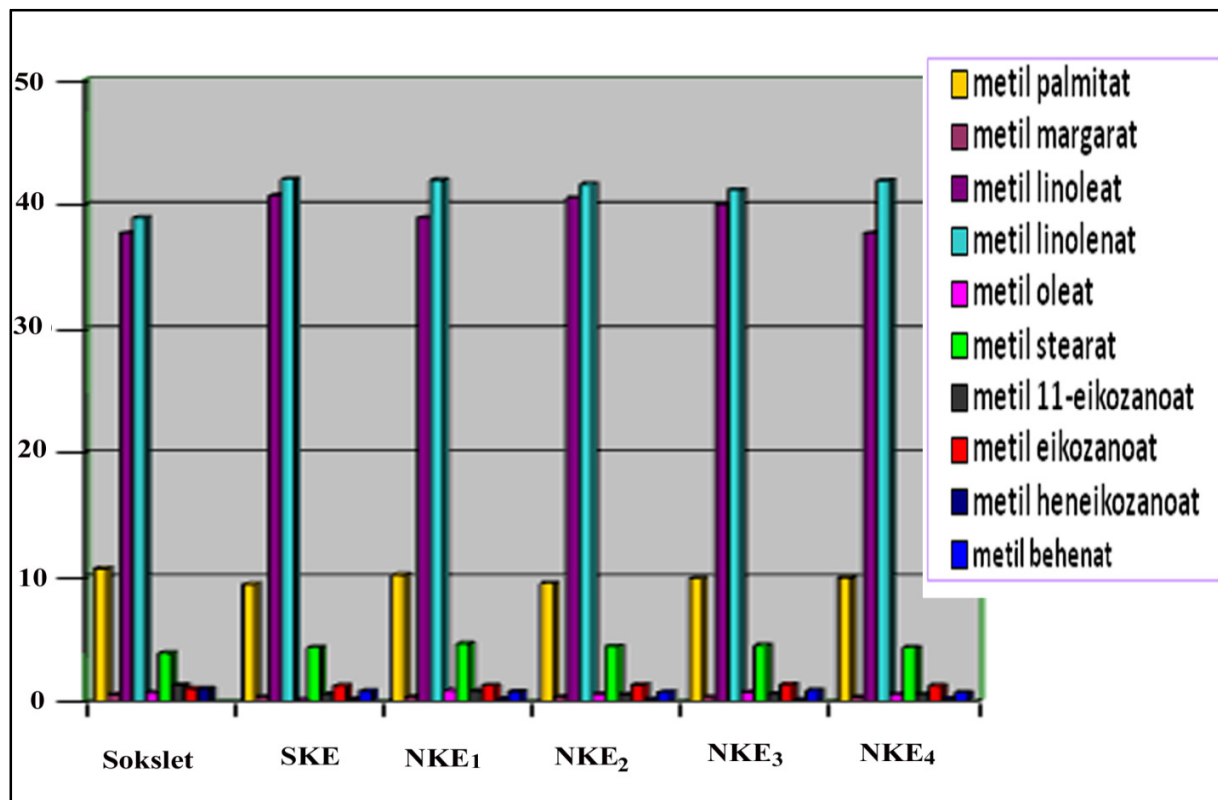
NKE₃- natkritična ekstrakcija na 50°C i 30 MPa

NKE₄- natkritična ekstrakcija na 50°C i 20 MPa

Sokslet-ekstrakcija po Soksletu , 70 %-tnim etanolom

KI- Kovačevi indeksi

Profil sastava FAME dobijenih etanolnom ekstrakcijom po klasičnoj metodi, SKE i NKE na različitim procesnim uslovima pritiska i temperature su prikazani na slici 46.



Slika 46. Sastav FAME u ekstraktima grčkog semena dobijenih različitim metodama ekstrakcije,

Derivatizovani ekstrakti analizirani GC/MS hromatografijom, sadržali su po 10 FAME. Natkritični ekstrakt dobijen na 20 MPa i 50°C sadržao je najveću količinu FAME (99,77 %), dok su ekstrakti dobijeni etanolnom ekstrakcijom po Soksletu sadržali najniži procenat FAME (97,89 %), ali je njihova razlika u sadržaju i količini FAME svakako bila neznatna. Ekstrakti dobijeni pomoću ugušćenog CO₂ imali su približno isti sadržaj FA (oko 99,5 %). Svi dobijeni ekstrakti su u najvećoj količini sadržali metil linoleat (~40 %), metil linolenat (~40 %) i metil palmitat (~10 %).

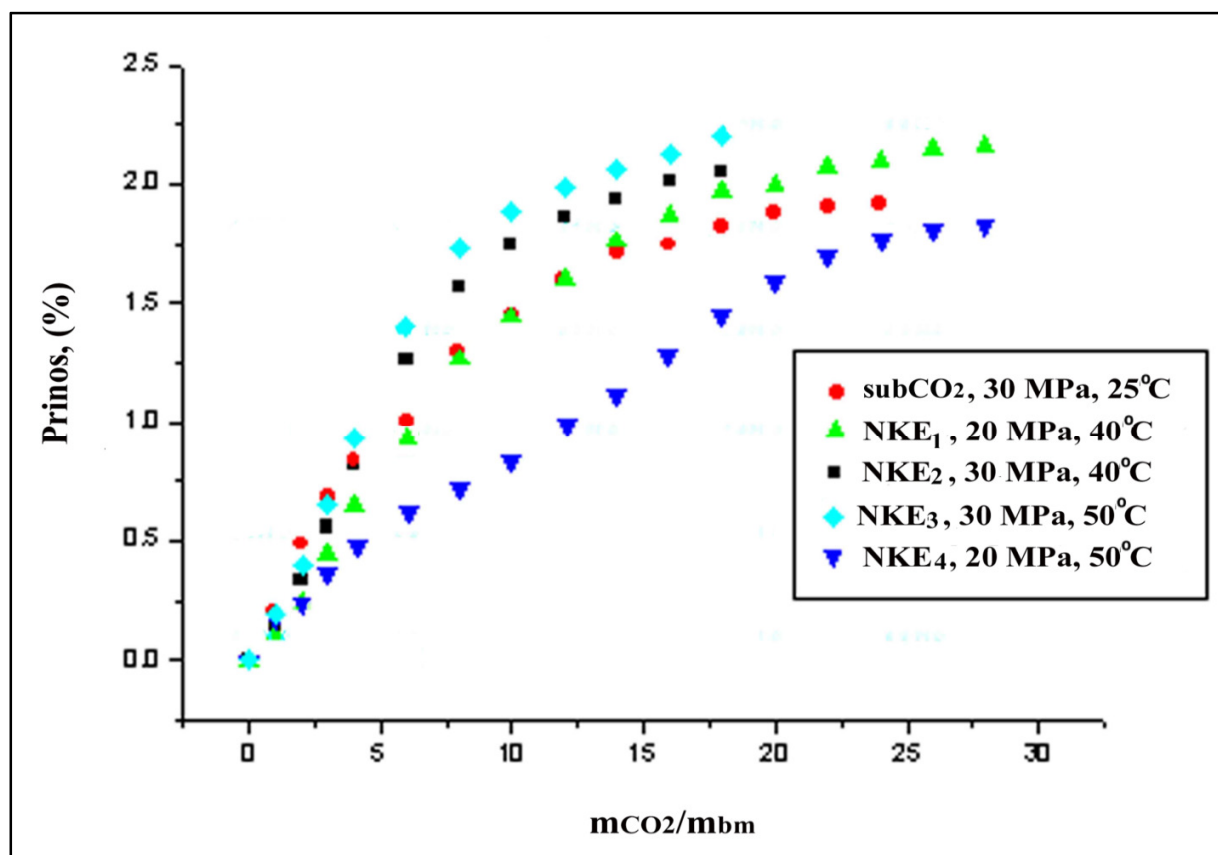
4.2.3.3. Kinetika SKE i NKE grčkog semena

U toku NKE i SKE merena je masa izdvojenog ekstrakta i računat maseni prinos ekstrakta (55) u odnosu na specifičnu količinu utrošenog NK CO₂ (kg_{CO2}/kg_{bm}).

$$Y(\%, w/w) = \frac{m_e}{m_{bm}} \cdot 100 \quad (55)$$

Biljni materijal je mleven i prosejan sitima 0,2 i 0,6 mm, pri čemu je frakcija čestica srednjeg prečnika $d_p=0,4$ mm, korišćena u eksperimentima. Početna masa biljnog materijala bila je 50 g. Usitnjeni i prosejani biljni materijal je izlagan NK CO₂ sve dok ekstrakcione krive koje pokazuju zavisnost prinosa ekstrakta od specifične potrošnje NK CO₂ ne zaustave rast na grafikonu što se meri izjednačavanjem u merenju tri uzastopne tačke.

Kinetika NKE grčkog semena na različitim uslovima temperature i pritiska i subCO₂ u zavisnosti od vremena trajanja ekstrakcije izraženog šreko količine utrošenog CO₂ za vreme procesa ekstrakcije prikazana je na slici 47.



Slika 47. Prinos frakcije NKE grčkog semena u zavisnosti od specifične količine rastvarača za sve primenjene uslove pritiska i temperature NKE (kg CO₂/kg biljnog materijala).

Najveći prinos ekstrakcije ostvaren pri NKE za uslove ekstrakcije na 30MPa i 50°C (2,235 %), a najmanji kod uslova NKE na 50°C i 20MPa (1,829 %). Veći prinos pri nižem pritisku i temperaturi objašnjava se većom gustinom i difuzivnošću NK CO₂. S druge strane manji prinos pri većoj temperaturi objašnjava se smanjenjem gustine rastvarača.

5. ZAKLJUČAK

•Primenom SKE i NKE sa CO₂ na biljne sirovine matičnjak i grčko seme, u širokom opsegu procesnih parametara, izolovani su različiti potencijalno biološki aktivni ekstrakti. Dobijeni ekstrakti su okarakterisani značajnim sadržajem fenolnih komponenti, monoterpena, seskviterpena, FAME i njihovih aldehida i alkohola iz matičnjaka, i diosgenina, sterola, vitamina E i vitamina D, kao i nezasićenih masnih kiselina, iz grčkog semena, i oni su poznati po svojoj antioksidativnoj i hipolipemičnoj aktivnosti, a značajno je da su definisani optimalni procesni uslovi za postizanje njihovog maksimalnog prinosa.

