



**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**KATEDRA ZA BIOTEHNOLOGIJU I  
FARMACEUTSKO INŽENJERSTVO**



**Mr Svetlana Milošević**

**EKSTRAKCIJA GINKA (*Ginkgo biloba* L. )  
UGLJENIK (IV)-OKSIDOM POD PRITISKOM**

**doktorska disertacija**

**Novi Sad  
2011**

# KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

**Redni broj:**  
**RBR**

**Identifikacioni broj:**  
**IBR**

**Tip dokumentacije:** monografska dokumentacija  
**TD**

**Tip zapisa:** tekstualni štampani materijal  
**TZ**

**Vrsta rada:** doktorska disertacija  
**VR**

**Autor:** Svetlana Milošević  
**AU**

**Mentor:** Prof. dr Žika Lepojević, Tehnološki fakultet, Novi Sad  
**MN**

**Naslov rada** "Ekstrakcija ginka (*Ginkgo biloba* L) ugljenik (IV)-oksidom pod pritiskom"

**Jezik publikacije:** srpski (latinica)  
**JP**

**Jezik izvoda:** srpski/engleski  
**JI**

**Zemlja publikovanja:** Srbija  
**ZP**

**Uže geografsko područje:** Vojvodina  
**UGP**

**Godina:** 2011.  
**GO**

**Izdavač:** Autorski reprint  
**IZ**

**Mesto i adresa:** Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1  
**MA**

**Fizički opis rada:** broj poglavlja 6, str. 126, literaturnih navoda 99, tabela 47, slika 53  
**FO**

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo  
**NO**

**Naučna disciplina:** Farmaceutsko inženjerstvo  
**ND**

**Predmetna odrednica/ključne reči:** ginko (*Ginkgo biloba* L.) ekstrakcija, ugljenik (IV)-oksid, etarsko ulje, modelovanje ekstrakcije

**PO**

**UDK:** 661.722:663.142:664.127

**Čuva se:** Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu,  
**ČU** 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Srbija

**Važna napomena:** nema  
**VN**

**Izvod/abstrakt:**  
**IZ**

U okviru ove disertacije izvršeno je preparativno izolovanje etarskog ulja lišća ginka (*Ginkgo biloba* L.) destilacijom pomoću vodene pare, u cilju određivanja pojedinih fizičko-hemijskih parametara. Oficinalnim postupkom određen je sadržaj etarskog ulja u lišću ginka i iznosi 0,0083%. Lišće ginka je ekstrahovano klasičnim rastvaračima tj. smešom alkohol-voda, pri čemu je koncentracija alkohola iznosila 40% (m/m). Primenom navedenog rastvarača, izvršena je višestupna protivstrujna ekstrakcija (u pet stupnjeva) pri čemu je dobijen tečni ekstrakt (*Extracta fluida*) sa relativno visokim sadržajem ekstraktivnih materija (17,06%). Tečni ekstrakt je direktno korišćen za dobijanje suvog ekstrakta lišća ginka (*Extracta sicca*) primenom vsušnice sa raspršivanjem (spray dryer). Kvalitativna i kvantitativna karakterizacija izvršena je primenom postupka tečne hromatografije na tankom sloju (HPTLC) i određen sadržaj ukupnih flavonoida sračunatih na rutin, a i na katehin, a određen je i sadržaj ukupnih fenola sračunatih na hlorogensku kiselinu.

Glavni deo doktorske disertacije predstavlja ekstrakcija sistema lišće ginka-ugljenik (IV)-oksid pod pritiskom, pri čemu je ispitivan uticaj stepena usitnjenosti droge na prinos ekstrakcije, i korišćen koeficijent brze i spore ekstrakcije kao mera kinetičkog ponašanja ekstrakcije. Dobijeni rezultati ispitivanja su pokazali značajan uticaj stepena usitnjenosti droge na brzinu ekstrakcije, pogotovo, kod ekstrakcije natkritičnim ugljenik (IV) oksidom. Radi izbora optimalnog protoka ekstragensa ispitivani su sledeći protoci 0,095, 0,194 i 0,277 kg/h. Na osnovu prinosa ekstrakcije usvojeno je da je protok ekstragensa od 0,194 kg/h optimalan. Prinos ekstrakcije je ispitivan korišćenjem dva postupka ekstrakcije, i to: ekstrakcija tečnim ugljenik (IV) -oksidom (temperatura ispod kritične temperature  $T_c = 31,1^\circ\text{C}$ , a pritisak nešto ispod ili iznad kritičnog pritiska  $p_c = 73,8$  bar), i ekstrakcija natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom (pritisak i temperatura iznad kritičnih vrednosti pritiska i temperature). U natkritičnoj oblasti promenom pritiska se značajno menjaju svojstva ekstragensa, povećava se sposobnost rastvaranja, dielektrična konstanta i dr. Ispitivan je uticaj temperature na prinos ekstrakcije (izotermni proces), pri čemu se dobijaju rezultati koji se ne mogu objasniti jednostavno, analizirajući samo uticaj gustine rastvarača na moć rastvaranja, već se za objašnjenje dobijenih rezultata uključuje i uticaj napona pare ekstrahovane komponente, tako da rastvorljivost komponente može da se poveća, smanji ili ostane ista sa povećanjem temperature na konstantnom pritisku, u zavisnosti koji uticaj je dominantniji. Kod izotermnih postupaka prinos ekstrakcije raste sa povećanjem pritiska ekstrakcije, što je u saglasnosti sa teoretskim

principima. S druge strane, ekstrakti dobijeni pri višim pritiscima imaju manji sadržaj etarskog ulja što se objašnjava činjenicom da veći pritisci imaju veću moć rastvaranja glavnih komponenata kao i komponenata kao što su smole, voskovi i masna ulja. Kvalitativnom i kvantitativnom analizom selektovanih ekstrakata dobijenih tečnim (130 bar, 20°C, 3 h) i natkritičnim (100 bar, 40°C, 4 h) ugljenik (IV)-oksidom, kao i etarska ulja izolovana iz ovih ekstrakata nađeno je da ispitivani uzorci sadrže n-alkane, račvaste alkane i jedinjenja sa kiseonikom, među kojima posebno mesto zauzimaju fenoli sa zasićenim i nezasićenim alkil ostacima. Izvršena je uporedna analiza etarskog ulja dobijenog destilacijom lišća ginka pomoću vodene pare i etarskih ulja dobijenih iz selektovanih ekstrakata. Interesan je podatak koji se odnosi na sadržaj etarskog ulja u drogi određen direktnom destilacijom droge pomoću vodene pare i izdvajanjem etarskih ulja iz ekstrakata takođe destilacijom pomoću vodene pare. U ovom drugom slučaju dobija se, preračunavanjem, sadržaj etarskog ulja u drogi višestruko veći (4-10 puta) od sadržaja, određenog oficinalnim postupkom, u drogi. Ova pojava se objašnjava uvođenjem pojma „vezano“ etarsko ulje i „slobodno“ etarsko ulje. Ekstrakcijom ugljenik (IV)-oksidom pod pritiskom tzv. vezano etarsko ulje se oslobađa voskova i masnog ulja što se odražava na njegovu povećanu količinu u CO<sub>2</sub>-ekstraktima. Na kraju u ovoj disertaciji izvršeno je modelovanje ekstrakcionog sistema lišće *Ginkgo biloba* – ugljenik (IV)-oksid pod pritiskom korišćenjem model jednačine Naika i saradnika, modifikovane model jednačine Reverchon i Sesti-Osseo kao i model, češće korišćen, koji je predložila Sovová. Korišćeni modeli mogu relativno uspešno da se koriste za opisivanje ekstrakcionog sistema lišće *Ginkgo biloba* – ugljenik (IV)-oksid pod pritiskom. Radi iznalaženja najpovoljnijih uslova ekstrakcije primenjen je metod odzivne površine variranjem parametra ekstrakcije (pritiskak, temperatura i vreme ekstrakcije). Na osnovu eksperimentalnih rezultata dobijen je polinom drugog reda za izračunavanje optimalnog prinosa ekstrakcije i određeni su najpovoljniji uslovi ekstrakcije kao i međusobni uticaji pojedinih parametra.

**Datum prihvatanja teme od strane NN Veća Fakulteta:** 26.12.2010. godine

**DP**

**Datum odbrane:**

**DO**

**Članovi komisije:**

**KO**

**Predsednik:**

Prof. dr Zoran Zeković, Tehnološki fakultet, Novi Sad

**Član:**

Prof. dr Žika Lepojević, Tehnološki fakultet, Novi sad

**Član:**

Prof. dr Vlada Veljković, Tehnološki fakultet, Leskovac

**Član:**

Prof. dr Stevan Popov, Tehnološki fakultet, Novi Sad

## KEY WORD DOKUMENTATION

**Accession number:**  
ANO

**Identification number:**  
INO

**Document type:** monographic publication  
DT

**Type of record:** textual material, printed  
TR

**Contents code:** PhD Thesis  
CC

**Author:** Svetlana Milošević  
AU

**Menthor:** Prof. dr Žika Lepojević, Tehnološki fakultet, Novi Sad  
MN

**Title:** “Extraction of *Ginkgo biloba* L.by carbon (IV) –oxide under pressure“

**Language of text:** Serbian (latin)  
LT

**Language of abstract:** Serbian/English  
LA

**Country of publication:** Serbia  
CP

**Locality of publication:** Vojvodina  
LP

**Publication year:** 2011.  
PY

**Publisher:** Author’s reprint  
PU

**Publishing place:** Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1  
PP

**Physical description:** Chapters 6, pages 126, references 99,  
PD tables 47, pictures 53

**Scientific field:** Technological engineering  
SF

**Scientific discipline:** Pharmaceutical Engineering  
**SD**

**Subject/key words:** *Ginkgo biloba* L. extraction, carbon (IV)-oxide, essential oil,  
**SX** modelling

**UDK:** 661.722:663.142:664.127

**Holding data:** Library of Faculty of Technology,  
**HD** 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Serbia

**Note:** none  
**N**

**Abstract:**  
**AB**

Within this thesis preparative isolation of essential oil from leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) by steam distillation was carried out, in order to determine some physico-chemical parameters. The essential oil content in the leaves of ginkgo was determined by an officinal procedure and its value is 0.0083%. Ginkgo leaves were extracted with conventional solvents, i.e. alcohol-water mixture, where the alcohol concentration was 40% (w/w). The forementioned solvent was used to carry out a multi-stage counter-current extraction (five stages) by which the liquid extract (*Extracta fluida*) with a relatively high content of extracts (17.06%) was obtained. The liquid extract was directly used to obtain a dry extract of ginkgo leaves (*Extracta sicca*) by spray drying. The qualitative and quantitative characterisation was based on the proceedings of liquid thin layer chromatography (HPTLC), the content of total flavonoids expressed as rutin, and as catechin, and the total phenol content expressed as chlorogenic acid was determined.

The main part of the doctoral thesis is the extraction system of ginkgo leaves-carbon (IV) oxide under pressure, in which the effect of the drug particle size on the extraction yield was studied, and as a measure of the kinetic behavior of extraction the coefficient of fast and slow extraction was used. The obtained results showed a significant effect of the drug particle size on the speed of extraction, particularly, the extraction with supercritical carbon (IV) oxide. For the purpose of selecting the optimal flow of the solvent several flowrates were investigated 0.095, 0.194 and 0.277 kg/h. Based on the yield of extraction the solvent flowrate of 0.194 kg/h was assumed as optimal. The extraction yield was investigated using two extraction procedures: extraction with liquid carbon (IV) oxide (temperature below the critical temperature  $T_c = 31.1$  °C and pressure slightly below or above the critical pressure  $p_c = 73.8$  bar), and extraction with supercritical carbon (IV) oxide (pressure and temperature above the critical values of pressure and temperature). In the supercritical area the change in pressure significantly influences the properties of the solvent, increases the ability of dissolving, dielectric constant, etc. The effect of temperature on extraction yield was examined (isothermal process), where the obtained results can not be explained simply by analyzing only the effect of solvent density on the power of dissolution, but to explain these results the effect of vapor pressure of the extracted components must be included, so that the solubility of the component may increase, decrease or remain the same with increasing temperature at constant pressure, depending on which influence is dominant. In isothermal processes the extraction yield increases with increasing pressure of extraction, which is consistent with theoretical principles. On the other hand, extracts obtained at high pressures have a lower content of

essential oils which can be explained by the fact that higher pressures have a greater power of dissolution of the main components as well as components such as resins, waxes and fatty oils. The qualitative and quantitative analysis of the selected extracts obtained with liquid (130 bar, 20 °C, 3 h) and supercritical (100 bar, 40 °C, 4 h) carbon (IV) oxide, and essential oils isolated from these extracts showed that the studied samples contain n-alkanes, branched alkanes and compounds with oxygen, including phenols with saturated and unsaturated alkyl residues. A comparative analysis of the essential oil obtained by distillation of ginkgo leaves by steam and essential oil obtained from selected extracts was carried out. An interesting fact concerning the essential oil content in the drug determined by direct distillation of drugs by steam and separating the essential oils from extracts also produced by steam distillation. In the other case, by calculation, the obtained essential oil content in the drug is several times higher (4-10 times) of content, determined by an official procedure, in the drug. This phenomenon is explained by introducing the notion of "linked" essential oil and "free" essential oil. The extraction with carbon (IV) oxide under pressure the so called linked essential oil is released from waxes and fatty oils which is reflected in its increased amount in CO<sub>2</sub>-extracts. At the end of this dissertation the modeling of the extraction system leaves of *Ginkgo biloba* - carbon (IV) oxide under pressure was carried out using the model equation of Naik and associates, the modified model equation of Reverchon and Sesti Osseo and also like a frequently used model proposed Sovová. The mentioned models can be relatively used to describe the extraction system leaves of *Ginkgo biloba* - carbon (IV) oxide under pressure. In order to find the most favorable conditions of extraction, the response surface methodology varying extraction parameters was used (pressure, temperature and extraction time). Based on the experimental results a second order polynom for the calculation of the optimum yield of extraction was obtained and the extraction conditions and the mutual influence of some parameters were determined.

**Accepted by the Scientific Board on:**

26<sup>th</sup> December 2010

**ASB**

**Defended on:**

**DE**

**Thesis defend board:**

**DB**

**President:**

Prof. dr Zoran Zeković, Faculty of Technology, Novi Sad

**Member:**

Prof. dr Žika Lepojević, Faculty of Technology, Novi Sad

**Member:**

Prof. dr Vlada Veljković, Faculty of Technology, Leskovac

**Member:**

Prof. dr Stevan Popov, Faculty of Technology, Novi Sad

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OPŠTI DEO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Ekstrakcija lekovitog i aromatičnog bilja.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Destilacija pomoću vodene pare.....	8
2.1.2. Ekstrakcija pogodnim rastvaračima.....	9
2.1.3. Ekstrakcija gasovima pod pritiskom.....	10
<b>2.2. Ginko (<i>Ginkgo biloba</i> L.).....</b>	<b>18</b>
<b>3. NAŠI RADOVI .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Izolovanje i određivanje etarskog ulja iz droge destilacijom pomoću vodene pare.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2. Ekstrakcija lišća ginka pogodnim rastvaračima.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3. Ekstrakcija lišća ginka ugljenik (IV)-oksidom pod pritiskom.....</b>	<b>38</b>
3.3.1. Uticaj protoka rastvarača na prinos ekstrakcije ginka natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom.....	39
3.3.2. Uticaj stepena usitnjenosti na prinos ekstrakcije.....	40
3.3.3. Izotermni postupak ekstrakcije.....	46
3.3.3.1. Ekstrakcija natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom.....	46
3.3.3.2. Ekstrakcija ugljenik (IV)-oksidom u tečnom stanju .....	49
3.3.4. Izobarni postupak ekstrakcije .....	51
3.3.4.1. Uticaj temperature na prinos ekstrakcije natkritičnim i tečnim ugljenik (IV)-oksidom .....	51
<b>3.4. Kvalitativna i kvantitativna analiza CO<sub>2</sub> ekstrakata i etarskih ulja.....</b>	<b>53</b>
<b>3.5. Modelovanje ekstrakcionog sistema: lišće ginka – ugljenik (IV)-oksid.....</b>	<b>63</b>
3.5.1. Primena empirijskog modela Naika i sar. na modelovanje ekstrakcije lišća ginka tečnim i natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom.....	64
3.5.2. Primena modifikovane model jednačine Reverchon i Sesti-Osseo-a za modelovanje ekstrakcionog sistema ginko - ugljenik (IV)-oksid.....	78
3.5.3. Modelovanje ekstrakcije lišća ginka primenom modela koji je predložila Sovová.....	94
3.5.4. Određivanje najpovoljnijih parametara ekstrakcije ginka natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom metodom odzivne površine.....	101



<b>4. EKSPERIMENTALNI DEO .....</b>	<b>110</b>
<b>4.1. Priprema biljnog materijala usitnjavanjem.....</b>	<b>112</b>
<b>4.2. Semipreparativno dobijanje etarskog ulja.....</b>	<b>113</b>
<b>4.3. Određivanje sadržaja etarskog ulja u drogi destilacijom vodenom parom.....</b>	<b>112</b>
<b>4.4. Izbor rastvarača za ekstrakciju lišća ginka.....</b>	<b>113</b>
<b>4.5. Ispitivanje kinetike ekstrakcije sistema.....</b>	<b>113</b>
<b>4.6. Dobijanje tečnog ekstrakta (<i>Extracta fluida</i>) približnog odnosa 1:1.....</b>	<b>113</b>
4.6.1. Analiza tečnog ekstrakta.....	114
4.6.1.1. Određivanje sadržaja ukupnih ekstraktivnih materija u ekstraktu.....	114
4.6.1.2. Određivanje sadržaja alkohola u tečnom ekstraktu.....	114
<b>4.7. Dobijanje suvog ekstrakta (<i>Extracta sicca</i>).....</b>	<b>115</b>
<b>4.8. Određivanje ukupnih flavonoida i fenola u ekstraktima dobijenim primenom alkohola koncentracije 40%(m/m).....</b>	<b>115</b>
4.8.1. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktima sračunatih na rutin odnosno na (+)-katehin.....	115
4.8.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola sračunatih na hlorogensku kiselinu.....	117
<b>4.9. Dobijanje suvog ekstrakta.....</b>	<b>117</b>
4.8.1. Određivanje vlage.....	118
<b>4.9. Analiza ekstrakata hromatografijom na tankom sloju silika gela .....</b>	<b>118</b>
<b>4.10. Ekstrakcija droge primenom ugljenik (IV)-oksida pod pritiskom .....</b>	<b>119</b>
4.10.1. Ispitivanje kinetike ekstrakcije lišća ginka primenom ugljenik (IV)-oksida u natkritičnom stanju .....	120
4.10.2. Određivanje sadržaja etarskog ulja u CO <sub>2</sub> - ekstraktima.....	120
4.10.3. Određivanje ostatka ekstrakta nakon izdvajanja etarskog ulja destilacijom vodenom parom.....	121
<b>4.11. Analiza etarskog ulja i CO<sub>2</sub> - ekstrakata gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (GC/MS) .....</b>	<b>121</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>122</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>126</b>

## 1. UVOD

Lekoviti i aromatični sastojci bilja mogu se izolovati iz biljnog materijala hemijsko-tehnološkom preradom, primenom destilacije pomoću vodene pare i ekstrakcijom različitim ekstragensima: vodom, uljima i mastima, smešom alkohol-voda, različitim organskim rastvaračima i gasovima pod pritiskom.

Poslednjih decenija, zahvaljujući razvoju modernih analitičkih metoda i uređaja za destilaciju i ekstrakciju ostvaren je značajan napredak u tehnologiji prerade lekovitog bilja. Na taj način obezbeđuje se maksimalno iskorišćenje biljne sirovine i standardni kvalitet finalnih proizvoda, pri čemu su troškovi prerade značajno smanjeni.

Lekovito bilje se vekovima masovno primenjuje u narodnoj medicini. Mnoge biljne vrste ušle su u školsku medicinu iz bogate riznice narodne medicine. Veliki broj aktivnih sastojaka lekovitog bilja izolovan je u čistom stanju, određena im je hemijska struktura, a zatim su i sintetizovani. Hemijska sinteza, koja je u većini slučajeva ekonomičnija, potisnula je njihovo dobijanje iz lekovitog bilja. Međutim, bez obzira na izuzetne uspehe organske sinteze, izvestan broj farmakološki aktivnih supstanci nije ni do danas sintetizovan ili je njihova sinteza samo od akademskog značaja.

Kada se govori o lekovitom i aromatičnom bilju, treba imati u vidu da između njih ne postoji oštra granica, jer mnoge tipične aromatične biljne vrste poseduju i lekovito delovanje. Ipak iz praktičnih razloga načinjena je ova podela. Pod aromatičnim biljem podrazumevamo biljne vrste koje sadrže etarska ulja – proizvode intenzivnog mirisa, koji se najčešće dobijaju destilacijom pomoću vodene pare. Aromatične biljke se takođe široko primenjuju u farmaciji, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Kao i u slučaju lekovitog bilja mnoge komponente etarskih ulja su sintetizovane i u značajnoj meri potiskuju njihovo dobijanje iz prirodnih izvora.

Hemijsko-tehnološka prerada lekovitog bilja obuhvata preradu primenom postupka destilacije pomoću vodene pare i postupka ekstrakcije različitim rastvaračima, koji se primenjuju u industrijskim razmerama. Veliki broj različitih ekstrakata koristi se u terapiji bez dalje prerade, kao što su tečni ekstrakti (*Extracta fluida*), gusti ekstrakti (*Extracta spissa*)

i tinkture (*Tincturae*), a kao ekstragens se najčešće koristi voda, kao i smeša alkohola i vode, u različitim odnosima, jer ovakav rastvarač kada se koristi u malim količinama, nije toksičan za ljudski organizam. Osim toga primenom vode tj. smeše alkohola i vode, proizvode se i suvi ekstrakti (*Extracta sicca*), koji se koriste za izradu medicinskih sredstava u različitim farmaceutskim oblicima.

Ekstrakcija lekovitog bilja gasovima pod pritiskom privlači posebnu pažnju mnogih istraživača. Tako na primer, ekstrakcija prirodnih supstanci pomoću subkritičnog (tečnog), a posebno natkritičnog (superkritičnog) ugljenik (IV)-oksida pruža široke mogućnosti u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji za dobijanje niza proizvoda visokog kvaliteta. Pogodnom kombinacijom pritiska i temperature mogu se podešavati efekti rastvaranja, odnosno može se postići određena selektivnost ugljendioksida kao ekstragensa.

Danas se velika pažnja poklanja i uporednim analizama etarskog ulja aromatičnih biljaka dobijenih hidroddestilacijom, ekstrakcijom organskim rastvaračima, tečnim i natkritičnim fluidima, radi utvrđivanja koji postupak daje etarsko ulje najboljeg kvaliteta.

U poslednje vreme dosta se radi na ekstrakciji lekovitog bilja u cilju dobijanja ekstrakata koji imaju određeno antioksidativno delovanje zahvaljujući pre svega sekundarnim metabolitima i fenolnim i polifenolnim jedinjenjima, kao i flavonoidima koji, pored drugih delovanja, imaju takođe i antioksidativno dejstvo.

U okviru ove doktorske disertacije ispitana je ekstrakcija lišća ginka (*Ginkgo biloba* L.) primenom destilacije pomoću vodene pare, ekstrakcija smešom alkohol-voda, višestupna protivstrujna ekstrakcija, ekstrakcija primenom ugljenik (IV)-oksida u tečnom i natkritičnom stanju. Određivan je prinos ukupnih ekstraktivnih materija, flavonoida i fenola. Kao parametri ekstrakcije korišćeni su koeficijent brze (b) i spore ekstrakcije (k). Takođe je istraživana kinetika ekstrakcije lišća ginka korišćenjem natkritičnog i tečnog ugljenik (IV)-oksida primenom izotermnog i izobarnog postupka ekstrakcije. Na kraju, na osnovu rezultata ispitivanja kinetike ekstrakcije, izvršeno je modelovanje ekstrakcionog sistema: *Ginkgo biloba* (lišće) – ugljenik (IV)-oksid pod pritiskom primenom model jednačina za kinetiku ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija u zavisnosti od stepena usitnjenosti droge, kao i parametara ekstrakcije (protok ekstragensa, pritisak), čime je dat doprinos njegovom kvantitativnom definisanju.

## 2. OPŠTI DEO

Lečenje biljem, kao deo kineske drevne medicine, staro je 5000 godina, a najstariji zapisi o ekstrakcionim metodama dobijanja biološki aktivnih materija iz biljnih materijala potiču iz starog Egipta, gde su najčešće primenjivane tehnike bile ekstrakcija presovanjem i ekstrakcija alkoholom i životinjskim mastima. Prvi procesi destilacije vezuju se za Vavilonsko carstvo i drugi milenijum pre nove ere. Arapski hemičari su prvi počeli da primenjuju destilaciju vodenom parom u 11. veku, a u proces destilacije je stigao u srednjvekovnu Evropu u 12. veku [1, 2]. Naučna otkrića i razvoj tehnologija doprineli su usavršavanju starih i razvoju novih metoda izolovanja aktivnih supstanci iz biljnog materijala.

### 2.1. Ekstrakcija lekovitog i aromatičnog bilja

Ekstrakcija lekovitog bilja pruža široke mogućnosti za dobijanje niza proizvoda koji se primenjuju u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji.

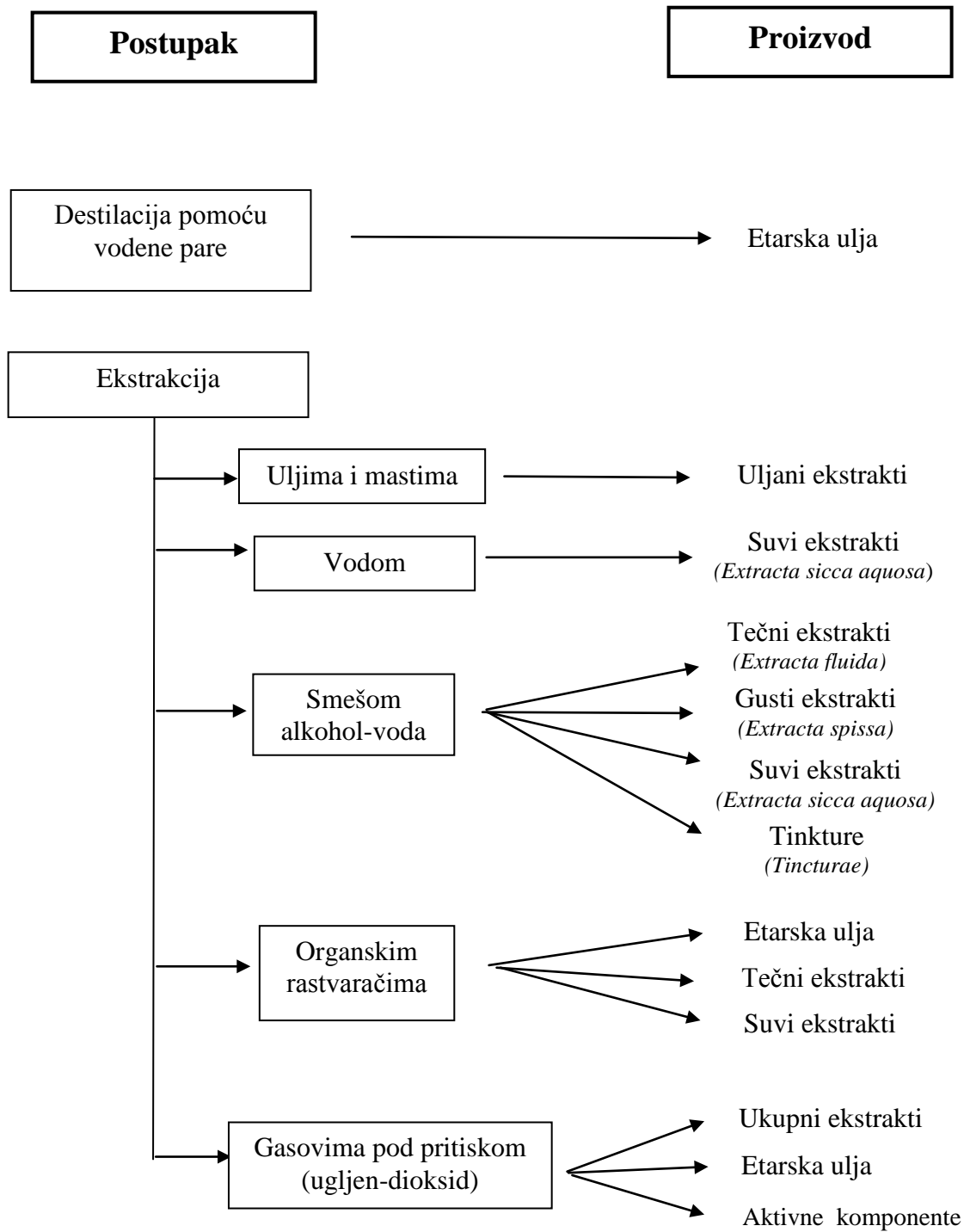
Osnovne operacije, pri proizvodnji aktivnih principa iz lekovitog bilja su čvrsto-tečna i tečno-tečna ekstrakcija koje definišu: opšti zakoni prenosa mase, osobine polaznog materijala i fizičko-hemijska sličnost rastvarača i aktivnih principa.