1. Subkritična i natkritična ekstrakcija matičnjaka

1.1. Izolovanje antioksidativnih frakcija i optimizacija njihovog dobijanja natkritičnom ekstrakcijom iz matičnjaka

- Metod dobijanja ekstrakata sa sadržajem različitih grupa jedinjenja iz matičnjaka primenom dvostepene frakcione natkritične ekstrakcije sa ugljenik(IV)-oksidom, analiziran je u odnosu na kvalitativni i kvantitativni sastav dobijenih etarskih ulja i ekstrakata. Dvostepenom frakcionom ekstrakcijom iz matičnjaka prvobitno su izolovana etarska ulja natkritičnom ekstrakcijom, a zatim je izolovana druga frakcija bogata supstancama nosiocima hipolipemijske i antioksidantne aktivnosti subkritičnom i natkritičnom ekstrakcijom.
- U zavisnosti od primenjenih uslova drugog stepena ekstrakcije na pritisku od 30MPa i temperaturi u opsegu od 25–100 °C, menjala se selektivnost ekstrakcionog procesa prema komponentama nosiocima antioksidativne aktivnosti. Pokazalo se da je dvostepena frakciona ekstrakcija omogućila izolovanje veće količine komponentata sa značajnim antioksidativnim potencijalom, poput fenolnih komponentata kao što su eugenol i timol, ekstrakciju alkohola i voskova, koji nisu bili prisutni u prvoj frakciji ekstrakcije i etarskom ulju dobijenom hidrodestilacijom.
- Izolovanje druge frakcije na subkritičnim uslovima ispod kritične temperature za CO₂, a na pritisku iznad kritičnog je imalo za rezultat postizanje manjeg prinosa u odnosu na prinose druge frakcije ostvarene u natkritičnim uslovima. Međutim selektivnost subkritične ekstrakcije je bila veća u odnosu na monoterpene i seskviterpene (45,1%) u odnosu na selektivnost natkritične ekstrakcije pri različitim procesnim uslovima (17–29%).

- Iako je postojala mala razlika u gustini CO₂ na subkritičnim uslovima od 30 MPa/25°C u odnosu na natkritične uslove na 30 MPa/40°C , $966(t_{25}) < 967(t_c) < 929(t_{40})$ kg/m³, pokazalo se da subkritična ekstrakcija pokazuje veću selektivnost prema oksigenovanim komponentama matičnjaka.
- Ekstrakti dobijeni drugom frakcijom kako subkritičnom, tako i natkritičnom na različitim uslovima pritiska i temperature, pokazali su znatan sadržaj nezasićenih masnih kiselina i njihovih metil estara u odnosu na etarska ulja dobijena prvom frakcijom NKE i hidrodestilacijom.
- Određivanjem antioksidativne aktivnosti dobijenih ekstrakata matičnjaka dvostepene frakcione ekstrakcije metodom DPPH testa, ustanovljeno je da su najveći antioksidativni potencijal pokazali ekstrakti dobijeni natkritičnom ekstrakcijom druge frakcije (30 MPa/40°C i 30 MPa/100°C). Analizom i poređenjem sastava ekstrakata, može se pretpostaviti da jača antioksidativna aktivnost ovih ekstrakata potiče od većih količine timola i eugenola kao i težih komponenata (diterpena, alkohola).
- Pseudo kinetički model primenjen na simulaciju ekstrakcionog procesa je pokazao dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima. Dobijene vrednosti parametara modela su su ukazale na manje vrednosti koeficijenata prenosa mase za subkritični CO₂ u odnosu na one dobijene za natkritični CO₂. Sa druge strane koeficijent prenosa mase je imao veće vrednosti za prvi stepen ekstrakcije tj. izolovanje prve frakcije etarskog ulja u odnosu na drugoi stepen ekstrakcije. Razlika u parametrima modela Sovove je pokazala bolju dostupnost etarskog ulja izolovanog na nižem pritisku (10 MPa) u prvoj frakciji ekstrakcije u odnosu na sekundarne metabolite izolovane na višem pritisku (30 MPa) u drugoj frakciji ekstrakcije koji su skladišteni dublje u biljnom matriksu

2. Natkritična ekstrakcija grčkog semena

2.1. Dobijanje ekstrakata bogatih sadržajem diosgenina i optimizacija njegovog dobijanja natkritičnom ekstrakcijom iz grčkog semena

- Predtretmanom grčkog semena u vidu odmaščivanja i hidrolize, koje je prethodilo natkritičnoj CO₂ ekstrakciji, omogućeno je izolovanje prečišćenijih ekstrakata obogaćenim diosgeninom kao aktivnom komponentom, sa mogućom primenom kao hipolipemika, u biljnim preparatima namenjenim za snižavanje holesterola, regulaciji krvnog pritiska i prekursora steroidnih hormona.

- Analizom uticaja procesnih parametara natkritične ekstrakcije na prinos totalnog ekstrakta i udeo diosgenina u njemu, RSM i CCRD metodologija je uspešno primenjena da opiše i predvidi prinos diosgenina na različitim uslovima ekstrakcije. Analizom uticaja procesnih parametara na prinos diosgenina u ekstrakciji grčkog semena, ustanovljen je značajan uticaj pritiska i količine utrošenog NK CO₂, odnosno vremena ekstrakcije. Nije uočena značajna interakcija između procesnih parametara (pritiska, temperature i količine utrošenog NK CO₂) na prinos diosgenina.
- RSM i CCRD analizom uticaja procesnih parametara na prinos diosgenina, određeni su optimalni uslovi za izolovanje diosgenina natkritičnom ekstrakcijom iz grčkog semena, pri procesnim parametrima: 24,6 MPa, 43,5°C, i 20,87 gCO₂/g_{bm} (količina utrošenog NK CO₂). Maksimalan prinos diosgenina od 0,81 mg diosgenina po jednom gramu grčkog semena (oko 1,3% totalnog ekstrakta) je ostvaren pri determinisanim optimalnim uslovima ekstrakcije. Gustina NK CO₂ pri kojoj je moguće ostvariti maksimalan prinos diosgenina je oko 863 kg/m³.

2.2. Dobijanje ekstrakata bogatih sadržajem totalnih sterola, vitamina E i vitamina D i optimizacija njihovog dobijanja natkritičnom CO₂ ekstrakcijom iz grčkog semena

• RSM i CCRD metoda analize procesnih parametara je takođe, uspešno primenjena za predviđanje optimalnog prinosa totalnog ekstrakta, obogaćenog sterolima, vitaminom E i vitaminom D za definisanje optimalnih uslova za njihov maksimalan prinos sa ciljem primene ekstrakata kao hipolipemika. 3-D odzivne površine RSM analize su omogućile utvrđivanje pojedinačnog uticaja procesnih parametara, kao i sveukupnog dejstva usled međusobne interakcije na prinos totalnog ekstrakta, sterola, vitamina E i vitamina D u njegovom sastavu. Ustanovljen je značajan uticaj linearne i kvadratne veličine temperature na totalni prinos ekstrakta kao i prinos sterola, vitamina E i vitamina D u njemu. Pokazalo se da prinos ekstrakta u najvećoj meri zavisi od temperature i utrošenog NK CO₂, kao i da pritisak i temperatura (odnosno gustina NK CO₂) i utrošeni NK CO₂ su značajni za postizanje maksimalnih količina sterola, vitamina E i vitamina D u dobijenom ekstraktu.

- Analizom uticaja procesnih parametara na prinos totalnog ekstrakta, prinos sterola, vitamina E i vitamina D određeni su optimalni uslovi globalne optimizacije za sve zavisne promenljive, pri kojima je postignut prinos totalnog ekstrakta od 2,39g/100g_{bm}, koji sadrži 16,14%, 1,43% i 0,70% totalnih sterola, vitamina E i vitamina D u dobijenom ekstraktu, respektivno. Količinu dobijenog ekstrakta je moguće ostvariti pri sledećim procesnim uslovima: 24,7 MPa, 41,1 °C i utroškom NK CO₂ od 21,0 gCO₂/g_{bm}.

- Određivanjem molarne rastvorljivosti totalnog ekstrakta i molarne rastvorljivosti sterola, vitamina E i vitamina D koji čine deo sastava ekstrakta, kao i određivanjem parametra $X=T^{0,5}/(SP^*/\rho_{CO_2})$ omogućeno je bolje razumevanje i objašnjenje određenih optimalnih vrednosti za maksimalan prinos totalnog ekstrakta, sterola, vitamina E i vitamina D po RSM i CCRD metodologiji analize. Određivanjem Hildebrandovog parametra rastvorljivosti triacilglicerola, sterola, vitamina E i vitamina D i poređenjem sa parametrom rastvorljivosti NK CO₂ na različitim pritiscima i temperaturama, omogućeno je bolje razumevanje u razlici maksimalnih prinosa među različitim grupama ekstrahovanih jedinjenja na različitim uslovima NKE. Tek utvrđivanjem relacije između stvarne molarne rastvorljivosti totalnog ekstrakta i molskih udela sterola, vitamina E i vitamina D u sastavu ekstrakta i parametra X definisanog temperaturom, gustinom NK CO₂ i parametrom rastvorljivosti SP*, pokazalo se da su pritisak u opsegu od 20- 25 MPa i temperatura od 310-320 K, koji definišu gustinu NK CO₂ u opsegu od 830 do 890 kg/m³, najoptimalniji definisani uslovi za ostvarivanje maksimalnog prinosa ekstrakta i najvećih količina sterola, vitamina E i vitamina D u njegovom sastavu. Određivani parametri rastvorljivosti komponenata ekstrakta dobijenog iz grčkog semena, kao i natkritičnog ugljenik(IV)-oksida, sa izvedenim zavisnostima su definisani kako bi se koristili nadalje u prediktivne svrhe za neke druge uslove natkritične ekstrakcije

2.3. Dobijanje ekstrakata bogatih sadržajem nezasićenih masnih kiselina (FAME) i optimizacija njihovog dobijanja natkritičnom CO₂ ekstrakcijom iz grčkog semena

- Natkritična i subkritična CO₂ ekstrakcija grčkog semena su se pokazale kao pogodne za izolovanje metil estara nezasićenih masnih kiselina, pri čemu je identifikovano 10 metil estara nezasićenih masnih kiselina. U najvećoj količini su bili zastupljeni metil linoleat (37,63-40,68%), metil linolenat (38,89-41,98%) i metil palmitat (9,37-10,62%), dok je količina ostalih metil estara nezasićenih masnih kiselina bila u znatno manjem procentu (0,09-2,4%).