Kada je reč o industrijskoj preradi lekovitog i aromatičnog bilja, mora da se ima u vidu činjenica da se radi o velikoj količini biljne mase, i iz ovog razloga pored lekovitog i aromatičnog bilja koje raste u prirodi spontano, u sve većoj meri se koristi gajeno bilje.

Aktivne materije lekovitog bilja su često veoma termolabilne supstance, čiji se sadržaj može značajno umanjiti tokom lagerovanja, pa je prvi korak u preradi lekovitog i aromatičnog bilja konzerviranje biljne sirovine [3]. Najčešći postupak konzerviranja je sušenje na sobnoj temperaturi, a pri preradi veće količine biljne sirovine u sušarama. Za svaki konkretni biljni materijal potrebno je precizno definisati režim sušenja. Sušenje na temperaturama do 40°C zadovoljava u pogledu kvaliteta, ali zbog dugog vremena sušenja ne odgovara industrijskoj proizvodnji (osim temperature i vreme trajanja sušenja utiče na gubitak aktivnih materija).

Osušena biljna sirovina se radi ekstrakcije usitnjava, najčešće mlevenjem, do odgovarajućeg stepena usitnjenosti što zavisi od primenjenog postupka ekstrakcije.

Za izolovanje farmakološki aktivnih komponenata najčešće se primenjuju postupci destilacije pomoću vodene pare, ekstrakcije pogodnim rastvaračima i presovanjem (Slika 1)



Šema 1. Osnovni postupci hemijsko-tehnološke prirode lekovitog i aromatičnog bilja

U poređenju sa preradom aromatičnog bilja destilacijom sa vodenom parom, pri čemu se dobijaju etarska ulja koja sadrže lako isparljive i po pravilu liposolubilne komponente, ekstrakcijom se pored njih mogu izolovati i komponente pretežno hidrofilnog karaktera. Na taj način se ostvaruje potpuniji učinak aktivnih sastojaka određene biljne vrste. Izborom odgovarajućeg rastvarača može da se ostvari visok stepen selektivnosti ekstrakcije što omogućava dobijanje preparata sa standardnim i visokim terapijskim učinkom.

Od velikog broja različitih operacija koje se primenjuju pri ekstrakciji lekovitog bilja posebno je značajna čvrsto-tečna ekstrakcija, koju definišu opšti zakoni prenosa mase, svojstvo polaznog materijala i fizičko-hemijska sličnost rastvarača i aktivnih principa koji se ekstrahuju. Proces prenosa mase u osnovi proizilazi usled procesa difuzije. Razlikujemo molekulsku i turbulentnu difuziju. Molekulska difuzija nastaje kao posledica haotičnog kretanja molekula materije koja se prenosi. Molekuli poseduju određenu kinetičku energiju, koja je pri većim temperaturama veća, pa je i njihova brzina kretanja veća. Usled težnje sistema da uspostavi termodinamičku ravnotežu, molekuli materije koja difunduje kreću se haotično s mesta veće koncentracije ka mestu niže koncentracije, što predstavlja molekulsku difuziju. Pokretačka snaga procesa difuzije je razlika koncentracija rastvorenih materija u fazama koje su u kontaktu. Ukoliko je ova razlika veća, veće količina materije će difundovati za jedno te isto vreme, pri jednakim ostalim uslovima. Povećanje razlike koncentracija, kao i povećanje temperature pozitivno utiču na brzinu difuzije, ukoliko pri tome raste i brzina kretanja molekula [4]. Molekulska masa materije koja difunduje, takođe utiče na difuzioni proces, kao i veličina površine kontaktnih faza i debljina sloja kroz koji se proces difuzije odvija. Difuzija je brža ukoliko je površina kontakta veća, a debljina sloja manja. Prenos materije molekulskom difuzijom je veći ukoliko se proces difuzije odvija duže vremena.

Uticaj pojedinih faktora na proces difuzije je matematički definisan prvim Fikovim zakonom difuzije. Ovaj zakon karakteriše stacionarni proces proces difuzije u kome je koncentracija materija u jednoj tački sistema konstantna. Drugi Fikov zakon difuzije predstavlja proces nestacionarne difuzije (koncentracija materije se menja u svakoj tački sistema) i izražava promenu koncentracije materije koja difunduje u određenoj tački sistema u zavisnosti od vremena [4,5].

Pri ekstrakciji aktivnih principa iz lekovitog bilja prisutna su tri tipa difuzije, pa je ukupni koeficijent prenosa mase  $K$  definisan izrazom:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{E_D} + \frac{1}{D_u} + \frac{S}{D_s}} \quad (1)$$

gde su:  $D_u$  - koeficijent unutrašnje difuzije

$D_s$  - koeficijent slobodne difuzije

$E_D$  - koeficijent turbulentne difuzije

Pri ekstrakciji aktivnih principa iz lekovitog bilja, pripremljenog usitnjavanjem, vrši se kvašenje, rastvaranje i brzi prenos mase supstanci iz razorenih ćelija, kao i spora difuzija rastvorenih supstanci iz nerazorenih ćelija. Proizilazi da proces ekstrakcije ima dva perioda, brzu i sporu ekstrakciju. Prvi period ekstrakcije teče nekoliko puta brže od drugog i zavisi, u osnovi, od hidrodinamičkih uslova. Drugi period ekstrakcije teče sporo i zavisi od koeficijenta prenosa mase unutar biljnog materijala (koeficijent unutrašnje difuzije  $D_u$ ). Ovaj koeficijent može da se odredi na osnovu Fikove jednačine nestacionarne difuzije odnosno vrednosti koeficijenta pravca,  $\text{tg } \alpha$ , pravolinijske zavisnosti  $\log q_i/q_o$  od  $\tau$ .

Na osnovu rezultata ispitivanja kinetike ekstrakcije, može aproksimativno da se izračuna koeficijent unutrašnje difuzije ( $D_u$ ) na osnovu izraza:

$$\frac{q_i}{q_o} = \alpha e^{-b^* \frac{D\tau}{h^2}} \quad \text{odnosno} \quad (2)$$

$$\log \frac{q_i}{q_o} = \frac{\log \alpha - 0,434b^* \cdot D}{h^2 \cdot \tau} \quad (3)$$

$$\text{tg } \alpha = \frac{0,434b^* \cdot D}{h^2} \quad (4)$$

gde je:

$\alpha$  i  $b^*$  - konstante koje se definišu u zavisnosti od prepostravljen geometrije usitnjenog materijala

(za ploču:  $a = \frac{8}{\pi^2}$ ,  $b^* = \pi^2$ ; za cilindar  $a = 0,6954$ ,  $b^* = 5,76$ ; za sferu:  $a = \frac{6}{\pi^2}$ ,  $b^* = \pi^2$ );

$h$ -konstanta, odnosno geometrijski parametar usitnjenog materijala ( $h=1$  za ploču,  $h=d_s/2$  za cilindar i sferu;  $l$ -dužina,  $d_s$ -srednji prečnik čestica);  $D_u$ -koeficijent unutrašnje difuzije.

Uvođenjem vrednosti za date konstante dobijaju se izrazi za aproksimativno izračunavanje koeficijenta unutrašnje difuzije  $D_u$ :

- za ploču  $D_u = 0,059 \cdot \text{tg } \alpha \cdot d_s^2$  (5)

- za cilindar  $D_u = 0,1 \cdot \text{tg} \alpha \cdot d_s^2$  (6)

Količina materije dobijena brzom ekstrakcijom, ili koeficijent brze ekstrakcije (b), je parametar koji karakteriše proces ekstrakcije. Ako je u usitnjenoj sirovini količina razorenih ćelija mala, ekstrakcija se veoma usporava i određena je u osnovi brzinom difuzije supstance iz biljnog materijala. Pri povećanju količine razorenih ćelija u sirovini dolazi do povećanja brzine ekstrakcije kao posledica povećanja koeficijenta brze ekstrakcije [5,6].

Određivanje parametara brze ekstrakcije predstavlja ispitivanje kinetike ekstrakcije. U različitim vremenskim intervalima ekstrakcije određuje se sadržaj ekstrahovanih materija ( $q_i'$ , %) pomoću koga se na osnovu početnog sadržaja materija u polaznoj sirovini ( $q_0$ , %) izračunava sadržaj zaostalih materija ( $q_i = q_0 - q_i'$ , %) posle vremena ( $\tau$ ).

Koeficijent brze ekstrakcije (b) može da se odredi grafički i analitički, na osnovu eksperimentalnih rezultata ispitivanja kinetike ekstrakcije tj. zavisnosti  $\log q_i/q_0$  od  $\tau$  [5].

Na Slici 2 prikazan je dijagram kinetike ekstrakcije (dijagram zavisnosti logaritma odnosa sadržaja materije koja zaostaje u sirovini u toku određenog vremena, i početnog sadržaja,  $\log (q_i/q_0)$  od vremena ekstrakcije  $\tau$ ). Za izračunavanje koeficijenta brze ekstrakcije primenjuje se jedno od rešenja nestacionarne difuzije Fika:

$$\log \frac{q_i}{q_0} = \log a - k \tau ; b=1-a \quad (7)$$

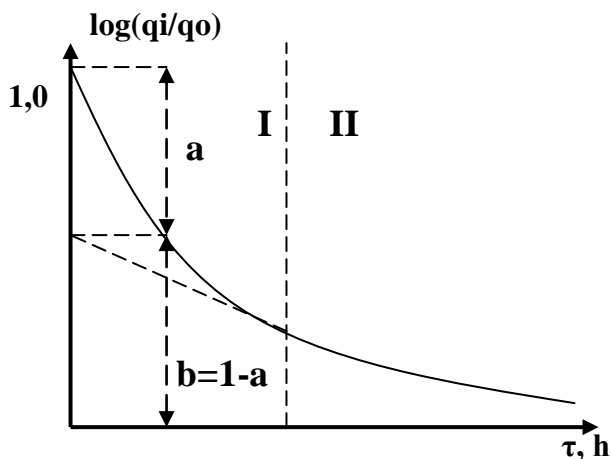
k - koeficijent spore difuzije

b – koeficijent brze ekstrakcije;  $b=1-a$

a – parametar čija se vrednost dobija evaluiranjem eksperimentalnih podataka po postupku koji je prikazan na Slici 2.

$\tau$  - vreme (h)





Slika 2. Dijagrami kinetike ekstrakcije

*I - period brze ekstrakcije*

*II - period spore ekstrakcije*

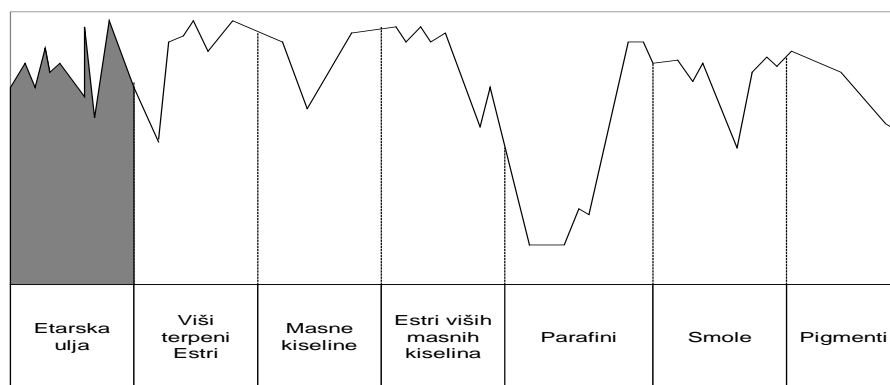
S obzirom na primenjen ekstragens, ekstrakcija se može izvršiti:

- destilacijom pomoću vodene pare
- ekstrakcijom pogodnim rastvaračem
- ekstrakcijom gasovima pod pritiskom

### 2.1.1. Destilacija pomoću vodene pare

Destilacija pomoću vodene pare je veoma stari postupak za koji je karakteristično da je temperatura destilacije uvek niža od 100°C. Od 1500-te godine počela je da se intenzivno primenjuje i još uvek se najčešće koristi za proizvodnju etarskih ulja u užem smislu (Slika 3). Bazira se na relativno velikoj isparljivosti komponenata odgovornih za aromu i može da se izvodi na atmosferskom pritisku, pod pritiskom ili u vakuumu.

Svež ili osušen biljni materijal se dovodi u kontakt sa ključalom vodom (hidrodestilacija) ili parom (destilacija vodenom parom), što uslovljava razaranje sekretornih struktura, i samim tim, oslobađanje isparljivih komponenata koje su u njima sadržane [7]. Parna faza sa isparljivim komponentama se kondenzuje. Relativna nemešljivost organskog ekstrakta i vode omogućava odvajanje ekstrakta sa vrha organskog sloja. Ekstrakti dobijeni na ovaj način se često nazivaju „etarska ulja“ pošto sadrže isparljive komponente odgovorne za aromu sveže biljne sirovine. Usled ovih promena menjaju se i lekovita svojstva. Destilacija pomoću vodene pare može da bude pogodna samo za relativno stabilna i u vodi slabo rastvorna etarska ulja, koja se mogu dobiti u visokom prinosu [6,8].



Slika 3. Tipičan sastav ekstrakta izolovanog destilacijom vodenom parom (šrafirana površina)

Pri destilaciji etarskog ulja sa vodom radi se o binarnim sistemima koji se sastoje od dve tečnosti koje se međusobno ne mešaju niti reaguju. Kod ovih sistema parcijalni pritisak jedne komponente je jednak je naponu pare koji ima ta komponenta na posmatranoj temperaturi, odnosno ovakva tečnost se ponaša kao da je sama u sudu. Ukupan pritisak para iznad smeše (P), prema Daltonovom zakonu, jednak je zbiru parcijalnih pritisaka komponentata ( $p_v$  - parcijalni pritiska vode i  $p_e$  - parcijalni pritisak etarskog ulja):

$$P = p_v + p_e$$

Temperatura ključanja smeše je niža od temperature ključanja svake komponente smeše, tako da bez obzira koliko je visoka tačka ključanja etarskog ulja, sa vodom će ono destilovati na temperaturi nižoj od 100°C, na atmosferskom pritisku. Osnovni nedostatak postupka destilacije pomoću vodene pare je činjenica da se, usled termičkog tretmana i hidrolize, mnoge komponente sadržane u etarskom ulju transformišu, tako da miris ulja ne odgovara u potpunosti nativnom mirisu biljke iz koje je dobijeno.