- Najveći prinos ekstrakcije nezasićenih masnih kiselina pri subkritičnoj i natkritičnoj CO₂ ekstrakciji iz grčkog semena ostvaren je pri NKE za uslove ekstrakcije na 30MPa i 50°C (2,235 %), a najmanji kod uslova NKE na 50°C i 20MPa (1,83 %). Veći prinos pri nižem pritisku i temperaturi objašnjava se većom gustinom i difuzivnošću natkritičnog CO₂. Zapaženo je da se prinos ekstrakta neznatno menja sa promenom procesnih uslova.

6. LITERATURA

- Acworth, I. N., The Handbook of Redox Biochemistry. ESA, Inc., Chelmsford, USA, (2003).
- Adachi, Y., Lu, B.C.Y., Supercritical fluid extraction with carbon dioxide and ethylene, Fluid Phase Equilibria 14 (1983) 147-156.
- Adams, R.P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 2007.
- Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A.H., Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomised, placebo controlled trial., J Neurol Neurosurg Psychiatry, 74, (2003), 863- 866.
- Akkay, H., Yilmaz, O., Antioxidant Capacity and Radical Scavenging Activity of *Silybum marianum* and *Ceratonia siliqua*, Turkey, Ekoloji, 21(82), (2012), 9-16.
- Ali, M., Al-Qattan, K. K., Al-Enezi, F., Khanafer, R. M. A., Mustafa, T., Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 62(4), (2000), 253–259.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O., Hamzaoglu, E., Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey, Food Chemistry, 119(1), (2010), 114–122.
- AOAC method, Official Surplus Method 965.4 Fatty Acids in Oils and Fats, Preparation of Methyl Esters, Final Action 1984, Surplus 1965.
- Andrich, G., Balzini, S., Zinnai, A., De Vitis, V., Supercritical fluid extraction insunflower seed technology, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 103, (2001), 151–157.
- Atanassova, M., Georgieva, S., Ivancheva, K., Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinalherbs, J. Univ. Chem. Technol. Metall., 46, (1), (2011), 81–88.
- Atoui, A. K. , Mansouri, A. , Boskou, G. , Kefalas, P. , Their antioxidant activity and phenolic profile, Food Chemistry, 89(1), (2005), 27-36.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, Journal of Food Engineering, 117(4),(2013), 426–436.
- Babovic, N., Djilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, S., Zizovic, I., Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity, Innov. Food Sci. Emerg. Technol., 11, (2010), 98–107.
- Babovic, N., Petrović, S., Antioxidants from Lamiaceae herbs, In: Food Quality: Control, Analysis and Consumer Concerns, Ed. By Daniel A. Medina, Amanda M. Laine, (2011), 311-335.
- Nova Science Publishers
- Bahmani, M., Mirhoseini, M., Shirzad, H., Sedighi, M., Shahinfard, N. , Rafieian-Kopaei, M. , A Review on Promising Natural Agents Effective on Hyperlipidemia, Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine, 2015, Vol. 20(3), 228-238.
- Bahmani, M. , Eftekhari, Z. , Saki, K. , Fazeli-Moghadam, E. , Jelodari, M. , Rafieian-Kopaei, M. , Obesity Phytotherapy: Review of Native Herbs Used in Traditional Medicine for

- Obesity, *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, (2015a), doi:10.1177/2156587215599105.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., Biological effects of essential oils-a review, *Food and Chemical Toxicology*, 46, (2008), 446–475.
- Bartle, K.D., Clifford, A.A., Hawthorne, S.B., Langenfeld, J.J., Miller, D.J., Robinson, R., A model for dynamic extraction using a supercritical fluid. *Journal of Supercritical Fluids* 3, (1990), 143-149.
- Basch, E., Ulbricht, C., Kuo, G., Szapary, Ph., Smith, M., Therapeutic Applications of Fenugreek, *Alternative Medicine Review*, (2003), 21-24.
- Becker, E. M., Nissen, L. R., Skibsted, L. H., Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219, (2004), 561-571.
- Belguith-Hadriche, O., Bouaziz, M., Jamoussi, K., Feki, A. E., Sayadi, S., Makni-Ayedi, F., Lipid-Lowering and Antioxidant Effects of an Ethyl Acetate Extract of Fenugreek Seeds in High-Cholesterol-Fed Rats, *J. Agric. Food Chem.*, 58 (4), (2010), 2116–2122.
- Bhattaram, V. A. , Graefe, U. , Kohlert, C. , Veit, M. , Derendorf, H. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products, *Phytomedicine, Supplement III*, 9, (2002), 1–33.
- Bogdanovic, A., Tadic, V., Stamenic, M., Petrovic, S., Skala, D., Supercritical carbon dioxide extraction of *Trigonella foenum-graecum* L. seeds: Process optimization using response surface methodology, *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, (2016), 44–50.
- Bolkent, S., Yanardag, R., Karabulut-Bulan, O., Yesilyaprak, B., Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: A morphological and biochemical study, Turkey, 2005, *Journal of Ethnopharmacology*, 99, (2005), 391–398.
- Bordia, A., Verma, S.K., Srivastava, K.C., Effect of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) on blood lipids, blood sugar and platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 56, (1997), 379-384.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT Food Sci. Technol.*, 28(1), (1995), 25–30.
- Brenac, P., Sauvaire, Y., Accumulation of sterols and steroidal sapogenins in developing fenugreek pods: possible biosynthesis in situ, *Phytochemistry*, 41(2), (1996), 415-422.
- Brunner, G., Supercritical fluids: technology and application to food processing, *Journal of Food Engineering* 67 (2005) 21–33.
- Box, G. E. P., Hunter, W. G., Hunter, J. S., *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*, In: (1978).
- Box, K.G., G. E. P. & Wilson, On the experimental attainment of optimum conditions, *J. R. Stat. Soc.*, 13, (1951), 1–45.
- Cavero, S., García-Risco, M.R., Marín, F.R., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F.J., Reglero, G., Ibañez, E., Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano, chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays, *Journal of Supercritical Fluids*, 38, (2006), 62-69.
- Cerdon, C., Rahier, R., Taton, M., Sauvair Y., Effect of diniconazole on sterol composition of roots and cell suspension cultures of fenugreek, *Phytochemistry*, 39(4), (1995), 883-893.
- Ciftci, O.N., Przybylski, R., Rudzinska, M., Acharya, S., Characterization of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88, (10), (2011), 1603-1610.

- Child, P. , Kuksis, A., Critical role of ring rtructure in the differential uptake of cholesterol and plant sterols by membrane preparations in vitro, *Journal of Lipid Research* 24, (1983), 1196–1209.
- Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Hawkins, J.M., Lundberg, W.O., Antioxidant properties of natural spices, *Food Res.*,17, (1952), 46–55.
- Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Hawkins, J.M., Lundberg, W.O., The antioxidant properties of spices in foods, *Food Technol.*, 10, (1956), 209–211.
- Chrastll, J. Solubility of Solids and Liquids in Supercritical Gases, *The Journal of Physical Chemistry*, 86(15), (1982), 3016-3021.
- Chung, M. J., Cho, S.-Y., Javidul, M., Bhuiyan, H., Heon Kim, K., Lee, S.-J., Anti-diabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose- and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice, *Korea 2010, British Journal of Nutrition*, (2010), 104, 180–188.
- Council of Europe, *European Pharmacopoeia*, Sixth Edition 6.0, Volume 2, Strasbourg, 1882, 2355-2356.
- Cuvelier, M. E., Richard, H., Berset, C., Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56, (1992), 324-327.
- Czinner, E., Kery, A., Hagymasi, K., Blazovic, A., Lugasi, A., Szokeland, E., Lemberkovics, E., Biologically active compounds of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *European Journal of Drug metabolism and pharmacokinetics*, 24(4) (1999), 309-313.
- Czygan, F.-C., Frohne, D., Holtzel, C., Nagell, A., Pfander, H.J., Willuhn, G., Buff, W., *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, (2001), 203-205, 329-332.
- Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Djilas, S., Tumbas, V., Bogdanović, G., Mandić, A., Markov, S., Cvetković, D., Čanadanović, V., *Journal of Medicinal Food*, 11(1), (2008), 133-143.
- Dab 10, *Deutsches Arzneibuch*, Band 3, Monographien M-Z, Stuttgart , 1991.
- Das, S., Vasisht, S., Das, S.N., Srivastava, L.M., Correlation between total antioxidant status and lipid peroxidation in hypercholesterolaemia, *Current Science* 78, (2000), 486–487.
- Dhandhukia, P.C., Thakkar, V.R., Response surface methodology to optimize the nutritional parameters for enhanced production of jasmonic acid by *Lasiodiplodia theobromae*., *J. Appl. Microbiol.*, 105, (2008), 636–43.
- Dickinson, J. T. US. Patent 2660590, 1947.
- Edris, A. E., Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review, *Phytotherapy Research*, 21(4), (2007), 308–323.
- Elksibi, I., Haddar, W., Ben Ticha, M., Gharbi, R., Mhenni, M.F., Development and optimisation of a non conventional extraction process of natural dye from olive solid waste using response surface methodology (RSM)., *Food Chem.*, 161, (2014), 345–52.
- Emamghorishi, M., Talebianpour, M.S., Antidepressant effect of *Melissa officinalis* in the forced swimming test. *DARU J Pharm Sci*, 17, (2009), 42-47.
- ESCOPE, *European Scientific Cooperative on Phytotherapy*, Monographs, On the Medicinal Uses of Plant Drugs, 1996, 1-3.
- Fedors, R. F., A method for estimating both the solubility parameters and the molar volumes of liquids, *Polymer Engineering and Science*, 14, (1974), 147-154.

- Fornari, T., Hernández, E. J., Reglero, G., Correlating the solubility of supercritical gases in high molecular weight substances using a density-dependent equation, *American Institute of Chemical Engineers*, 57(3), (2011), 765–771.
- Gamse, T., Schwinghammer, S., Marr, R., Generation of finest particles by use of supercritical fluids, *Chemie-Ingenieur-Technik*, 77(6), (2005), 632, 669-680.
- Gaspar, F., Leeke, G.A., Al-Duri, B., Santos, R., Modelling the disruption of essential oils glandular trichomes with compressed CO₂. *Journal of Supercritical Fluids* 25, (2003b), 233-245.
- Gaspar, F., Lu, T., Santos, R., Al-Duri, B., Modelling the extraction of 70 essential oils with compressed carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* 25, (2003a), 247-260.
- Gebhardt, R., Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts., *J Pharmacol Exp Ther.*, 286 (3), (1998), 1122-1128.
- Ghada, Z. A. S., Tamer, M. M. S., Effect of *Cynara Scolymus* L. (Artichoke) Extract on Lipid Profile of Hyperlipidemic Male Rats, *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 37, (2009), 733-741.
- Ghafoor, K., Park, J., Choi, Y.-He., Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3), (2010), 485–490.
- Ghorbani, A., Phytotherapy for diabetic dyslipidemia: evidence from clinical trials, *Clin. Lipidol.* 8(3), (2013), 311–319.
- Ghoreishi, S.M., Bataghva, E., Dadkhah, A.A., Response surface optimization of essential oil and diosgenin extraction from *Tribulus terrestris* via supercritical fluid technology, *Chem. Eng. Technol.*, 35, (1), (2012), 133–141.
- Giovanni, M., Response surface methodology and product optimization, *Food Technol.*, 37, (1983).
- Glisic, S., Ivanovic, J., Ristic, M., Skala, D., Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes, *Journal of Supercritical Fluids*, 52, (2010), 62-70.
- Glišić, S., Milojević, S.Ž., Dimitrijević, S. I., Orlović, A. M., Skala, D. U., Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics, *J. Serb. Chem. Soc.*, 72(4), (2007), 311-320.
- Goodarznia, I., Eikani, M.H., Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils: Modeling and simulation. *Chemical Engineering Science* 53, (1998), 1387-1395.
- Goto, M., Sato, M., Hirose, T., Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 26, (1993), 401-407.
- Groll, H. P. A. *German Auslegeschr.* 1079 636, 1953.
- Güçlü-Üstündağ, Ö., Temelli, F., Correlating the solubility behavior of minor lipid components in supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*, 31(3), (2004), 235-253.
- Hagers Handbuch Der, Pharmazeutischen praxis, Berlin, 1969; 268-272, 759-762.
- Halliwell, B., Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochememical Pharmacology*, 49, (1995), 1341-1348.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford, Oxford University Press, (1989), 22-85.

- Halliwell, B., Whiteman, M., Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the result mean ? *British Journal of Pharmacology*, 142, (2004), 231-255.
- Hamburger, M., Bauman, D., Adler, S., Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants-effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances, *Phytochemical Analysis*, 15, (2004), 46-54.
- Hannan, J.M.A., Rokeya, B. , Faruque, O. , Nahar, N., Mosihuzzaman, M., Azad Khan, A.K., Ali, L., Effect of soluble dietary fibre fraction of *Trigonella foenum graecum* on glycemic, insulinemic, lipidemic and platelet aggregation status of Type 2 diabetic model rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1), (2003), 73–77.
- Hasani-Ranjbar , S., Nayebi , N. , Moradi , L. , Mehri , A. , Larijani , B. , Abdollahi , M. , The efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of hyperlipidemia; a systematic review, *Curr Pharm Des.*, 16(26), (2010), 2935-47.
- Henika, R.G., Simple and effective system for use with response surface methodology, *Cereal Sci. Today.*, 17(10), (1972), 309–314, 334.
- Henika, R.G., Use of response surface methodology in sensory evaluation, *Food Technol.* 36 (1982) 96– 101.
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E., Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae, A review, *Food Chemistry*, 98, (2006), 136–148.
- H. in H.J.H.M.& D.M.H.T. Moskowitz, Product optimization approaches and applications., in: *Meas. Food Prefer. I*, Eds., Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK, 1994: pp. pp. 97–136.
- Hildebrand, J.H., *The Solubility of Non-electrolytes*, Reinhold, New York, 1936.
- Hong, I.K., Rho, S.W., Lee, K.S, W.H. Lee, Yoo, K.P., Modeling of soybean oil bed extraction with supercritical carbon dioxide, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 7, (1990), 40-46.
- Hoppe, H. A., *Taschenbuch der Drogenkunde*, Berlin, 1981; 180, 291.
- Huang, W., Li, Z., Niu, H., Li, D., Zhang, J., Optimization of operating parameters for supercritical carbon dioxide extraction of lycopene by response surface methodology, *J. Food Eng.*, 89, (2008), 298–302.
- Ivanovic, J., Ristic., M., Skala, D., Supercritical CO₂ extraction of *Helichrysum italicum*: Influence of CO₂ density and moisture content of plantmaterial, *Journal of Supercritical Fluids*, 57, (2011b), 129-136.
- Ivanovic, J., Zizovic, I., Ristic, M., Stamenic, M., Skala, D., The analysis of simultaneous clove/oregano and clove/thyme supercritical extraction, *Journal of Supercritical Fluids*, 55, (2011a), 983-991.
- Jemai, H., Fki, I., Bouaziz, M., Bouallagui, Z., El Feki, A., Isoda, H., Sayadi, S., Lipid-Lowering and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Its Triacetylated Derivative Recovered from Olive Tree Leaves in Cholesterol-Fed Rats, *J. Agric. Food Chem.*, 56, (2008), 2630–2636.
- Jončić R., Stošić D., Dukić N. M., Lakušić B., *Aromatične biljke Srbije*, NIP Dečje novine, Beograd – Gornji Milanovac.), (1995).

- Jong, A. D., Plat, J. Mensink, R.P., Metabolic effects of plant sterols and stanols (review), *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(7), (2003), 362–369.
- Jun, H.-J., Lee, J. H., Jia, Y., Hoang, M.-H., Byun, H., Heon Kim, K., Lee, S.-J., *Melissa officinalis* Essential Oil Reduces Plasma Triglycerides in Human Apolipoprotein E2 Transgenic Mice by Inhibiting Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c–Dependent Fatty Acid Synthesis, *The Journal of Nutrition*, 142, (2012), 432–440.
- Jungmin, O., Heonjoo, J., Reum, C.A., Sung-Jin, K., Jaejoon, H., Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas, *Food Control*, 31(2), (2013), 403–409.
- Kagliwal, L. D., Patil, S. C., Pol, A. S., Singhal, R. S., Patravale, V. B., Separation of bioactives from seabuckthorn seeds by supercritical carbon dioxide extraction methodology through solubility parameter approach, *Separation and Purification Technology*, 80, (2011), 533–540.
- Kahn, S. G., Wind, S., Slocum, A., Pfeffer, D., Yacowitz, H., A study of the hypocholesterolemic activity of the ethyl esters of the polyunsaturated fatty acids of cod liver oil in the chicken. II Effect on serum and tissue cholesterol and aortic and coronary atherosclerosis, *Journal of Nutrition*, 80, (1963), 414–424.
- Kandiah, M., Spiro, M., Extraction of ginger rhizomes: studies with supercritical carbon dioxide. *International Journal of Food Sciences and Technology* 25, (1990), 328–338.
- Kang, L.-P., Zhao, Y., Pang, X., Yu, H.-S., Xiong, C.-Q., Gao, Y., Yu, K., Liu, C., Ma, B.-P., Characterization and identification of steroidal saponins from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* by ultra high-performance liquid chromatography and hybrid time-of-flight mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 74, (2013), 257–267.
- Kassaian, N., Azadbakht, L., Forghani, B., Amini, M., Effect of Fenugreek Seeds on Blood Glucose and Lipid Profiles in Type 2 Diabetic Patients, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 79, (2009), 34–39.
- Kaufmann, B., Rudaz, S., Cherkaoui, S., Veuthey, J.-L., Christen, Ph., Influence of plant matrix on microwave-assisted extraction process. The case of diosgenin extracted from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), *Phytochem. Anal.*, 18, (2007), 70–76.
- Kaviarasan, S., Viswanathan, P., Anuradha, C. V., Fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum*) polyphenols inhibit ethanol-induced collagen and lipid accumulation in rat liver, *Cell Biology and Toxicology*, 23(6), (2007), 373–383.
- Kennedy, D.O., Scholey, A.B., Tildesley, N.T., Perry, E.K., Wesnes, K.A., Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm). *Pharmacol Biochem Behav*, 72, (2002), 953–964.
- Keshmiri, K., Vatanara, A., Yamini, Y., Development and evaluation of a new semi-empirical model for correlation of drug solubility in supercritical CO₂, *Fluid Phase Equilibria*, 363, (2014), 18–26.
- Kiran, E., Balkan, H., High-pressure extraction and delignification of red spruce with binary and ternary mixtures of acetic acid, water and supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 7 (1994) 75–86.
- Knez, Ž., Markočič, E., Leitgeb, M. et al., Industrial applications of supercritical fluids: A review, *Energy*, 77, (2014), 235–243.
- Kochhar, S. P., Rossell, J. B., Detection, estimation and evaluation of antioxidants in food systems, *Food Antioxidants*, Hudson, B. J. F., Ed., Elsevier Applied Science, England, (1990), 19.

- Kubátová, A., Miller, D. J., Hawthorne, S. B., Comparison of subcritical water and organic solvents for extracting kava lactones from kava root, *Journal of Chromatography A*, 923(1–2), (2001), 187–194.
- Kutta, G., Pluhár, Z., Sárosi, S., Fülöp, A.L., Sándor, G., A citromfu (*Melissa officinalis* L.) szuperkritikus extrakciója, *Kertgazdaság*, 41, (1), (2009), 44–52.
- Lee, J., Chae, K., Ha, J., Park, B.-Y., Suk Lee, H., Jeong, S., Kim, M.-Y., Yoon, M., Regulation of obesity and lipid disorders by herbal extracts from *Morus alba*, *Melissa officinalis*, and *Artemisia capillaries* in high-fat diet-induced obese mice, *Journal of Ethnopharmacology*, 115, (2008), 263–270.
- Lee, M. L., Markides, K. E., *Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*. Chromatography Conferences, Inc. Provo, Utah, (1990), 326.
- Li, H., Jia, D., Liu, R., Shen, B., Correlating and estimating the solubilities of solid organic compounds in supercritical CO₂ based on the modified expanded liquid model and the group contribution method, *Fluid Phase Equilibria*, 385, (2015), 10–24.
- Li, Q., Zhang, Z., Zhong, Ch., Liu, Y., Zhou, Q., Solubility of solid solutes in supercritical carbon dioxide with and without cosolvents, *Fluid Phase Equilibria*, 207, (2003), 183–192.
- Liu, B., Lockwood, G. B., Gifford, L. A., Supercritical fluid extraction of diosgenin from tubers of *Dioscorea nipponica*, *Journal of Chromatography A*, 690(2), (1995), 250–253.
- Liu, G., Xu, X., Hao, Q., Gao, Y., Supercritical CO₂ extraction optimization of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using response surface methodology, *LWT - Food Science and Technology*, 42(9), (2009), 1491–1495.
- Mahmood, Z. A., Mohammad, S., Saad bin Zafar, M., Mahwish Armed, K., Herbal treatment for cardiovascular disease the evidence based therapy, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*., 23(1), (2010), 119-124.
- Manna, C., Migliardi, V., Sannino, F., De Martino, A., Capasso, R., Protective effects of synthetic hydroxytyrosol acetyl derivatives against oxidative stress in human cells, *J. Agric. Food Chem.*, 53, (2005), 9602–9607.
- Martinez, J.L., Samuel, V.W., *Supercritical extraction plants-equipment, process and costs*, *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*, Ed. Martínez, J.L., CRC Press, Boca Raton, FL, (2008), 25-48.
- Mebaza, R., Mahmoudi, A., Fouchet, M., Santos, M.D., Kamissoko, F., Nafti, A., Cheikh, R.B., Rega, B., Camel, V., Characterization of volatile compounds in Tunisian fenugreek seeds, *Food Chem.*, 115, (2009), 1326–1336.
- Meilgaard, B.T., Civille, M., G. V., & Carr, *Sensory evaluation techniques*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.
- Mencherini, T., Picerno, P., Scesa, C., Aquino, R., Triterpene, Antioxidant, and Antimicrobial Compounds from *Melissa officinalis*, *J. Nat. Prod.*, 70(12), 2007, 1889–1894.
- Merkli, A., Christen, P., Kapetanidis, I., Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L., *Plant Cell Reports*, 16(9), (1997), 632-636.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Simin, N., Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (9), 2004, 2485–2489.
- Miron, T.L., Herrero, M., Ibanez, E., Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction, *J. Chromatogr. A*, 1288, (2013), 1–9.