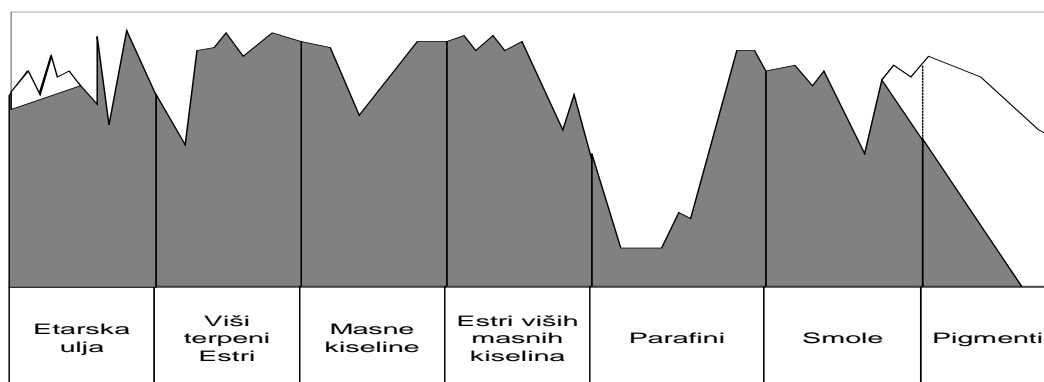
Radi ekstrakcije lekovitog i aromatičnog bilja najčešće se koristi voda i smeša alkohol-voda kao rastvarači, pri čemu dobijeni proizvodi predstavljaju konkretan proizvod - tečni ekstrakt (*Extracta fluida*) čija primena je moguća za izradu instant proizvoda, kao i za dobijanje drugih ekstrakata – gustih (*Extracta spissa*) i suvih (*Extracta sicca*). Smeša alkohol-voda kao rastvarač primenjen u malim količinama nije toksičan za ljudski organizam.

Za dobijanje navedenih ekstrakata se mogu primeniti najrazličitiji postupci: maceracija, remaceracija, digestija, perkolacija, kako propisuje farmakopeja, ili pak postupci višestupne ekstrakcije, najčešće višestupne protivstrujne ili kontinualno protivstrujne ekstrakcije. Za dobijanje proizvoda u različitim farmaceutskim oblicima proizvode se ekstrakti lekovitog bilja na bazi tečnog ekstrakta, delimičnim odstranjivanjem rastvarača (20-30% suve materije)

korišćenjem sušnice sa raspršivanjem (spray dryer), uparivača, kao na primer, uparivač sa prinudnim kretanjem fluida, uparivač sa razmazanim filmom, filmski uparivač, rotacioni. Međutim, za dobijanje suvih ekstrakata postupkom sušenja u komornim sušarama polazi se od gustog ekstrakta čiji sadržaj suve materije iznosi 70%.

### 2.1.2. Ekstrakcija pogodnim rastvaračima

Ekstrakcija pogodnim rastvaračima kao postupak za dobijanje ekstrakata i etarskog ulja u širem smislu iz biljnog materijala (Slika 4) ima prednosti nad postupkom destilacije etarskih ulja pomoću vodene pare, jer se sam postupak izvodi na znatno nižim temperaturama. Etarska ulja dobijena na ovaj način imaju prirodniji miris, jer je termičko razlaganje prirodnih mirisnih supstanci svedeno na minimum ili potpuno izbegnuto [5,9]. Na ovaj način dobijaju se proizvodi koji sadrže pretežno lipofilne (etarsko ulje) kao i hidrofilne komponente. Ovako dobijeni proizvodi su kompletniji prvenstveno u pogledu farmakološkog delovanja i imaju potpun učinak. Dobijeni tečni ekstrakt se najčešće podvrgava uparavanju radi odstranjivanja rastvarača, pri čemu dolazi do izvesnog gubitka lako isparljivih komponenata.



Slika 4. Tipičan sastav ekstrakta izolovanog ekstrakcijom organskim rastvaračem<sup>15</sup> (šrafirana površina)

Da bi se proizveo tečni ekstrakt sa visokim sadržajem suvog ostatka radi proizvodnje suvog ekstrakta, a izbegla operacija dobijanja gustog ekstrakta, za ekstrakciju se najčešće primenjuje višestupna protivstujna ekstrakcija, pri čemu se dobijaju tečni ekstrakti sa sadržajem suve materije i do 20%. Ovakav jedan postupak dobijanja tečnog ekstrakta ginka biće opisan u ovoj disertaciji. Kako destilacija vodenom parom ima nedostatke, koji su ranije navedeni, određene nedostatke ima i ekstrakcija organskim rastvaračima. Tako na primer, otežano je potpuno uklanjanje rastvarača iz ugušćenog ekstrakta, a posebno primesa prisutnih u njima koje kvare organoleptička svojstva i štetno deluju na ljudski organizam.

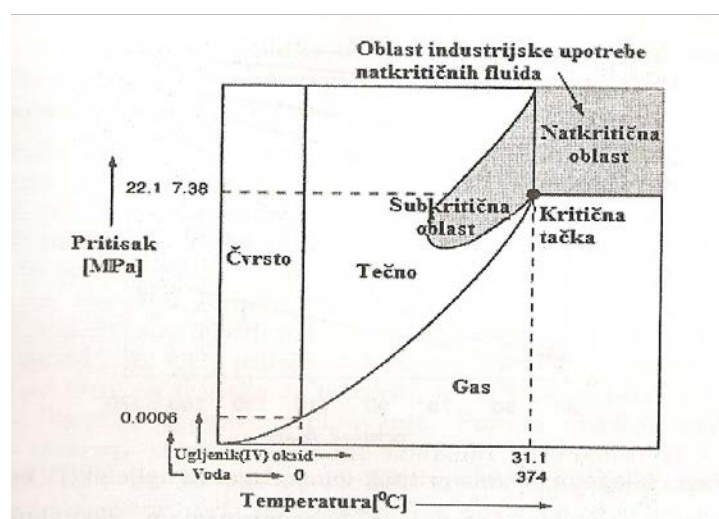
Osim toga, organski rastvarači nisu selektivni tako da rastvaraju visoko molekulske teško isparljive sastojke kao što su smole, masna ulja i pigmente. Organski rastvarači, koji se koriste za ekstrakciju, često su toksične, kancerogene i eksplozivne supstance.

### 2.1.3. Ekstrakcija gasovima pod pritiskom

Poslednjih godina se za ekstrakciju biološki aktivnih materija iz biljnih materijala sve više koriste komprimovani i netoksični gasovi, pre svega CO<sub>2</sub>, čime se eliminišu glavni nedostaci tradicionalnih tehnika ekstrakcije. Ekstrakcija gasovima pod pritiskom, predstavlja dobru alternativu klasičnim postupcima jer ima niz prednosti [5,10,11,12]. Osnovna prednost ekstrakcije gasovima pod pritiskom je što se ona izvodi na umerenim temperaturama, pa se može primeniti za izdvajanje slabo isparljivih, termički degradabilnih jedinjenja. Dalje, natkritični fluid ima neuobičajeno široke mogućnosti za selektivnu ekstrakciju, frakcionisanje i prečišćavanje prirodnih proizvoda, jer se promenom njegove gustine može regulisati prinos i sastav dobijenog ekstrakta. Zbog toga je ovaj način ekstrakcije posebno interesantan za prehrambenu i farmaceutsku industriju [13]. Ekstrakcija gasovima pod pritiskom, a posebno ugljenik (IV)-oksidom, danas zauzima posebno mesto za dobijanje ekstrakata visokog kvaliteta. (u daljem tekstu umesto naziva ugljenik (IV)-oksid koristiće se ugljendioksid).

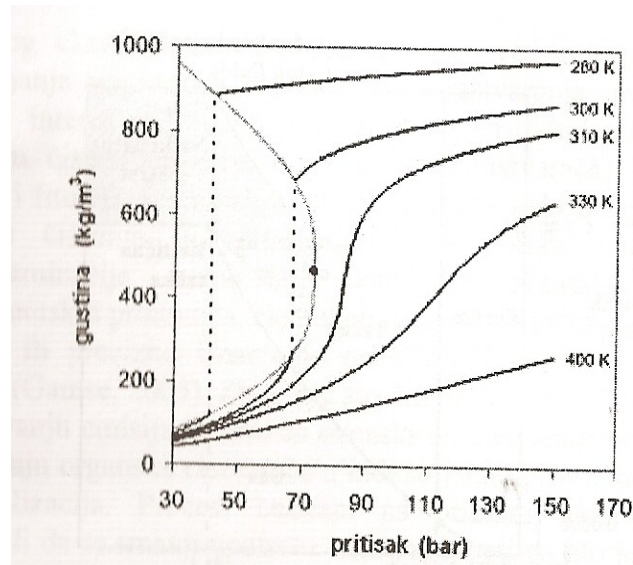
Zbog sve strožih propisa o zaštiti životne sredine i sprečavanju emisije štetnih gasova za ozonski omotač natkritični fluidi sve više zamenjuju organske rastvarače u industrijskim procesima prečišćavanja i rekristalizacije.

Natkritična ekstrakcija je postupak ekstrakcije fluidom koji se nalazi u natkritičnom stanju na temperaturi i pritisku iznad kritičnih vrednosti (Slika 5).



Slika 5. Fazni P-T dijagram sa vrednostima kritičnih parametara za ugljenik (IV)-oksid i vodu

Fizičke osobine fluida u natkritičnom stanju nalaze se između istih osobina gasova i tečnosti što ih čini pogodnim rastvaračima. Natkritični fluidi se odlikuju velikom gustom, bliskoj gustini tečnosti što pogoduje njihovoj moći rastvaranja. Difuzivnost natkritičnih fluida je velika i bliska difuzivnosti gasova, što im omogućava lakoću prodiranja u biljni materijal. Bitna odlika gasova u natkritičnom stanju je da u blizini kritične tačke sa malim porastom pritiska dolazi do velikog porasta gustine. Na Slici 6 prikazan je fazni dijagram gustina-pritiska-temperatura za ugljendioksid.



Slika 6. Fazni dijagram gustina - pritisak - temperatura za ugljendioksid

Ovaj način ekstrakcije je izuzetno efikasan za izolovanje supstanci srednjih molekularnih masa i relativno male polarosti. Rastvorljivost polarnijih supstanci se može poboljšati dodavanjem malih količina polarnih supstanci (kosolvenata).

Osnovna prednost natkritične ekstrakcije u odnosu na ostale vidove separacije (destilacija, ekstrakcija organskim rastvaračima) je u mogućnosti ekstrakcije na umerenim temperaturama i u dobijanju čistog ekstrakta bez tragova rastvarača, sterilnih, bakteriološki ispravnih, što je veoma važno zbog primene u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Korišćenje umerenih pritisaka daje rastvaraču veliku selektivnost i tako se, koliko je to moguće, izbegava koekstrakcija kutikularnog voska.

Osnovni nedostatak natkritične ekstrakcije su znatno povećani investicioni troškovi, dok se prednosti mogu sumirati ovako:

- Natkritični fluidi imaju moć rastvaranja sličnu tečnim organskim rastvaračima, ali istovremeno imaju veće vrednosti koeficijenta difuzivnosti, niže vrednost viskoznosti i niži površinski napon

- Separacija rastvorka od rastvarača je brza i jednostavna, pošto se moć rastvaranja natkritičnog fluida može menjati promenom pritiska i temperature tj. promenom gustine - smanjenje gustine se može postići dekompresijom i/ili zagrevanjem fluida
- Dodavanjem polarnog kosolventa može da se utiče na selektivnost procesa
- Primenom u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji eliminiše se problem ostatka organskih rastvarača u farmaceutskim i prehrambenim proizvodima, koji su inače prisutni kada se koriste konvencionalni organski rastvarači
- Sam natkritični fluid je obično jeftin i bezbedan za korišćenje
- U industrijskim razmerama lako je natkritične fluide reciklovati jer se gas koji je rastvoren u ekstraktu, u atmosferskim uslovima oslobađa spontano i tako izbegava skupa faza uklanjanja rastvarača (u konvencionalnoj ekstrakciji organskim rastvaračima glavni pogonski troškovi potiču od potrošnje energije u fazi uklanjanja rastvarača iz dobijenog ekstrakta).

U postupcima natkritične ekstrakcije, kao rastvarači, koriste se različiti gasovi [14-17]. Izbor gasa zavisi, između ostalog, od njegove sposobnosti rastvaranja i kompatibilnosti sa željenim proizvodom, kritičnih parametara i sigurnosti pri korišćenju.

Za ekstrakciju prirodnih supstanci (mirisne, začinske i farmakološki aktivne supstance) izrazitu prednost pokazuje CO<sub>2</sub> [18-21]. Kao najpogodniji rastvarač u postupcima natkritične ekstrakcije (poseduju dobru moć rastvaranja niza prirodnih proizvoda) pokazao je ugljendioksid, zbog svoje netoksičnosti, fiziološke inaktivnosti, hemijske inertnosti, tako da nema opasnosti od toksičnih primesa koje zaostaju u ekstraktu, nezapaljivosti, lake dostupnosti, niske cene. Niske vrednosti kritičnih parametara (31°C i 7,38 MPa), omogućavaju ekstrakciju na relativno niskim temperaturama, što je od velikog značaja za ekstrakciju termički degradabilnih supstanci jer prisustvo termički nestabilnih komponenti i hidroliza pojedinih komponenata predstavljaju ozbiljan problem pri dobijanju prirodnih mirisa i aroma i pri izolovanju aktivnih komponenata. Ekstrakcioni procesi sa ugljendioksidom spadaju u tzv. "čiste tehnologije", bez sekundarnih proizvoda koji zagađuju životnu sredinu.

U Tabeli 1 prikazane su fizičko-hemijske konstante ugljendioksida.

Tabela 1. Fizičko-hemijske konstante ugljendioksida

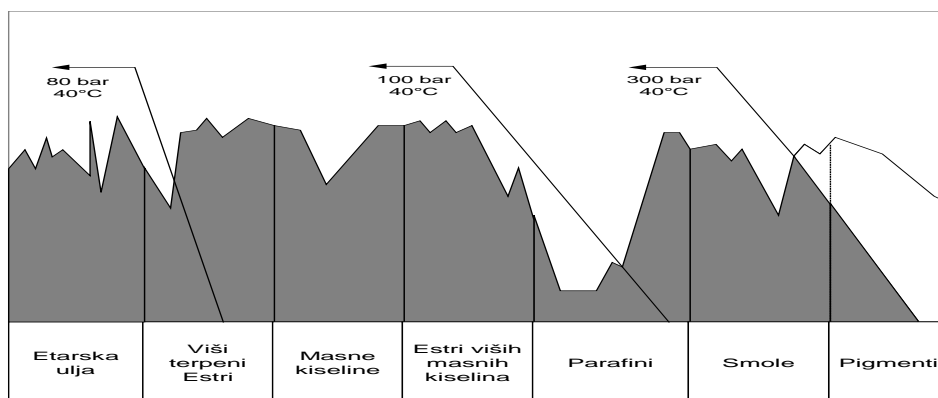
Tačka sublimacije	-78°C
Trojna tačka	-56,6°C, 5,1 atm
Gustina pri 0°C i 34,3 atm	0,914 kg/m <sup>3</sup>
Napon pare pri:	
-50°C	6.63 atm
-20°C	19,4 atm
0°C	34,9 atm
Kritična temperatura	31,1°C
Kritični pritisak	73-77 atm
Kritična zapremina	2,15 cm <sup>3</sup> /g
Latentna toplota isparavanja na trojnoj	83,12 cal/g
Dielektrična konstanta pri -50°C	1,608
Dipolni momenat	0
Index prelamanja na:	
12,5°C	1,199
18,0°C	1,186

U zavisnosti od stanja u kome se nalazi CO<sub>2</sub>, razlikujemo postupke ekstrakcije tečnim (subkritičnim) ugljendioksidom, kada je temperatura ispod 31,1°C, a pritisak nešto iznad ili ispod 73,8 bar, i postupak ekstrakcije u natkritičnom (superkritičnom) stanju kada su pritisak i temperatura iznad kritičnih vrednosti. Drugim rečima izborom pogodne kombinacije pritiska i temperature mogu se podešavati željeni efekti rastvaranja, odnosno može se postići određena selektivnost ugljendioksida kao ekstragensa.

Prva primena ugljendioksida kao ekstragensa bila je u njegovom tečnom stanju. Ugljendioksid je izrazito nepolaran rastvarač, po polarnosti sličan pentanu i heksanu. I moć rastvaranja tečnog ugljendioksida nije velika u poređenju sa uobičajenim tečnim rastvaračima. Za takve, izrazito nepolarne rastvarače, je karakteristično da se sa povećanjem temperature obično smanjuje moć rastvaranja[14].

Naime, tečni CO<sub>2</sub> ima dobru sposobnost rastvaranja određenih supstancija, na primer dobro su rastvorna jedinjenja male molske mase koja sadrže kiseonik (ketoni, estri, alkoholi, etri, aldehidi), jedinjenja male molske mase i nepolarna (alkani, alkeni, terpeni i drugi ugljovodonici), jedinjenja male molske mase i polarna (karbonske kiseline, sirćetna kiselina i dr.). Smanjena je rastvorljivost navedenih jedinjenja sa većom molskom masom, kao i gore navedenih jedinjenja supstituisana polarnim grupama (COOH, OH, NO<sub>2</sub>). Malo su rastvorne masne kiseline i njihovi estri. Nerastvorna su jedinjenja kao što su hlorofil, karotenoidi, šećeri, aminokiseline i većina neorganskih soli, alkaloidi i dr. [22]. Jedinjenja rastvorljiva u tečnom ugljendioksidu, takođe su rastvorljiva u natkritičnom ugljendioksidu. Nadalje, među komponentama sadržanim u aromatičnim biljkama, relativno laka i isparljiva

etarska ulja su, prema dosadašnjim istraživanjima, najrastvorljivije komponente u natkritičnom ugljendioksidu. Međutim, i komponente veće molekulske mase, uključujući epikutikularne vosakove, obično se koekstrahuju sa etarskim uljem. Ekstrakti dobijeni natkritičnim ugljendioksidom prikazani su na Slici 7.



Slika 7. Tipičan sastav ekstrakta dobijenog ekstrakcijom natkritičnim CO<sub>2</sub> (šrafirana površina)

Na slici 7 se uočava da je pri ekstrakciji ugljendioksidom pri nižim vrednostima pritiska ekstrakt uglavnom sastavljen od frakcije etarskog ulja i veoma sličan ekstraktu koji se dobija destilacijom. Povećanjem pritiska, i samim tim povećanjem moći rastvaranja ugljendioksida, koekstrahuju se jedinjenja veće molekulske mase. Na visokim pritiscima ugljendioksida sastav dobijenog ekstrakta postaje veoma sličan ekstraktu dobijenom organskim rastvaračima (oleorezinima).

Sa druge strane ugljendioksid ima i neke nedostatke. Ima relativno malu moć rastvaranja polarnih jedinjenja i jedinjenja sa dugim lancima, mada se ona može prilično povećati dodatkom kosolvenata [17, 19, 23]. Povećana rastvorljivost proističe iz fizičkih i hemijskih interakcija kosolvent-rastvorak i, u manjoj meri, iz povećane gustine rastvarača. Specifične fizičke interakcije (dipol-dipol, dipol-indukovani dipol i indukovani dipol-indukovani dipol) i hemijske interakcije (stvaranje vodoničnih veza) u velikoj meri zavisi od polarosti kosolventa. Napolarni kosolventi se najčešće koriste za povećanje gustine ekstragensa radi ekstrahovanja ugljovodonika velike molekulske mase. Za ekstrakciju i frakcionisanje lakših prirodnih jedinjenja od većeg značaja je korišćenje polarnih kosolvenata koji imaju jak efekat na polarizaciju ugljendioksida. Dodatkom polarnih kosolvenata poboljšava se ekstrakcija polarnih komponenata. Među najprihvatljivijim kosolventima su voda i etanol (zbog zapaljivosti ograničena mu je upotreba u industriji).



Relativno visok kritični pritisak ( $p_c=73,8$  bar), kada se poredi sa drugim gasovima zahteva korišćenje opreme za visoke pritiske, što uslovljava povećanje kapitalnih troškova u fabrici [24].

Prema postavljenom zadatku i biljnom materijalu koji se ekstrahuje, podešavaju se postupak i aparatura za ekstrakciju natkritičnim CO<sub>2</sub>. Moguća su dva potpuno različita slučaja, i to:

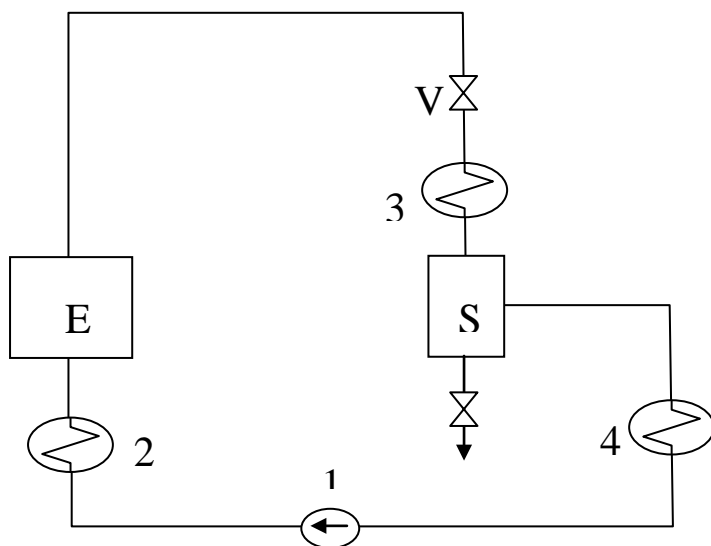
- dobijanje ekstrakta, a rafinat nema ili ima malu upotrebnu vrednost;
- dobijanje delimično ekstrahovanog biljnog materijala, čime se poboljšavaju njegova svojstva, a ekstrakt je od sekundarnog značaja.

Za dobijanje ekstrakta, primenom natkritičnog CO<sub>2</sub>, mogući su različiti postupci:

- izotermni postupak (ekstrakcija se izvodi na konstantnoj temperaturi i povišenom pritisku, a izdvajanje ekstrakta snižavanjem pritiska, pri čemu se i odvaja ekstragens u gasovitom stanju, koji može da se vrati u ekstrakcioni ciklus);
- izobarski postupak (ekstrakcije koji se izvodi pri konstantnom pritisku, a izdvajanje ekstrakta promenom temperature);
- izobarno-izotermni postupak (ekstrakcija i izdvajanje proizvoda se vrši na konstantnom pritisku i temperaturi)

Od pritiska i temperature zavisi gustina rastvarača odnosno moć rastvaranja ekstragensa, ali je veoma važna i isparljivost rastvorka. Kada dominira prvi efekat, povećanje gustine ugljenik (IV)-oksida može da se postigne izotermnim povećanjem pritiska ili izobarskim smanjenjem temperature. Međutim porast temperature na konstantnom pritisku dovodi, sa jedne strane do pada gustine natkritičnog rastvarača što dovodi do smanjenja rastvorljivosti, i sa druge strane, do eksponencijalnog rasta pritiska pare manje isparljive supstance, što dovodi do povećanja rastvorljivosti. Na dovoljno visokim pritiscima, smanjenje gustine usled povećanja temperature je zanemarljivo, tako da povećanje pritiska pare vodi do veće koncentracije neisparljive supstance u parnoj fazi. Ako je isparljivost rastvorka dominantan efekat, povećanje rastvorne moći postiže se izobarnim povećanjem temperature, koje uslovljava smanjenje gustine; veće temperature često uzrokuju veću brzinu ekstrakcije, ako pritisak nije nizak [25,26]. S druge strane, transportne osobine rastvarača (samo-difuzivnost i viskoznost) i rastvorka (binarna difuzivnost) se poboljšavaju sa porastom temperature, a opadaju sa porastom pritiska.

Uređaj za ekstrakciju gasovima pod pritiskom može da se prikaže pojednostavljenom šemom (Slika 8).



Slika 8. Uprošćena šema postrojenja za ekstrakciju gasovima pod pritiskom

Biljni materijal za ekstrakciju se pripremi usitnjavanjem (mlevenje ili seckanje) i unese u ekstraktor (E). U višestepenom kompresoru (1) CO<sub>2</sub> se komprimuje na radni pritisak, a zatim se u izmenjivaču toplote (2) podesi radna temperatura i ekstragens propušta kroz sloj droge u ekstraktoru. Komprimovani gas ekstrahuje određene sastojke lekovitog bilja, nakon čega se pomoću ventila (V) smanjuje pritisak, uz delimično pretvaranje gasa u tečnost. U separatoru (S), smanjenjem gustine rastvarača, dolazi do izdvajanja ekstrakta, na dnu, a ugljendioksid se kondenzuje u kondenzatoru (4) i preko kompresora (1) se ponovo vraća u proces ili se ispušta u atmosferu, ako je takva konstrukcija uređaja.

Druge varijacije u ekstrakcionom postupku uključuju korišćenje kosolventa radi povećanja rastvorljivosti ili selektivnosti i korišćenje više separatora da bi se postiglo frakcionisanje ekstrakta. Tipičan primer je korišćenje prvog separatora za taloženje većeg dela kutikularnog voska i drugog separatora za sakupljanje etarskog ulja pri čemu izbor radnih parametara u svakom separatoru zavisi od rastvorljivosti etarskih ulja i kutikularnog voska.

## 2.2. Ginko (*Ginkgo biloba* L.)

Ginko (*Ginkgo biloba* L.) je veoma stara biljna vrsta koja se vekovima koristi u staroj kineskoj medicini za spravljanje proizvoda koji imaju blagotvorno delovanje. Tek 1690 godine, botaničar Engelbert Kaempfer je doneo u Evropu. *Ginkgo biloba* je jedina vrsta razreda *Ginkgoatae* i reda *Ginggoales* koja se održala na svojim prirodnim staništima u istočnoj Kini. Red *Ginkgoales* danas obuhvata samo jednu familiju –*Ginkgoaceae*, ona samo jedan rod *Ginkgo*, a ovaj samo jednu reliktnu vrstu *Ginkgo biloba* [Farmakognozija Gorunović].

**Opis biljke:** *Ginkgo biloba* L. je listopadno drvo koje raste do 40 m u visinu, sa granatom krunom piramidalnog oblika. Deo biljke koji se koristi za dobijanje različitih medicinskih sredstava je list. List je karakterističan po svom obliku (Slika 9). Liska je na dugačkoj dršci trougaona, vršnim delom tupa i duboko po sredini usečena. Ime vrste dolazi usled toga što je liska podeljena u dva režnja, lat. *lobus* – režanj. Nervatura liske je račvasta (dihotoma), što je veoma primitivan karakter. Biljka je dvodoma. Na muškim jedinkama ginka se na kratkim izdancima obrazuje veliki broj resa sa sitnim ljuspama u čijim pazusima se obrazuju prašnici. U prašnicima je konac na kome su viseće polenove kesice. Pored njih se obrazuje kita listova. Polenova zrna se raznose vetrom. Ženska jedinka Ginka daje plod sa semenom. Jezgro semenke je meko, žuto-zeleno boje i jestivo je. Sjajna spoljna ljuska semena sadrži toksine čija je funkcija da zaštiti drvo od štetočina.



Slika 9. *Ginkgo biloba* - list, plod

Samo se lišće ginka koristi za dobijanje ekstrakata, i s obzirom na potrebne količine ginko se gaji na velikim plantažama Kine, Japana, Koreje, severne Amerike, a takođe i u Evropi, na primer u južnoj Francuskoj (Bordo), sadi se u redovima i orezuje na malu visinu, kako bi se stvorio veći

broj izdanaka, da bi se omogućila mehanizovana berba, mašinama koje vakuum pumpama otkidaju lišće bez oštećenja izdanaka. Lišće se ubira se u jesen, dok je još zeleno, kada sadrži najveće količine aktivnih sastojaka [27]. Komercijalni ekstrakti ( aceton/voda, odnos 35-67: 1 droga-ekstrakt) pripremaju se od lišća sa stabala koja su odgajana u skladu dobrom poljoprivrednom praksom - GAP (Good Agricultural Practices).