- Mohamad Said, K. A., Mohamed Amin, M. A., Overview on the Response Surface Methodology (RSM) in Extraction Processes, *Journal of Applied Science & Process Engineering* 2(1), 2015.
- Montgomery, D. C., *Design and Analysis of Experiments: Response surface method and designs*. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., (2005).
- Nakatani, N., Miura, K., Inagaki, T., Structure of New Deodorant Biphenyl Compounds from thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their activity against methyl mercaptan, *Agr. Biol. Chem.*, 53, (1989), 1375–1381.
- Narender, T., Shweta, A. P., Khaliq, T., Saxena, R., Bhatia, G., Chandra, R., 4-Hydroxyisoleucine an unusual amino acid as antidyslipidemic and antihyperglycemic agent, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(2), (2006), 293–296.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., *Principles of Biochemistry* (4th ed.), (2005), New York, ISBN 0-7167-4339-6.
- Nguyen, K., Barton, P., Spencer, J., Supercritical carbon dioxide of vanilla. *Journal of Supercritical Fluids* 4, (1991), 40-46.
- Nguyen, U., Frankman, G., □Evans, D. A., Process for extracting antioxidants from Labiateae herbs. U.S. Patent, 5,017,397, (1991).
- Oddepally, R., Sriram, G., Guruprasad, L., Purification and characterization of a stable Kunitz trypsin inhibitor from *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds, *Phytochemistry*, 96, (2013), 26–36.
- Oehlert, G. W. *Design and analysis of experiments: Response surface design*. New York: W.H. Freeman and Company, (2000).
- Ölmez, H., Akbas, M.Y., Optimization of ozone treatment of fresh-cut green leaf lettuce, *J. Food Eng.*, 90, (2009), 487–494.
- Ozkal, S. G., Yener, M. E., Salgn, U., Mehmetoglu, U., Response surfaces of hazelnut oil yield in supercritical carbon dioxide, *European Food Research and Technology*, 220(1), (2005), 74–78.
- Palmer, G. H.; Fanwood, N. J. US. Patent 2658907, 1950.
- Peter, S.; Brunner, G.; Riha, R. *Fette, Seifen, Anstrichm.* 1976, 78, 45.
- Petit, P. R., Sauvaire, Y.D., Hillaire-Buys, D.M., Leconte, O.M., Baissac, Y.G., Ponsin, G.R., Ribes, G.R., Steroid saponins from fenugreek seeds: Extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. *Steroids* 60, (1995), 674–680.
- Phogat, P., Deep, A., Chander Sharma, P., Mittal, S. K., Kakkar, S., Goyal, R., Thakral, K., Introduction to Hyperlipidemia and Its Management: A Review, *Pharmacologyonline*, 2, (2010), 251-266.
- Pilat, S.; Godlewicz, M. US. Patent 2 188 012, 1936a.
- Pilat, S.; Godlewicz, M. US. Patent 2 188013, 1936b.
- Pokorny, J., Yanishlieva N., Gordon, M., Introduction, *Antioxidants in food: Practical Applications*, CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, (2001), 1-7.
- Prasad, K., Kalra, J., Oxygen free radicals and hypercholesterolaemic atherosclerosis: effect of Vitamin E. *American Heart Journal* 125, (1993), 958–973.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, (2005), 4290-4302.

- Rang, H. P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K., Farmakologija, (2005), Beograd, 306-313, ISBN 86-7478-008-3.
- Reis-Vasco, E.M., Coelho, J.A.P., Palavra, A.M.F., Marrone, C., Reverchon, E., Mathematical modelling and simulation of pennyroyal essential oil supercritical extraction, *Chemical Engineering Science*, 55, (2000), 2917-2922.
- Resurreccion, A.V.A., Quantitative of quality attributes as perceived by the consumer. In *Consumer sensory testing for product development*, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, MD, 1998.
- Reuter, H.D., *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 2 ^{1,2}, *Pharmacology and Medicinal Application, Phytomedicine*, 2(1), (1995), 73-91.
- Reverchon, E., De Marco, I., Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *Journal of Supercritical Fluids*, 38, (2006), 146-166.
- Reverchon, E., Donsi, G., Sesti, O., Modeling of Supercritical Fluid Extraction from Herbaceous Matrices. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 32, (1993), 2721-2726.
- Reverchon, E., Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, *Journal of Supercritical Fluids* 10 (1997a) 1-37.
- Reverchon, E., Marrone, C., Supercritical extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modeling, *Chemical Engineering Science*, 52, (1997b), 3421-3428.
- Reverchon, E., Mathematical Modeling of Supercritical Extraction of Sage Oil. *Bioengineering, Food and Natural Products* 42, (1996), 1765-1771.
- Reverchon, E., Osseo, L.S., Supercritical CO₂ Extraction of Basil Oil: Characterization of Products and Process Modeling, *Journal of Supercritical Fluids*, 7, (1994), 185-194.
- Ribeiro, M.A., Bernardo-Gil, M.G., Esquivel, M.M., *Melissa officinalis* L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. *Journal of Supercritical Fluids* 21, (2001), 51-60.
- Rico, D., Martín-Diana, A.B., Barry-Ryan, C., Frías, J.M., Henehan, G.T.M., Barat, J.M., Optimisation of steamer jet-injection to extend the shelflife of fresh-cut lettuce, *Postharvest Biol. Technol.*, 48, (2008), 431-442.
- Rizvi, S. S. H., Benado, A.L., Zollweg, J.A., Daniels, J.A., *Supercritical Fluid Extraction: Fundamental Principles and Modeling Methods*, *Food Technology* 55, (1986), 55-65.
- Robards, K., Prenzler, P., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 66, (1999), 401-436.
- Roy, B.C., Goto, M., Hirose, T., Extraction of ginger oil with supercritical carbon dioxide: experiments and modelling. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 35, (1996), 607-612.
- Şahin, S., Demir, C., Malyer, H., Determination of total phenolic content of *Prunella L.* by immobilized enzyme bioreactor, *Anal. Methods.*, 3, (2011), 944.
- Sanchez-Moreno, C., Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8, (2002), 121-137.
- Saraf, A.S., Applications of novel drug delivery system for herbal formulations, *Fitoterapia*, 8, (2010), 680-689.
- Sauvaire, Y., Ribes, G., Baccou, J.C., et al. Implication of steroid saponins and saponins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek. *Lipids*, 26, (1991), 191-197.
- Schwarz, K., Ternes, W., Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*, *Z. Lebensm. Unters. F. A*, 195, (1992), 99-103.

- Sen, C. K., Oxidants and antioxidants in exercise, *Journal of Applied Physiology*, 79, (1995), 675-686.
- Shaker, E., Mahmoud, H., Mnaa, S., Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage, *Food and Chemical Toxicology*, 48, (2010), 803–806.
- Sham, T.-Ti., Chan, C.-O., Wang, Y.-H., Yang, J.-M., Mok, D.K.-W., Chan, S.-W., A Review on the Traditional Chinese Medicinal Herbs and Formulae with Hypolipidemic Effect, *BioMed Research International*, (2014), Article ID 925302, pp 21.
- Shen, Z., Huvard, G.S., Warriner, C.S. et al., CO₂-assisted fiber impregnation, *Polymer*, 49, (2008), 1579-1586.
- Shimoda, H., Ninomiya, K., Nishida, N., Anti-hyperlipidemic sesquiterpenes and new sesquiterpene glycosides from the leaves artichoke (*Cynara scolymus* L.): structure requirement and mode of action. *Bioorg Med Chem Lett.*, 86, (2003), 223-228.
- Skala, D., Žižović, I., Petrović, S.S., Etarska ulja-destilacija, ekstrakcija, izbor tehnologije i kvalitet, Pregledni rad, *Hemijska industrija*, 53, (1999), 123-139.
- Skala, D., Žižović, I., Gavrančić, S., Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji, *Hem. Ind.*, 56, (2002), 179-190.
- Soares, B.M.C., Gamarra, F.M.C., Paviani, L.C., Gonçalves, L.A.G., Cabral, F.A., Solubility of triacylglycerols in supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*, 43(1), (2007), 25–31.
- Sobolova, L., Skottova, N., Vecera, R., Urbanek K., Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats, *Pharmacological Research*, 53, (2006), 104–112.
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., Nagy, G., Antioxidant measurements, *Physiological Measurement*, 28, (2007), R41-R55.
- Sovova, H., Jež, J., Solubility of menthol in supercritical carbon dioxide, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 39, (1994), 840-841.
- Sovova, H., Rate of vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – modeling of extraction curves. *Chemical Engineering Science*, 49, (1994), 409-414.
- Sovova, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation, *Journal of Supercritical Fluids*, 33, (2005) 35-52.
- Speroni, E., Cervellati, R., Govoni, P., et al: Efficacy of different *Cynara scolymus* preparations on liver complaints. *J Ethnopharmacol.*, 86, (2003), 203-211.
- Stahl, E.; Schilz, W. *Chem.-Ing.-Tech.* 1976, 48, 713.
- Stahl, E.; Schilz, W.; Schutz, E.; Willing, E. *Angew. Chem.* 1978, 90, 778.
- Stahl, E., Schutz, E., Mangold, H. K., Extraction of Seed Oils with Liquid and Supercritical Carbon Dioxide, *J. Agric. Food Chem.*, 28, (1980), 1153-1157.
- Stamenic, M., Zizovic, I., Orlovic, A., Skala, D., Mathematical modelling of essential oil SFE on the micro-scale-classification of plant material, *Journal of Supercritical Fluids*, 46, (2008), 285–292.
- Stamenic, M., Zizovic, I., Eggers, R., Jaeger, P., Heinrich, H., RóJ, E., Ivanovic, J., Skala, D., Swelling of plant material in supercritical carbon dioxide, *J. of Supercritical Fluids*, 52, (2010), 125-133.
- Stamenic, M., Vulic, J., Djilas, S., Misic, D., Tadic, V., Petrovic, S., Zizovic, I., Free-radical scavenging activity and antibacterial impact of Greek oregano isolates obtained by SFE, *Food Chemistry*, 165, (2014), 307–315.