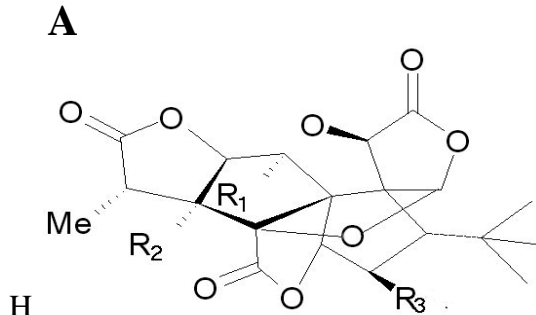
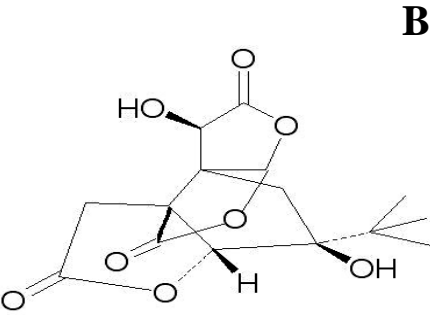
Lekovitost ove biljne vrste se zasniva na njenom složenom hemijskom sastavu. Lišće sadrži, najgrublje rečeno, komponente pretežno lipofilnog karaktera (etarsko ulje), kao i hidrofilne komponente, u prvom redu fenole i flavonoide i dr.

Lišće ginka, pored navednog sadrži etarsko ulje, lignine, proantocijanidine, terpene neflavonoidnog porekla, taninsku kiselinu.

Farmakološko delovanje potiče od pretežno polarnih komponenti. Sadrži aktivne komponente koje pripadaju grupi terpenoida i flavonoida, a sadrži i jednostavne i acetilovane heterozide kvercetina, kemferola i biflavona, amentoflavona [28, 29]. Drugu grupu aktivnih sekundarnih metabolita predstavlja kompleks diterpenskih jedinjenja koja se nazivaju ginkolidi [30-34].

Važni ginkolidi i opšta struktura ginkolida prikazana su na Slici 10 A. Delimičnim razlaganjem diterpena, formiraju se odgovarajuća seskviterpenska jedinjenja (bilobalidi) [35]. Opšta struktura bilobalida je prikazana na Slici 10B.

Slika 10. Opšta struktura ginkolida i bilobalida iz lišća ginka

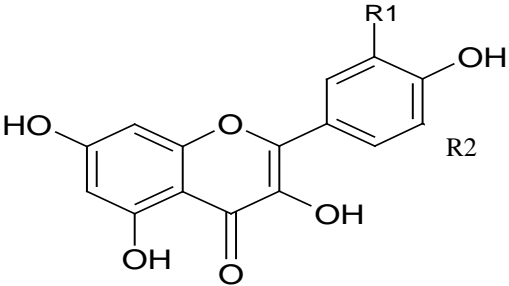
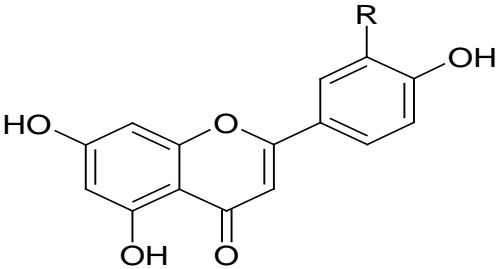
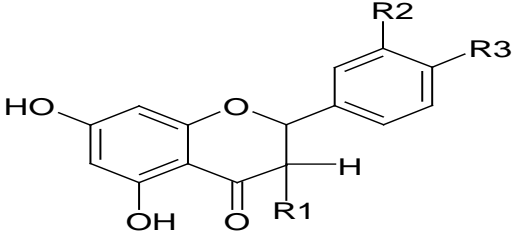
Ginkolidi diterpenske strukture (ginkolidi (A) i bilobalid (B))			
			
NAZIV GINKOLIDA	R1	R2	R3
ginkolid A	OH	H	H
ginkolid B	OH	OH	H
ginkolid C	OH	OH	OH
ginkolid J	OH	H	OH
ginkolid M	H	OH	OH

Suvo lišće sadrži 0,1-0,25% laktonskih terpena uključujući 5 ginkolida (ginkolid A, B, C, J i M) i bilobalida. Bilobalidi čine oko 30-40% ove smeše, dok je ginkolid A dominantan. Ginkolidi se u prirodi nalaze u obliku diterpena, dok su bilobalidi opisani kao seskviterpeni. Ipak, bilobalidi su strukturno slični ginkolidima. Zastupljenost ukupnih flavonoida u suvom lišću je 0,5-1,0%.

Važna grupa jedinjenja su jedinjenja koja pripadaju flavonoidima. Flavonoidi predstavljaju smešu mono-, di- i tri-glikozida flavonola kemferola i kvarcetina i nekih biflavonoida (Slika 11) Oni verovatno doprinose aktivnosti ginka, i imaju ulogu hvatača slobodnih radikala.

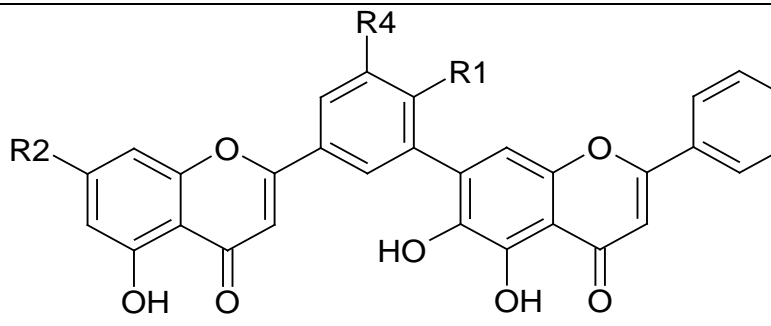
Ekstrakti ginka su najčešće standardizovani (sadrže flavonoidne glikozide i laktonske terpene u odnosu 24 : 6 ili 27 : 7 procenata) [37-41].

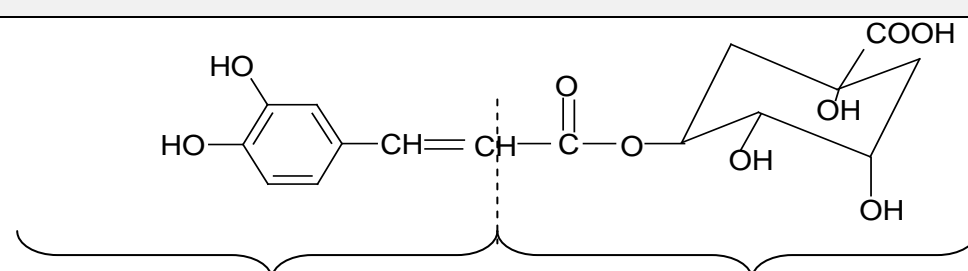
Slika 11. Pojedini glikozidi (flavonoli, flavoni i flavanoni) i njihove strukture

Flavonoli ginka				
<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>Aglikon</b>	<b>Glikozid</b>	
OH	H	Kvercetin (Q)	Q-3-O-Galaktozid (Hiperozid)	
			Q-3-O-Glukozid (Izokvercitrin)	
			Q-3-O-Rutinozid (Rutin)	
H	H	Kemferol (K)	K-3-O-glukozid (Astragalin)	
OH	OH	Miricetin (M)	M-3-O-digalaktosid	
OCH <sub>3</sub>	H	Izoramnetin (I)	I-3-O-rutinozid (Narcisin)	
Flavoni ginka				
<b>R</b>	<b>Aglikon</b>	<b>Glikozid</b>		
H	Apigenin (A)	A-8-C-glikozid (Viteksin)		
OH	Luteolin (L)	L-8-C-glikozid (Orientin)		
Flavanoni ginka				
<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Aglikon</b>	<b>Glikozid</b>
H	H	OH	Naringenin (N)	N-7-O-neohesperidozid (Naringin)
H	OH	OH	Eriodiktiol (E)	E-7-O-rutinozid (Eriocitrin)

H	OCH <sub>3</sub>	OH	Homoeriodiktiol	
H	OH	OCH <sub>3</sub>	Hesperetin (H)	H-7-O-neohesperidozid(Neohesperidin)
				H-7-O-rutinozid (Hesperidin)
OH	OH	OH	Taksifolin	

Slika 12. Biflavoni i fenil-karbonske kiseline i njihove strukture

Biflavoni ginka				
Biflavoni	R1	R2	R3	R4
Amentoflavon	OH	OH	OH	H
Bilobetin	OMe	OH	OH	H
Ginkgetin	OMe	OMe	OH	H
Izoginkgetin	OMe	OMe	OMe	H
5'-metoksibilobetin	OMe	OH	OH	OMe
Sciadopitisin	OMe	OMe	OMe	H

Fenol-karboksilne kiseline ginka	
	
Kafena kiselina                      Kininska kiselina Hlorogenska kiselina	
Hlorogenska kiselina	3-kafenoilkininska kiselina
Neohlorogenska kiselina	5-kafenoilkininska kiselina
	4-kafenoilkininska kiselina
	1-kafenoilkininska kiselina
Izohlorogenska kiselina	1,3-dikafenoilkininska kiselina
	3,5-dikafenoilkininska kiselina

Lišće ginka sadrži i biflavone kao i fenilkarbonske kiseline (Slika 12). Pored flavonoida i laktonskih terpena, lišće ginka sadrži i nepoželjne lipofilne komponente u koje spadaju alkil fenoli. Maksimalni dozvoljeni sadržaj ginkolne kiseline (6-(8-pentadecenil)-2-hidroksibenzoeva kiselina)

u ekstraktima ginka je 5 ppm (German Federal Institute for Drugs and Medical Devices, US manufacturers of phytomedicines).

*Farmakološko delovanje.* Drevni kineski lekari koristili su lišće i seme ginka zbog njihovog svestranog blagotvornog dejstva. Ekstrakt ginka se u tradicionalnoj kineskoj medicini koristi već 5000 godina, jer smeša biološki aktivnih prirodnih supstanci koje sadrži ginko omogućava ekstraktu kompleksni farmakološki učinak.

Farmakološka dejstva ekstrakta su došla do izražaja kod mentalnih procesa, moždane funkcije, kod problema sa koncentracijom, senilnosti, poremećaja pamćenja, demencije. Rezultati naučnih istraživanja o upotrebi ginka kod demencije i Alchajmerove bolesti [42,43] pokazuju da dolazi do poboljšanja sazajnih sposobnosti, pažnje i koncentracije. Obzirom da i uopšteno utiče na cirkulaciju, korišćenje ginka smanjuje neugodnosti vezane za proces starenja, i povećava radnu sposobnost. Ekstrakt pokazuje pozitivno delovanje kod insuficijencije perifernih arterijskih sudova, perifernih vaskularnih oboljenja, Rejnoldovog sindroma, trnjenja, peckanja, ishemije, edema, hipoksije, impotencije, erektilne disfunkcije, hemoroida, inflamacije, migrene, alergija, astme [44]. Ginko poboljšava moždanu mikrocirkulaciju, deluje antioksidativno, smanjujući oksidaciju masti i oštećenja nervnih ćelija usled oksidativnog stresa [33,45-49].

Prema nekim autorima ekstrakt ginka pokazuje i neuroprotektivni efekat [50]. Ekstrakt ginka deluje blago antidepresivno, anksiolitički. Ginko se koristi i kod oštećenja vida (glaukom), kod nesvestica, vrtoglavica, zujanja u ušima. Ginkolidi stimulišu odbrambene mehanizme čime poboljšavaju astmatična i alergijska stanja, bakterijske infekcije [51], kao i stanja posle moždanog i srčanog udara. Preparati na bazi ginka deluju kao antitrombotici (ispoljavaju antiagregacijski efekat kao smanjenje mogućnosti za nastanak tromba), regulišu povišeni, kao i sniženi krvni pritisak [52]. Poželjno ga je koristiti ako postoje problemi s jetrom ili bubrezima, raznim upalama, slabijim sluhom usled starosti, slabljenjem vida, vrtoglavicama, pospešuje iskorišćavanje glukoze, pa je koristan i za dijabetičare [53]. Ubrzava zarastanje rana, olakšava tegobe kod upale vena.

Neželjeni efekti i kontraindikacije su veoma retki i zanemarljivi (u manje od 0,001% slučajeva), ali ipak pri dugotrajnom prekoračenju preporučene doze, kao sporedni učinci mogu da se jave anksioznost, nesanica, mučnina, dijareja, dermatitis. Ekstrakti lišća ginka sadrže alkilfenole (sa alergenskim, citotoksičnim, mutagenim i tumorskim osobinama), kao i izuzetno moćan alergen urušiol, i zbog bezbednosti neophodno je razviti tehnike kojima bi se lako kontrolisao i određivao sadržaj ovih supstanci u finalnom proizvodu [54]. Urušiola mora biti ispod 0,03 ppm da bi se

ekstrakt smatrao bezbednim. Seme je blago toksično i ne bi ga trebalo davati deci, dok ljuske semena nikako ne bi trebalo koristiti, jer mogu da prouzrokuju upalu gastrointestinalnog trakta i bubrega.

Efikasnost ekstrakta ginka se klinički proverava i dokazuje (što nije slučaj sa čajem od lišća jer se pri proizvodnji ekstrakta uklanjaju neka toksična jedinjenja i supstance koje bi mogle da umanje terapijsku aktivnost, a i biljni aktivni sastojci se uglavnom ekstrahuju alkoholom).

Moderna medicinska nauka priznaje svestrana svojstva ginka i danas je najpopularnije i najšire korišćeno prirodno lekovito sredstvo. Zahvaljujući mnogostrukom delovanju ekstrakta iz lišća ginka, na tržištu se javljaju preparati (dijetetski proizvodi) u različitim farmaceutkim oblicima koji se preporučuju za primenu jer značajno doprinose podizanju imunološkog sistema organizma i prevenciji raznih vrsta oboljenja.

Poznati preparati koji su zastupljeni na našem tržištu navedeni su u Tabeli 2.

Tabela 2. Preparati na bazi *Ginka* (dijetetski suplementi) u prometu

---

**MEMORIL®** film tablete - HEMOFARM DD Vršac; DR WILLMAR Schwabe; Nemačka

1 film tableta sadrži suvi ekstrakt lista Ginka 40 mg

**MEMORIL®** kapi - HEMOFARM DD Vršac; DR WILLMAR Schwabe; Nemačka

1 ml rastvora sadrži suvi ekstrakt lista Ginka 40 mg

**TEBONIN®** forte kapi - DR WILLMAR Schwabe

100 ml kapi sadrži suvi ekstrakt lišća Ginka (50:1) 4,0 g podešenog tako da sadrži 960 mg ginkoflavonozida i 240 mg terpenlaktona (ginkolidi, bilobalidi)

**TEBONIN®** obložene tablete - DR WILLMAR Schwabe

1 obložena tableta sadrži suvi ekstrakt lišća Ginka (50:1) 40 mg podešenog da sadrži 9,6 mg ginkoflavonoglikozida i 2,4 mg terpenlaktona (ginkolidi, bilobalidi).

**GINKGO SYXYL** - Fabrika bioloških lekova Petereit GmbH&Co. Elmshorn

rastvor suvog ekstrakta lišća Ginka 100 ml.

**GINKGO D2, SYHYL** - Fabrika bioloških lekova Petereit GmbH&Co., Elmshorn

Jedna tableta proizvedena prema HAB I, propis 9, sadrži: 100 mg Ginka fol. Sicc, D2-trit, HAB I, propis 7, laktoza, krompirov skrob, magnezijum-stearat.

**GINKGO** Heumann - HEUMANN PHARMA GMBH, NURNBERG.

jedna kapsula sadrži suvi ekstrakt lišća Ginka (45-55: 1) 40 mg



**GYNKOBIL®kapi -**

1ml rastvora sadrži 40mg suvog ekstrakta,

**GYNKOBIL ® kapsule –**

jedna kapsula sadrži 40mg suvog ekstrakta

**GYNKOBIL FORTE ® -**

jedna kapsula sadrži 120 mg suvog ekstrakta,

**GINKO FORTE® -**

jedna kapsula sadrži 60mg suvog ekstrakta

**MEGA GINKO ® -**

jedna kapsula sadrži 120mg suvog ekstrakta

**BILOBIL® - Krka - Slovenija**

jedna kapsula sadrži 40mg suvog ekstrakta**MASLINA - GINKO® - Vitalon - Srbija**

jedna tableta sadrži 40mg suvog ekstrakta ginka i 20mg suvog ekstrakta masline

**GINKOMAX® - ESI s.p.a. - Italija**

**TANAKAN® - IPSEN - Francuska**

jedna dražeja sadrži 40mg suvog ekstrakta

**GINKOCEL® - Dietpharm - Hrvatska**

jedna dražeja sadrži 40mg suvog ekstrakta

**GINKOGUARD- Dr. Werner Pharma - Nemačka**

jedna kapsula sadrži 120mg suvog ekstrakta ginka bilobe, 95mg spršenih kola oraha, 60mg spršenog lišća guarane, 144,7mg magnezijuma i 15mg pangamske kiseline

### 3. NAŠI RADOVI

O određivanju etarskog ulja u lišću Ginka u literaturi ima malo podataka. Tako na primer, H. Nenokichi i S. Takeshi su odredili sadržaj etarskog ulja u lišću ginka sa muške (0,0087%) i sa ženske jedinke ginka (0,0083%). Utvrdili su da etarsko ulje ženske i muške jedinke ginka sadrži iste komponente, ali u različitim količinama. Nađeno je da su glavne komponente etarskog ulja alkani sa C19 do C28, s tim da etarsko ulje dobijeno ženske jedinke ginka sadrži dvostruko veću količinu alkana od etarskog ulja sa iz lišća sa muške jedinke. Glavne komponente etarskog ulja su 2,5,8-trimetil-dihidronaftalen i acenaften, dok su u minornim količinama prisutni *p*-cimen, *p*-toluolpropilen i 1,4-dimetil-2,5-diizopropil benzen. Utvrđeno je i prisustvo komponenata sa kiseonikom kao što su *cis*-3-heksenol, *trans*-linalol oksid,  $\alpha$ - i  $\beta$ -jonon, *cis*- i *trans*-4-heksenol, 2-izopropilfenol, timol i heptadeka-3,6,9-trien-1-ol [55].

#### 3.1. Izolovanje i određivanje etarskog ulja iz droge destilacijom pomoću vodene pare

Sadržaj etarskog ulja lišća *Ginka* je veoma nizak. Da bi se izvršila karakterizacija etarskog ulja potrebno je imati na raspolaganju dovoljnu količinu etarskog ulja, radi određivanja njegovog hemijskog sastava i važnih fizičko-hemijskih parametara. Iz tih razloga pristupilo se izdvajanju etarskog ulja lišća *Ginka* u preparativnim razmerama, primenom semipreparativnog postupka izolovanja etarskog ulja destilacijom pomoću vodene pare.

Izdvojeno etarsko ulje imalo je sledeće organoleptičke i fizičko-hemijske karakteristike:

izgled ..... bistra, žućkasto obojena tečnost

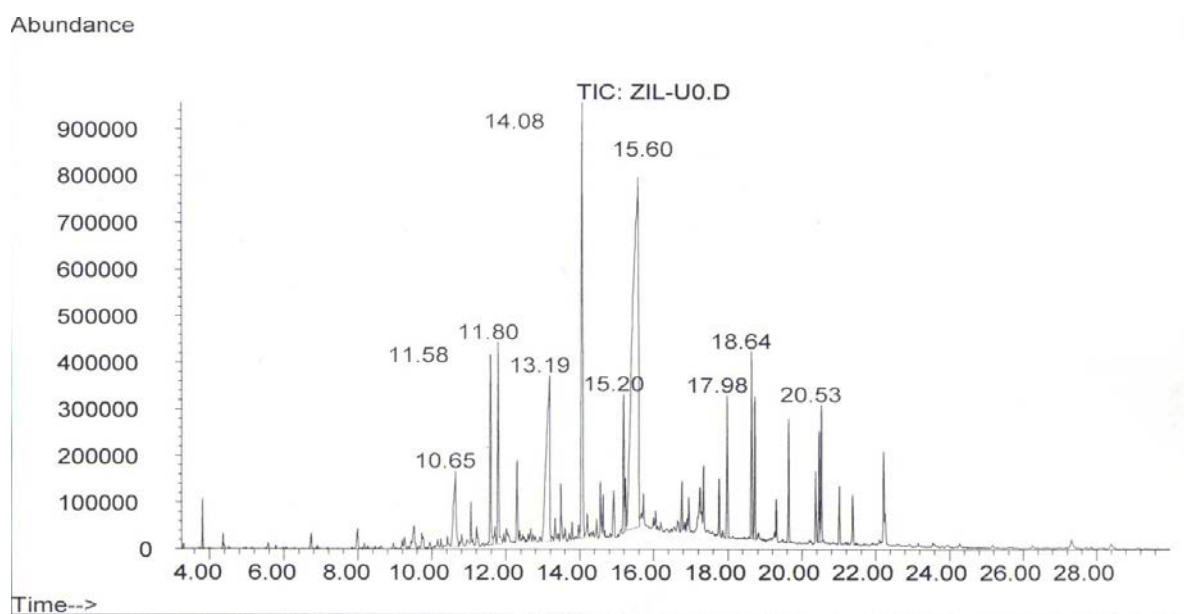
indeks refrakcije,  $n_D^{30}$  ..... 1,4732

specifični ugao skretanja,  $\alpha_D^{21,5}$  .....  $-1,19^\circ$

Gustina etarskog ulja nije određena iz razloga što je za određivanje ovog parametra prema farmakopeji potrebna veća masa etarskog ulja.

Sadržaj ulja je određen gravimetrijskim postupkom i iznosio je 0,0083% (m/m).

Kvalitativnom i kvantitativnom analizom izdvojenog etarskog ulja primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GS-MS) dobijeni su rezultati koji su prikazani na Slici 13 i dati u Tabeli 3.



Slika 13. GC- hromatogram etarskog ulja *Ginka* dobijenog destilacijom pomoću vodene pare

Tabela 3. Sastav etarskog ulja lišća ginka dobijeno destilacijom droge vodenom parom

Redni broj	R <sub>T</sub> (min)	Komponenta	Etarsko ulje (% m/m) <sup>a</sup>
1	3,81	Benzaldehid	0,50
2	4,36	benzilalkohol	0,23
3	4,91	n-undekan	-
4	5,57	menton	0,13
5	5,75	L-mentol	0,05
6	5,98	n-dodekan	0,04
7	6,74	nonanska kiselina	0,30
8	6,90	n.i.	0,09
9	7,19	n-tridekan	0,05
10	7,99	2-metil tridekan	tr
11	8,17	2,6,10-trimetil dodekan	0,11
12	8,31	n.i.	0,05
13	8,62	n.i.	0,07
14	8,96	n.i.	0,15
15	9,29	2,6,10,14-tetrametilheksadekan	0,36

16	9,52	n.i.	0,76
17	9,79	n-pentadekan	0,43
18	9,94	n.i.	0,11
19	10,24	Beta-kadein	0,35
20	10,42	dihidroaktino-diolid	0,31
21	10,65	Dodekanska kiselina	2,75
Nastavak Tabele 3.			
1	2	3	4
22	10,81	n.i.	0,28
23	11,08	n-heksadekan	0,66
24	11,21	4-(2,4,6-trimetil fenil)-butan-2-ol	0,43
25	11,53	ciklotetradekan	3,03
26	-	n.i.	3,14
27	12,00	ciklododekan	0,73
28	12,30	n-heptadekan	1,83
29	12,68	n.i.	0,73
30	13,21	Tetradekanska kiselina	8,69
31	13,49	n-oktadekan	1,83
32	14,06	6,10,14-trimetil-2-pentadekanon	10,10
33	14,21	2-pentadekanska kiselina	0,24
34	14,57	n.i.	1,65
35	14,91	Farnezil aceton C	1,06
36	15,20	n.i.	2,89
37	15,59	n.i.	31,65
38	15,72	heksadekanska=palmitinska kis.	1,72
39	16,77	n-heneikozan	0,37
40	17,00	fitol	0,84
41	17,38	9,12,15-oktadeka--trien-1-ol	0,22
42	17,77	n-dokozan	0,82
43	17,98	n.i.	1,72
44	18,12	n.i.	0,19
45	18,01	neofitadien	0,41
46	18,65	fenol sa zasićenim alkil ostatkom, n.i.	0,19
47	18,73	n-trikosan	1,97
48	19,32	4,8,12,16-tetrametil heptadekan-4-olid	0,87
49	19,48	n.i.	0,11
50	19,64	n-tetracozan	1,58
51	20,20	n.i.	0,08
52	20,53	n-pentakozan	3,55
53	21,03	n.i.	0,91
54	21,37	n-heksakozan	0,72
55	22,12	fenol sa nezasićenim alkil ostatkom, n.i.	0,28
56	22,23	n-heptakozan	2,53
57	23,12	n-dotriakontan	0,11
58	23,56	1-heksakozanal	0,22

59	24,24	nonakozan	0,31
60	25,17	n.i.	0,16
61	25,62	n.i.	0,15
62	26,25	n.i.	0,085
63	27,26	1-eikozanol	0,38
64	27,84	n.i.	0,06
65	28,04	n.i.	0,06
66	28,41	n.i.	0,231

a- Procenat na osnovu površine pika

Iz rezultata datih u Tabeli 3 i prikazanih na Slici 13 vidi se da pored identifikovanih komponenata postoje komponente koje nisu identifikovane zbog ograničene mogućnosti korišćene banke podataka. Prisutne komponente u etarskom ulju izdvojene su u grupe (Tabela 4) i to n-alkani, račvasti alkani i jedinjenja sa kiseonikom. U najvećem procentu su prisutna jedinjenja sa kiseonikom (47,81%), n-alkani (14,88%) i račvasti alkani (0,475%)  
 Od jedinjenja sa kiseonikom u najvećem procentu je prisutna komponenta sa  $R_T = 14,06$  (6,10,14-trimetil-2-pentadekanon), čiji je sadržaj 10,10%. Takođe u visokom procentu prisutan je i n-alkan, pentakozan (3,55%). Treba naglasiti da etarsko ulje sadrži u izvesnom iznosu i metil supstituisane n-alkane, čiji sadržaj je veoma mali.

Tabela 4. Sadržaj izdvojenih grupa jedinjenja u etarskom ulju dobijenom destilacijom pomoću vodene pare

Redni broj	$R_T$ (min)	Račvasti alkani	Etarsko ulje (% , m/m)
1.	7,99	2-metil tridekan	tr
2.	8,17	2,6,10-trimetil dodekan	0,11
3.	9,29	2,6,10,14-tetrametilheksadekan	0,36
Redni broj	$R_T$ (min)	n-alkani	Etarsko ulje (% , m/m)
1.	5,98	n-dodekan	0,04
2.	7,19	n-tridekan	0,05
3.	9,79	n-pentadekan	0,43
4.	11,08	n-heksadekan	0,66
5.	12,30	n-heptadekan	1,83
6.	13,49	n-oktadekan	1,83
7.	16,77	n-heneikozan	0,37
8.	17,77	n-dokozan	0,82
9.	18,73	n-trikosan	1,97
10.	19,64	n-tetrakozan	1,58
11.	20,53	n-pentakozan	3,55
12.	21,37	n-heksakozan	0,72

13.	22,23	n-heptakozan	2,53
14.	23,12	n-dotriakontan	0,11
15.	24,24	nonakozan	0,31
16.	27,26	1-eikozanol	0,38

Nastavak tabele 4.			
1	2	3	4
Redni broj	R <sub>T</sub> (min)	Jedinjenja sa kiseonikom	Etarsko ulje (% , m/m)
1.	3,81	Benzaldehid	0,50
2.	4,36	benzilalkohol	0,23
3.	5,57	menton	0,13
4.	5,75	L-mentol	0,05
5.	6,74	nonanska kiselina	0,30
6.	10,42	dihidroaktino-diolid	0,31
7.	10,65	Dodekanska kiselina=laurinska kiselina	2,75
8.	10,81	n.i.	0,28
9.	11,21	4-(2,4,6-trimetil fenil)-butan-2-ol	0,43
10.	13,21	Tetradekanska kiselina=miristinska kiselina	8,69
11.	14,06	6,10,14-trimetil-2-pentadekanon	10,10
12.	14,21	2-pentadekanska kiselina	0,24
13.	14,91	Farnezil aceton C	1,06
14.	15,72	heksadekanska=palmitinska kiselina	1,72
15.	17,00	fitol	0,84
16.	17,38	9,12,15-oktadeka--trien-1-ol	0,22
17.	18,01	neofitadien	0,41
18.	18,65	fenol sa zasićenim alkil ostatkom, n.i.	0,19
19.	19,32	4,8,12,16-tetrametil heptadekan-4-olid	0,87
20.	22,12	fenol sa nezasićenim alkil ostatkom, n.i.	0,28
21.	23,56	1-heksakozanal	0,22

### 3.2. Ekstrakcija lišća ginka pogodnim rastvaračima

U postupku navedenom u poglavlju 3.1. dobijeno je etarsko ulje u užem smislu, čiji je sastav, kako je ranije navedeno, u izvesnoj meri promenjen, tako da u potpunosti ne odgovara genuinom etarskom ulju prisutnom u drogi. Radi dobijanja etarskog ulja i drugih

komponentata prisutnih u drogi, a koje daju potpuni učinak izolovanom proizvodu, primenjuje se ekstrakcija različitim organskim rastvaračima. Koriste se petroletar, benzol, aceton, alkohol za dobijanje etarskog ulja koje se primenjuje za izolovanje pojedinih komponentata prisutnih u njemu. Organski rastvarači nisu selektivni pa rastvaraju i visoko molekulske sastojke –masna ulja, smole, voskove. Ekstrakti dobijeni upotrebom ovih rastvarača najčešće predstavljaju prvu fazu u proizvodnji farmakološki aktivnih supstanci. Iz njih se odstranjivanjem rastvarača pod sniženim pritiskom dobijaju suvi ekstrakti, koji za razliku od suvih ekstrakata dobijenih smešom alkohol - voda, sadrže lipofilne supstance.