- Stanković M., Veljković V.B., Lazić M.L., Bioaktivni proizvodi iz ploda kleke (*Juniperus communis* L.), Monografija, Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet, Leskovac, (1994).
- Stark, A., Madar, Z., The effect of an ethanol extract derived from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) on bile acid absorption and cholesterol levels in rats. *Br J Nutr*, 69, (1993), 277-287.
- Stashenko, E. E., Acosta, R., Martínez, J. R., High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.), *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 43(1-3), (2000), 379-390.
- Svoboda K.P., Svoboda T.G., Syred A.D., Secretory structures of aromatic and medicinal plants a review and an atlas of micrographs, Microscopix Publications, Middle Travelly, Beguildy, Knighton, UK.
- Škottova, N., Krečman, V., Silzmarin as a Potential Hypocholesterolaemic Drug, *Physiol. Res.* 47, (1998),1-7.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., Antimicrobial herb and spice compounds in food, *Food control*, 21, (2010), 1199-1218.
- Tan, C.-H., Ghazali, H.M., Kuntom, A., Tan, C.-P., Ariffin, A.A., Extraction and physicochemical properties of low free fatty acid crude palm oil, *Food Chem.* 113 (2009) 645-650.
- Taylor, W. G., Elder, J. L., Chang, P. R., Richards, K. W., Microdetermination of Diosgenin from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) Seeds, *J. Agric. Food Chem.*, 48(11), (2000), 5206-5210.
- Temell, Ö., Temelli, F., Correlating the Solubility Behavior of Fatty Acids, Mono-, Di-, and Triglycerides, and Fatty Acid Esters in Supercritical Carbon Dioxide, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39 (12), (2000), 4756-4766.
- Tepe, B., Sokmen, M., Askin Akpulat, H., Sokmen, A., In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey, *Food Chemistry*, 90(4), (2005), 685-689.
- Valenzuela, A., Garrido, A., Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and its structural isomer silibinin. *Biol. Res.*, 27, (1994), 105-112.
- Vazquez-Prieto, M. A., Miatello, R. M., Organosulfur compounds and cardiovascular disease, *Molecular Aspects of Medicine*, 31, (2010), 540-545.
- Vidovic, S., Mujic, I., Zekovic, Z., Lepojevic, Z., Milosevic, S., Jokic, S., Extraction of Fatty Acids from *Boletus edulis* by Subcritical and Supercritical Carbon Dioxide, *J Am Oil Chem Soc*, 88, (2011), 1189-1196.
- Visioli, F., Bellomo, G., Galli, C., Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247, (1998), 60-64.
- Vitzthum, O. G.; Hubert, P., *German Offen.* 2 127 596, 1972.
- Voet, D., Voet, J. G., *Biochemistry* (3 ed.), (2005), Wiley. ISBN 9780471193500.
- Wang, H., Liu, Y., Wei, S., Yan, Z., Application of response surface methodology to optimise supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from *Cyperus rotundus* Linn., *Food Chem.*, 132, (2012), 582-587.
- Wang, L., Weller, C. L., Recent advances in extraction of nutraceutical plants, *Trend in Food Science & Technology*, 17, (2006), 300-312.

- Weder, J. K. P., Haußner, K., Inhibitors of human and bovine trypsin and chymotrypsin in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 1991, 193(3), 242-246.
- Weiss, R. F., Fintelmann, V., Herbal Medicine, second edition, New York, (2000), 39-48.
- Wernimont, G. T., Use of Statistics to Develop and Evaluate Analytical Methods, In AOAC International, Arlington, Teksas. USA, (1995), 96.
- Wiley-Interscience, New York, USA, 9-14.
- Williams, L. L., Rubin, J. B., Edwards, H. W., Calculation of Hansen Solubility Parameter Values for a Range of Pressure and Temperature Conditions, Including the Supercritical Fluid Region, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2004, 43, 4967-4972.
- World Health Organization, WHO monographs on selected medicinal plants, 2, (2001), 180-186.
- World Health Organization, WHO monographs on selected medicinal plants, Geneva, 3, (2007), 338-348.
- Xiao, G., Xue, H., Cheng, G., Bao, X., Simultaneous extraction and hydrolysis in situ for the recovery of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis*, *J. Chem. Eng. Chin. Univ.*, 21, (3), (2007).
- Xiea, W., Zhao, Y., Du, L., Emerging approaches of traditional Chinese medicine formulas for the treatment of hyperlipidemia, *Journal of Ethnopharmacology*, 140, (2012), 345-367.
- Xu, X., Dong, J., Mu, X., Sun, L., Supercritical CO₂ extraction of oil, carotenoids, squalene and sterols from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) bee pollen, *Food and Bioproducts Processing*, 8(9), (2011), 47-52.
- Xue, W.-L., Li, X.-S., Zhang, J., Liu, Y.-H., Wang, Z.-L., et al., Effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) extract on blood glucose, blood lipid and hemorheological properties in streptozotocin-induced diabetic rats, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, suppl. Suppl 1, 16, (2007), 422-6.
- Yang, R., Wang, H., Jing, N., Ding, C., Suo, Y., You, J., *Trigonella foenum-graecum* L. Seed Oil Obtained by Supercritical CO₂ Extraction, *J Am Oil Chem Soc*, 89, (2012), 2269-2278.
- Yanishlieva, N.V., Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon M. (Eds.), *Antioxidants in food: Practical Applications*, CRC Press, Cambridge, (2001), 23-56.
- Yu, S., Derr, J., Etherton, T. D., Kris-Etherton, P. M., Plasma cholesterol-predictive equations demonstrate that stearic acid is neutral and monounsaturated fatty acids are hypocholesterolemic, *American Journal of Clinical Nutrition*, 61(5), (1995), 1129-39.
- Yu, Z.-R., Singh, B., Rizvi, S. S. H., Solubilities of fatty acids, fatty acid esters, triglycerides, and fats and oils in supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*, 7(1), (1994), 51-59.
- Yun, J. S. L., Keat Liong, K., Gurdial, G. S., Foster, N. R., Solubility of cholesterol in supercritical carbon dioxide, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 30(11), (1991), 2476-2482.
- Zarei, A., Changizi Ashtiyani, S., Taheri, S., Rasekh, F., Comparison between effects of different doses of *Melissa officinalis* and atorvastatin on the activity of liver enzymes in hypercholesterolemia rats, *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4 (1), (2014), 15-23.
- Zeng, Y., Song, J.-X., Shen, X.-C., Herbal Remedies Supply a Novel Prospect for the Treatment of Atherosclerosis: A Review of Current Mechanism Studies, *Phytother. Res.* (26), (2012), 159-167.
- Zhang, Z.-J., Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders, *Life Sciences*, 75, (2004), 1659-1699.

- Zhao, Y, Liu, W., Wu, Z., Solubility Model of Solid Solute in Supercritical Fluid Solvent Based on UNIFAC, *Industrial Engineering and Chemical Research*, 49, (2010), 5952–5957.
- Zizovic, I., Ivanovic, J., Milovanovic, S., Stamenic, M., Impregnations using supercritical carbon dioxide, *Supercritical CO2 extraction and its applications*, Ed. Edward Rój, OIC Poland, Lublin, (2014), 23-35.
- Zizovic, I., Stamenic, M., Orlovic, A., Skala, D., Supercritical carbon dioxide essential oil extraction of Lamiaceae family species: mathematical modelling on the micro-scale and process optimization, *Chemical Engineering Science* 60, (2005), 6747–6756.
- Zizovic, Z., Stamenić, M., Ivanović, J., Orlović, A., Ristić, M., Djordjević, S., Petrović, S. D., Skala, D., Supercritical carbon dioxide extraction of sesquiterpenes from valerian root, *Journal of Supercritical Fluids*, 43, (2007a), 249-258.
- Zizovic, I., Stamenic, M., Orlovic, A., Skala, D., Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the micro-scale, *Journal of Supercritical Fluids*, 39, (2007b), 338-346.
- Zosel, K., *German Auslegeschr.* 1493, 190, 1964.
- Žižović, I., Monografija, Ekstrakcija etarskih ulja natkritičnim ugljenik(IV)-oksidom – matematičko modelovanje na nivou sekrecione strukture, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2010.
- Žižović, I. T., Ekstrakcija etarskih ulja netkritičnim ugljenik(IV)-oksidom - Matematičko modelovanje na nivou sekrecione strukture, Monografija, TMF Beograd, (2009).

7. PRILOZI

Prilog A

```
%MATLAB kod za simulaciju ekstrakcionih kriva pomocu modela Sovove
%nerigorozna analiza optimizacionih parametara
%autor: Marko Jonovic
%
%Model Sovove iz 1994 godine
close all
clear all
% Unos eksperimentalnih podataka
%y-procentualni prinos ekstrakta u odnosu na masu uzorka biljnog materijala
%x-relativna utrosena kolicina rastvaraca (kg CO2/kg bilj. materijala)
y1=[0 .111 .122 .162 .211 .226 .258 .296 .342 .383 .415 .447 .447];
x1=[0 .94 1.89 2.83 3.77 4.72 5.66 7.54 9.43 11.32 13.21 15.09 16.98];
y2=[0 .117 .164 .2 .223 .264 .302 .325 .347 .357 .372 .385 .385];
x2=[0 .94 1.89 2.83 3.77 4.72 5.66 7.54 9.43 11.32 13.21 15.09 16.98];
y3=[0 .122 .21 .256 .293 .334 .386 .438 .460 .516 .567 .588 .597];
x3=[0 1.85 2.78 3.71 4.64 5.57 6.49 7.42 8.35 10.21 12.06 13.92 15.78];
y4=[0 .219 .343 .421 .493 .626 .734 .781 .850 .884 .909 .939 .943];
x4=[0 .921 1.84 2.76 3.68 5.53 7.37 9.21 11.05 12.89 14.73 16.57 18.42];
%tabelarno predstavljanje eksp. podataka
x=[x1; x2; x3; x4];
y=[y1; y2; y3; y4];
%Unos ostlih eksperimentalnih podataka
P=[10 30 30 30]; %pritisak, MPa
T=[313.15 298.15 313.15 373.15]; %temperatura, K
roco2=[629.3 966.8 910.6 662.4]; %gustina solventa, kg/m^3
dp=0.4e-3; %precnik cestica, m
eta=0.58; %poroznost
q0=[0.62 0.29 0.23 0.24]; %maseni protok kg/h
tau=[87 191 198 248]; %vreme zadržavanja, min
ms=1e-3.*[53 53 54 54]; %masa cvrste faze, kg
ros=901.2; %gustina biljnog materijala, kg/m^2
Mw2=256.42; %molarna masa palmitinske kiseline
Mw1=44.01; %molarna masa CO2, g/mol
dex=4.5e-2; %precnik ekstraktora, m
Aex=pi*dex^2/4; %poprecni presek sloja, m^2
%Izracunavanje specificne površine
a0=6*(1-eta)/dp;
%Izracunavanje prividne brzine i zapreminskog protoka
U=q0./roco2./Aex./3600; %m/s
Vq=(q0.*10^4)./(roco2.*36); %cm^3/s
%Izracunavanje binarne difuzivnosti [19] i viskoznosti (Jossi)[18]
Dc=4.937e-8; %kriticna difuzivnost CO2, m2/s
roc=468.7; %kriticna gustina CO2, kg/m3
Vc1=93.9; %kriticna zapremina CO2, cm3/mol
Vc2=945; %kriticna zapremina palmitinske kis.,cm3/mol
X=((1+(Vc2/Vc1)^(1/3))^2)/(1+Mw1/Mw2)^0.5;
R=X^0.17;
Tc=304.25; %kriticna temperaruta CO2, K
```



```

roj=1e-3.*roco2;
for i=1:4
    Tr(i)=T(i)/Tc;
    ror(i)=roco2(i)./roc;
    Dab(i)=5.152*Dc*Tr(i)*(ror(i)^(-2/3)-.451)*R/X; %binarna difuzivnost
    if Tr(i)<=1.5
        meps(i)=34e-5*Tr(i)^.94;
    else
        meps(i)=17.78e-5*(4.58*Tr(i)-1.67)^(5/8);
    end
    mij(i)=(.1023+.023364*roj(i)+0.058533*roj(i)^2-.040758*roj(i)^3....
+ .0093324*roj(i)^4)^4-1e-4+meps(i); %mij je u cP
    mi=1e-3.*mij; %mi, Pas
%izracunavanje Re, Sc, Sh i kf-koeficijent prenosa mase u natkriticnoj fazi
    Re(i)=roco2(i).*U(i)*dp./mi(i);
    Sc(i)=mi(i)./roco2(i)./Dab(i);
    Sh(i)=0.38.*(Re(i)^0.3).*Sc(i)^(1/3); %Tan-ova korelacija
    kf(i)=Sh(i).*Dab(i)./dp;

end
%Izracunavanje pocetne vrednosti rastvorljivosti - pretpostavka yr
%iz vrednosti nagiba preliminarnih grafika
nag=zeros(1,4);
for n1=1:4
    xi=x(n1,1:4);
    yi=y(n1,1:4);
    au=polyfit(xi,yi,1);
    nag(n1)=au(1);
end
%Optimizacioni parametri-nerigorozna analiza
yr=[0.00056 0.0014 0.0007 0.0026];
x0=[0.0051 0.0039 0.0061 0.0096];
xk=[0.0042 0.0032 0.0064 0.0085];
ks=[3.53e-8 2.75e-8 3.11e-8 2.02e-8];
%Izracunavanje ostalih parametara modela
N=ms./(1+x0); %masa nerastvorljive cvrste faze
qt=q0./N/3600; %relativni protok rastvaraca (kg CO2/kg nerastvorljive cvrste faze)
qmax=20;
Z=kf.*a0.*roco2./(qt.*(1-eta).*ros);
W=ks.*a0./(qt.*(1-eta));
q=0:0.001:qmax; %specificna kolicina solventa, nasa nezavisna promenljiva
lq=length(q);
e=zeros(3,lq);
qm=(x0-xk)./(yr.*Z);
qn=qm+(1./W).*log((xk+(x0-xk).*exp(W.*x0./yr))./x0);

k=13; %broj eksperimentalnih tacaka za svaki set operativnih uslova
proc1=zeros(3,k); %odstupanje izracunatog prinosa od eksperimenta
l=ones(size(proc1));
l=x.*1000+1; %mesto eksp. podataka u q intervalu
%Simulacija ekstrakcionih kriva-jednacina (19)
for i=1:4
    y94(i,:)=y(i,:)*(1+x0(i))/100; %udeli ekstrakta(kg rastvorak/kg ner. cvrste faze)
    for b=1:lq
        if q(b)<qm(i)

```

```
e(i,b)=q(b)*yr(i)*(1-exp(-Z(i)));

elseif (q(b)>=qm(i))&&(q(b)<qn(i))
zw=(Z(i)*yr(i)/W(i)/x0(i))*log((x0(i)*exp(W(i)*(q(b)-qm(i)))-xk(i))...
/(x0(i)-xk(i)));
e(i,b)=yr(i)*(q(b)-qm(i)*exp(zw-Z(i)));

else
e(i,b)=x0(i)-(yr(i)/W(i))*log(1+(exp(W(i)*x0(i)/yr(i))-1)*...
exp(W(i)*(qm(i)-q(b)))*xk(i)/x0(i));

end
end
%Izracunavanje standardne devijacije
for m=2:k
proc1(i,m)=(e(i,l(i,m))-y94(i,m))^2;
end
sdev1=sqrt(sum(proc1(i,:))/k) %standardna devijacija

plot(q,e(i,:),x(i,:),y94(i,:),'o')
xlabel('q (kg CO2/kg biljnog materijala)')
ylabel('e (kg/kg)')
legend('model','eksperiment')
figure
end
```

Prilog B

PARAMETAR RASTVORLJIVOSTI (SP)

a. Određivanje SP za NK CO₂ u funkciji pritiska i temperature

$$\delta(\text{cal/cm}^3) = 0,47 * (\rho_{\text{CO}_2}(p,T) / \rho_c) * \sqrt{pc}$$

gde je $\rho_{\text{CO}_2}(p,T)$ gustina CO₂ kao funkcija određenog pritiska i temperature (g/cm³)

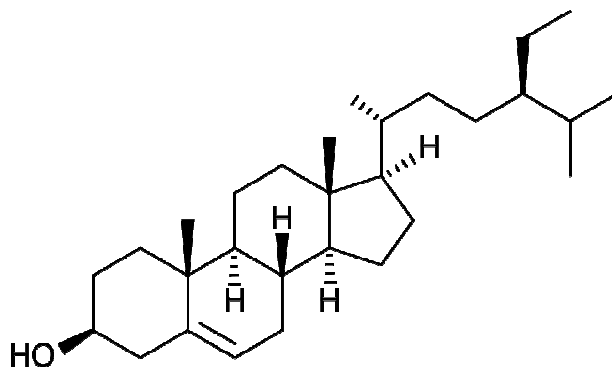
$$\rho_c = 0,47 \text{ g/cm}^3$$

$$p_c = 73,7 \text{ MPa}$$

konverzija $\delta(\text{cal/cm}^3)$ u $\delta(\text{MPa})^{1/2}$: $\delta(\text{MPa})^{1/2} = 2,045 \cdot \delta(\text{cal/cm}^3)$

T(°C)	30	34	40	46	50
P	Parametar rastvorljivosti δ (MPa) ^{1/2} of CO ₂				
16,6	15,114	14,466	13,676	12,833	12,254
20	15,635	15,256	14,572	13,887	13,413
25	16,195	16,116	15,555	14,975	14,589
30	16,645	16,801	16,310	15,800	15,467
33,4	16,901	17,187	16,731	16,257	15,941

b. Određivanje SP za β -sitosterol u odnosu na temperaturu



DOBIJANJE, KARAKTERIZACIJA I OPTIMIZACIJA HIPOLIPEMIJSKIH EKSTRAKATA MATIČNJAKA (*Melissa officinalis*) I GRČKOG SEMENA (*Trigonella foenum-graecum*) NATKRITIČNIM UGLJENIK (IV)-OKSIDOM

Funkcionalna grupa	Broj	Δe_i	$\Delta \nu_i$	ΔT_i
C6-C5 prsten	4	250	16,0	2,68
Konjugacija u prstenu za svaku dvostruku vezu	1	400	-2,2	0,13
-OH	1	7120	10,0	5,63
-CH ₃	7	1125	33,5	1,79
-CH ₂ -	10	1180	16,1	1,34
=C<	1	1030	-5,5	0,89
=CH-	1	1030	13,5	1,40
-C-	1	350	-19,2	-0,22
- CH-	11	820	-1,0	0,45
Σ Suma		39625	445,1	49,43

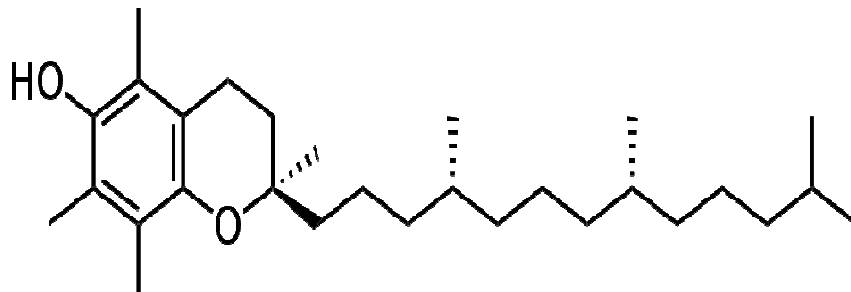
$$\delta (\text{cam/cm}^3)^{1/2} = \sqrt{\frac{\sum i(\Delta E \nu)_i}{\sum i(\Delta \nu)_i}} = 9,435 (\text{cal/cm}^3)^{1/2} \text{ određena na } 25^\circ\text{C} (298,15\text{K})$$

$$T_c = 535 \log \sum \Delta T_i = 906,28$$

$$\delta (\text{cam/cm}^3)^{1/2} = \delta_1 \left(\frac{T_c - T_2}{T_c - T_1} \right)^{0,33}$$

T(°K)	Rastvorljivost $\delta(\text{MPa})^{1/2}$
303,15 (30°C)	19,24
307,15 (34°C)	19,20
313,15 (40°C)	19,14
319,15 (46°C)	19,07
323,15 (50°C)	19,03

c. Određivanje SP za vitamin E (α-tokoferol) u odnosu na temperaturu



Funkcionalna grupa	Broj	Δe_i	Δv_i	ΔT_i
-CH ₃	8	1125	33,5	1,79
-CH ₂ -	11	1180	16,1	1,34
- CH-	3	820	-1,0	0,45
-C-	7	350	-19,2	-0,22
=C<	6	1030	-5,5	0,89
O	1	800	3,8	2,68
-OH	1	7120	10,0	5,63
C6 prsten	2	250	16,0	2,68
konjugacija	3	400	-2,2	0,13
Σ Suma		42690	313,9	48,27

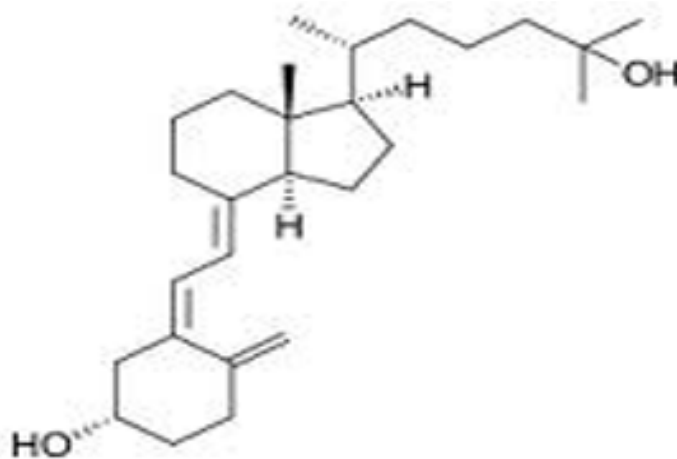
$$\delta (\text{cm}^3/\text{cm}^3)^{1/2} = \sqrt{\frac{\sum i(\Delta E v)_i}{\sum i(\Delta v)_i}} = 11,661 (\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2} \text{ određena na } 25^\circ\text{C} (298,15\text{K})$$

$$T_c = 535 \log \sum \Delta T_i = 900,767$$

$$\delta (\text{cm}^3/\text{cm}^3)^{1/2} = \delta_1 \left(\frac{T_c - T_2}{T_c - T_1} \right)^{0,33}$$

T(K)	Rastvorljivost $\delta(\text{MPa})^{1/2}$
303,15 (30°C)	23,78
307,15 (34°C)	23,73
313,15 (40°C)	23,65
319,15 (46°C)	23,57
323,15 (50°C)	23,52

d. Određivanje SP za vitamin D (Cholecalciferol) u odnosu na temperaturu



Funkcionalna grupa	Broj	Δe_i	Δv_i	ΔT_i
-CH ₃	4	1125	33,5	1,79
=CH ₂	1	1030	28,5	1,59
C6-C5 ring	3	250	16,0	2,68
-CH ₂ -	11	1180	16,1	1,34
=CH-	2	1030	13,5	1,40
>C<	4	350	-19,2	-0,22
-CH-	5	820	-1,0	0,45
-OH	1	7120	10,0	5,63
Σ Total		33940	342,8	41,33

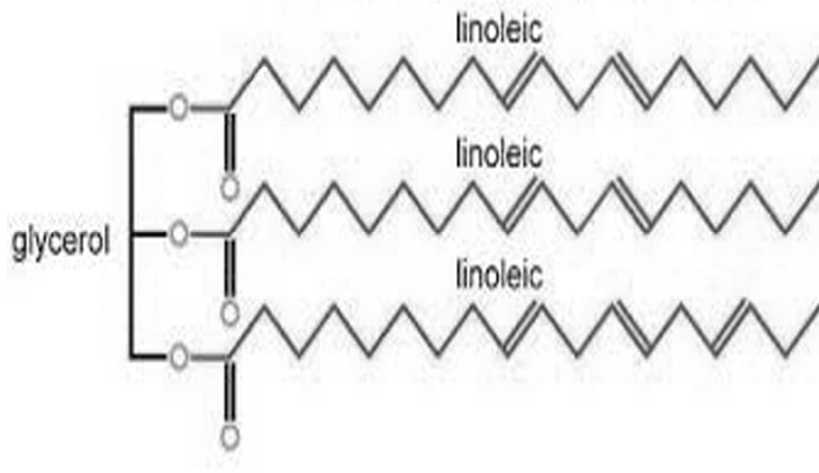
$$\delta (\text{cam/cm}^3)^{1/2} = \sqrt{\frac{\sum i(\Delta E v) i}{\sum i(\Delta v) i}} = 9,950 (\text{cal/cm}^3)^{1/2} \text{ određena na } 25^\circ\text{C} (298,15\text{K})$$

$$T_c = 535 \log \sum \Delta T_i = 864,70$$

$$\delta (\text{cam/cm}^3)^{1/2} = \delta_1 \left(\frac{T_c - T_2}{T_c - T_1} \right)^{0,33}$$

T(°K)	Rastvorljivost $\delta(\text{MPa})^{1/2}$
303,15 (30°C)	20,29
307,15 (34°C)	20,25
313,15 (40°C)	20,17
319,15 (46°C)	20,10
323,15 (50°C)	20,05

e. Određivanje SP za triacilglicerol (trilinoleinglicerol) u odnosu na temperaturu



DOBIJANJE, KARAKTERIZACIJA I OPTIMIZACIJA HIPOLIPEMIJSKIH EKSTRAKATA MATIČNJAKA (*Melissa officinalis*) I GRČKOG SEMENA (*Trigonella foenum-graecum*) NATKRITIČNIM UGLJENIK (IV)-OKSIDOM

Funkcionalna grupa	Broj	Δe_i	$\Delta \nu_i$	ΔT_i
-CH ₃	3	1125	33,5	1,79
-CH ₂ -	38	1180	16,1	1,34
=CH-	12	1030	13,5	1,40
>C<	3	350	-19,2	-0,22
-CH-	13	820	-1,0	0,45
=O	6	800	3,8	2,68
Σ Suma		77085	826,5	94,36

$$\delta (\text{cm/cm}^3)^{1/2} = \sqrt{\frac{\sum i(\Delta E \nu)_i}{\sum i(\Delta \nu)_i}} = 9,657 (\text{cal/cm}^3)^{1/2} \text{ određena na } 25^\circ\text{C} (298,15\text{K})$$

$$T_c = 535 \log \sum \Delta T_i = 1056,51$$

$$\delta (\text{cm/cm}^3)^{1/2} = \delta_1 \left(\frac{T_c - T_2}{T_c - T_1} \right)^{0,33}$$

T(°K)	Rastvorljivost $\delta(\text{MPa})^{1/2}$
303,15 (30°C)	19,71
307,15 (34°C)	19,67
313,15 (40°C)	19,62
319,15 (46°C)	19,57
323,15 (50°C)	19,53

Биографија аутора

Александра Богдановић је рођена 30.05.1987. године у Новом Пазару, где је завршила основну и средњу школу. Дипломирала је на Технолошко-металуршком факултету у Београду, студијска група Хемијско инжењерство, одсек фармацеутско инжењерство 2010. године са просечном оценом 9,14 и оценом 10 на завршном раду са темом „Екстракција биљних екстраката (полифенола), инкапсулација у алгинатне честице и праћење отпуштања полифенола“. Добитница је 2011 награде Српског Хемијског Друштва за истакнути успех током основних академских студија 2011 године и три награде „Панта Тутундџић“, за истакнути успех током основних академских студија.

Била је на интернационалној пракси у Бразилу у трајању од три месеца од јула-октобра 2010. године, на UNICAMP Универзитету, Campinas-Sao Paulo, одсек хемијско-инжењерство, сарадник на пројекту- „Истраживање екстракционих процеса и добијања полимерних партикула у наткритичним условима, у циљу добијања наноносача“.

Мастер студије на Технолошко-металуршком факултету у Београду, студијска група Хемијско инжењерство, завршила је 2011. године са просечном оценом 9,88 и оценом 10 на завршном-мастер раду са темом „Развој метода за контролу квалитета Dexasona i Bensedina HPLC-ом“. За време мастер студија била је ангажована као стручни сарадник у Контроли Квалитета фармацеутске фабрике „Галеника а.д.“ од јануара-децембра 2011. године.

Докторске студије, на смеру Хемија, уписала је 2011. године. Исте године похађала је курс LLL Intensive Course ”Supercritical Fluids – Green Solvents in Chemical Engineering” организован од стране Европске Федерације за Хемијско Инжењерство.

Испите предвиђене планом и програмом докторских студија положила је са просечном оценом 10. Завршни испит на докторским студијама под називом „Добијање и карактеризација хиполипемиских екстраката наткритичним угљеник (IV)-оксидом“ положила је 25.9.2013. године.

Александра Богдановић је од 4.01.2012. године са по 12 истраживачких месеци ангажована на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије ИИИ45017 под називом „Функционални физиолошки активни биљни материјали са додатом вредношћу за примену у фармацеутској и прехранбеној индустрији“ на Катедри за органску хемијску технологију Технолошко-металуршког факултета. Александра Богдановић је објавила три научна рада, као први аутор у врхунском међународном часопису (M21), једно технолошко решење, неколико саопштења на међународним и националним скуповима штампаним у изводу или у целини.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана: Александра Богдановић
број индекса: 4010/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Добијање, карактеризација и оптимизација хиполипемичких екстраката матичњака (*Melissa officinalis*) и грчког семена (*Trigonella foenum-graecum*) наткритичним угљеник(IV)-оксидом

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, 31.08.2016

Потпис докторанда

Aleksandra Bogdanovic

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Александра Богдановић

Број индекса: 4010/2011

Студијски програм: Хемија

Наслов рада: **Добијање, карактеризација и оптимизација хиполипемичких екстраката матичњака (*Melissa officinalis*) и грчког семена (*Trigonella foenum-graecum*) наткритичним угљеник(IV)-оксидам**

Ментор: др Слободан Петровић

Потписана: Александра Богдановић

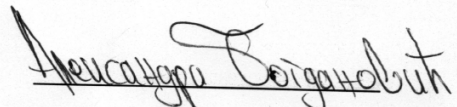
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 31.08.2016.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Добијање, карактеризација и оптимизација хиполипемичких екстраката матичњака (*Melissa officinalis*) и грчког семена (*Trigonella foenum-graecum*) наткритичним угљеник(IV)-оксидом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

У Београду, 31.08.2016

Потпис докторанда
Александра Богдановић