Za proizvodnju ekstrakata u farmaciji, koji se koriste u terapiji bez dalje prerade, kao što su tečni ekstrakti, tinkture, gusti ekstrakt i suvi ekstrakt, kao ekstragens se pretežno koristi voda i smeša alkohola i vode, u različitim odnosima, jer kako je rečeno, ovakav rastvarač, kada se koristi u malim količinama, nije toksičan za ljudski organizam. Ovi ekstrakti se najčešće dobijaju postupcima ekstrakcije i perkolacije [56].

Za dobijanje tečnog ekstrakta lišća ginka kao konačnog proizvoda, i kao polaznog proizvod za proizvodnju suvog ekstrakata, korišćena je smeša alkohol-voda kao ekstragens, pri čemu je varirana koncentracija alkohola u smeši. Prinos ekstrakcije praćen je određivanjem sadržaja ekstrahovanih materija i sadržaja ukupnih flavonoida. Rezultati ispitivanja ekstrakcije dati su u Tabeli 5.

Tabela 5. Rezultati ekstrakcije lišća ginka alkoholom različitih koncentracija

Red. broj	Alkohol (%, m/m)	Ekstraktivne materije (g/100g droge)	Sadržaj (% ,m/m)	
			Ukupni flavonoidi	
			g/100g droge	g/100 g suv.ost.
1	20	31,29	0,63	2,04
2	40	27,20	0,96	3,60
3	60	24,34	1,22	5,09
4	80	22,20	1,36	6,19
5	95	13,38	0,80	6,11

Iz rezultata datih u Tabeli 5 vidi se da se sa porastom koncentracije etanola, smanjuje sadržaj ekstraktivnih materija, što je i razumljivo, jer se smanjuje polarnost rastvarača.

Pošto kvalitet dobijenih ekstrakata, a samim tim i njihovo delovanje zavisi od sadržaja flavonoida u dobijenim ekstraktima, određivani su ukupni flavonoidi sračunati na rutin. Sadržaj ukupnih flavonoida je sračunat na drogu, a dobijeni sadržaj flavonoida u suvom

ekstraktu govori o selektivnosti rastvarača. Iz rezultata datih u Tabeli 5 se vidi da prinos flavonoida raste sa porastom koncentracije alkohola do njegove koncentracije 80%, a zatim opada. Pri istoj koncentraciji alkohola ostvarena je najveća selektivnost ekstrahovanih flavonoida 6,19% (m/m),

Pošto je postavljen zadatak da se dobije ekstrakt lišća ginka primenom smeše alkohol-voda sa visokim sadržajem ukupnih ekstraktivnih materija i relativno dobra selektivnost rastvarača, odlučeno je da se za dalja ispitivanja primeni smeša etanol-voda koja sadrži koncentraciju alkohola 40%.

Ispitana je kinetika ekstrakcije lišća ginka različitog stepena usitnjenosti, definisan kao srednji prečnik čestice  $d$  (stepen usitnjenost I;  $d_1 = 0,190$  mm, II;  $d_2 = 0,467$  mm, III;  $d_3 = 1,009$  mm) primenom etanola koncentracije 40%. Rezultati ispitivanja su dati u Tabeli 6 i prikazani na Slici 14.

Tabela 6. Rezultati ispitivanja kinetike ekstrakcije sistema: lišće ginka-40 % etanol;  $q_0 = 29,25$  %

Vreme (h)	Stepen usitnjenosti											
	I				II				III			
	qi' (%)	qi (%)	qi/qo	log(qi/qo)	qi' (%)	qi (%)	qi/qo	log(qi/qo)	qi' (%)	qi (%)	qi/qo	log(qi/qo)
0,5	21,15	8,10	0,28	-0,557	19,69	9,56	0,33	-0,485	17,28	11,97	0,409	-0,388
1,0	23,39	5,86	0,20	-0,698	21,03	8,22	0,28	-0,551	19,64	9,61	0,328	-0,483
1,5	23,99	5,26	0,18	-0,745	21,62	7,63	0,26	-0,583	20,97	8,28	0,283	-0,548
2,0	24,58	4,67	0,16	-0,796	22,28	6,97	0,24	-0,623	21,51	7,74	0,264	-0,577
2,5	24,79	4,46	0,15	-0,816	22,88	6,37	0,22	-0,661	22,08	7,17	0,245	-0,610
3,0	25,25	4,00	0,14	-0,864	23,08	6,17	0,21	-0,676	22,50	6,75	0,230	-0,636
3,5	25,78	3,47	0,12	-0,925	23,79	5,46	0,19	-0,729	23,21	6,04	0,206	-0,684

$q_0$ - sadržaj u drogi ukupnih materija koje se mogu ekstrahovati, %

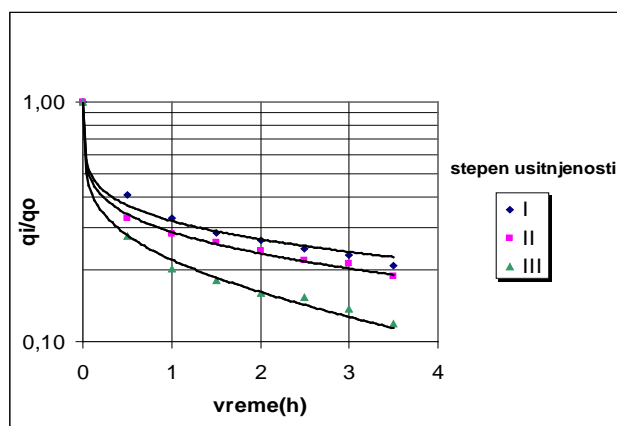
$q_i$ - sadržaj u drogi zaostalih materija koje se mogu ekstrahovati, %

$q_i'$ -sadržaj ekstrahovanih materija, %

Na osnovu ispitivanja rezultata kinetike ekstrakcije lišća *Ginka* izračunat je koeficijent brze (b) i spore ekstrakcije (k) korišćenjem jednog od rešenja jednačine nestacionarne difuzije Fika.

$$\log \frac{q_i}{q_0} = \log(1 - b) - k\tau \quad (8)$$





Slika 14. Zavisnost  $q_i/q_0$  (semilogaritamska podela) od vremena  $\tau$

Na osnovu eksperimentalnih vrednosti  $q_0$ ,  $q_i$  i  $\tau$ , kao i jednačine (8) određuje se koeficijent  $b$  računski, koristeći metod najmanjeg kvadrata, pri čemu se u obzir uzimaju samo one vrednosti  $q_i$  i  $\tau$  koji odgovaraju pravom delu krive ( $1 < \tau < 3,5$ ).

Rezultati određivanja koeficijenata  $b$  i  $k$  su dati u tabeli 7.

Tabela 7. Izračunate vrednosti koeficijenta brze ( $b$ ), spore ( $k$ ) ekstrakcije

Redni broj	Stepen usitnjenosti	Izračunati parametri		Statistički parametri	
		$k$	$b$	$\sigma$	$r$
1	I	0,0857	0,758	0,0121	0,9882
2	II	0,0687	0,671	0,0094	0,9889
3	III	0,0666	0,641	0,0063	0,9946

Iz rezultata datih u tabeli 7 vidi se da sa porastom stepena usitnjenosti biljnog materijala raste vrednost koeficijenta brze ( $b$ ) i spore ekstrakcije ( $k$ ) što znači da pri ekstrakciji dominantnu ulogu ima prenos mase konvektivnim putem. Ove vrednosti koeficijenta  $b$  jasno ukazuju na različitost kinetičkog ponašanja ova tri stepena usitnjenosti droge i na značajnu brzinu reakcije u zavisnosti od stepena usitnjenosti.

Na osnovu eksperimentalnih rezultata ispitivanja kinetike ekstrakcije, aproksimativno su izračunate vrednosti koeficijenta unutrašnje difuzije ( $D_u$ ) za predpostavljene oblike čestica droge (ploča, cilindar).

Izračunate vrednosti koeficijenta unutrašnje difuzije date su u Tabeli 8.

Tabela 8. Izračunate vrednosti koeficijenata unutrašnje difuzije ( $D_u$ )

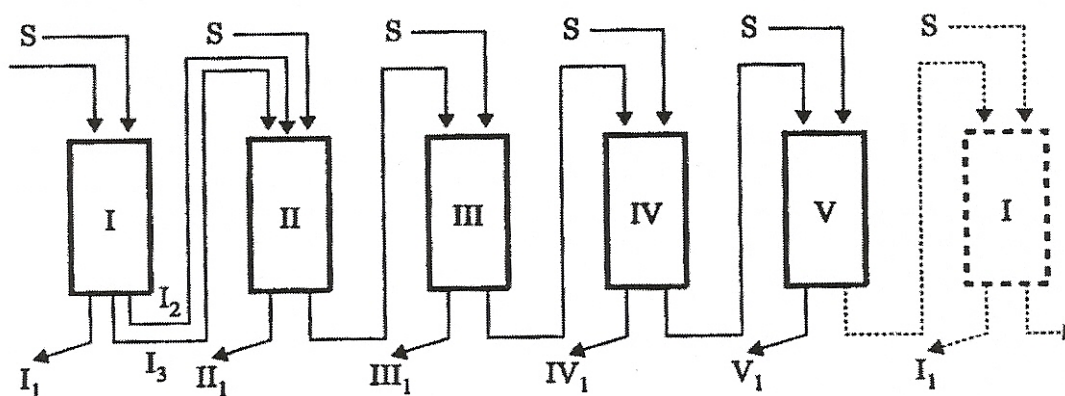
Stepen usitnjenosti	$D_u \cdot 10^9$ (cm <sup>2</sup> /s)	
	ploča	cilindar

I	0,182	0,310
II	0,834	1,498
III	4,000	6,776

Iz rezultata datih u Tabeli 8 vidi se da su vrednosti koeficijenta unutrašnje difuzije reda veličine  $10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/s i rastu sa povećanjem veličine čestica droge, i to kod oba pretpostavljena oblika usitnjenog biljnog materijala.

Sa porastom stepena usitnjenosti droge postiže se veće razaranje strukture biljnog tkiva, tako da pri ekstrakciji dominantnu ulogu ima turbulentni prenos mase. Vrednosti  $D_u$  su veće za predpostavljeni cilindrični oblik čestica (od 0,310 do 6,776).

Za dobijanje tečnog ekstrakta lišća ginka (*Extracta fluida*) primenjen je postupak višestupne protivstrujne ekstrakcije u 5 stupnjeva, korišćenjem 40% etanola kao ekstragensa. Pri sprovođenju višestupne protivstrujne ekstrakcije rastvarač i sirovina se kreću uslovno jedan prema drugom u suprotnom smeru, što se obezbeđuje pražnjenjem perkolatora (Slika 15)



Slika 15. Šema višestupne protivstrujne ekstrakcije sa izdvajanjem prvih perkolata. I-V perkolatori; I<sub>1</sub>, II<sub>1</sub>, III<sub>1</sub>, IV<sub>1</sub>, V<sub>1</sub>, I<sub>1</sub> – lagerovani perkolati (ekstrakt); I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub> itd – perkolati; S - rastvarač

Neophodna koncentracija ekstrakovanih materija u ekstraktu se postiže primenom baterije perkolatora, pri čemu se ekstrakt (perkolat) iz jednog perkolatora koristi za ekstrakciju sirovina u sledećem perkolatoru. Na ovaj način, propuštanjem ekstrakta kroz nekoliko perkolatora, sa svežem ili manje iscrpljenom sirovinom, može se dobiti ekstrakt koji sadrži potrebnu količinu ekstrakovanih supstanci.

Naime, perkolati ekstrakcione baterije (I-IV) se napune drogom, i u prvi perkolator polako dodaje rastvarač dok njime droga ne bude u potpunosti prekrivena (pri tome slavina na dnu perkolatora mora biti otvorena, da bi vazduh nesmetano mogao da izlazi). Nakon maceracije koja traje određeno vreme, ispušta se I<sub>1</sub> perkolat koji se lageruje. Prilikom ispuštanja I<sub>1</sub>, protok ispuštanja perkolata je isti kao i protok dovođenja rastvarača u perkolator, tako da je droga uvek potopljena. Sa novom količinom rastvarača droga se macerira i ispušta I<sub>2</sub> perkolat koji se prebaci u II perkolator sa svežom drogom. Nakon maceracije, iz drugog perkolatora ispušta se II<sub>1</sub> perkolat koji se lageruje, uz dodavanje I<sub>3</sub> perkolata koji je prethodno ispušten iz I perkolatora. Sa izdvajanjem prvih perkolata, iz III, IV i V perkolatora, postupak se nastavi na opisani način. Kada je izdvojen V<sub>1</sub> perkolat smatra se da je droga u prvom perkolatoru iscrpljena. Prvi perkolator se prazni, napuni novom količinom droge i preuzima ulogu V perkolator, a II perkolator ima ulogu I perkolatora. Prema tome, u drugi perkolator se uvodi svež rastvarač, a iz V perkolatora (koji je bio I) izdvaja se I<sub>1</sub> perkolat koji se lageruje. Rezultati višestupne protivstrujne ekstrakcije lišća ginka dati su u Tabeli 9.

Tabela 9. Rezultati određivanja sadržaja ekstraktivnih materija u perkolatima dobijenim višestupnom protivstrujnom ekstrakcijom

<b>Perkolat</b>	<b>Ekstraktivne materije (%, g/ 100 perkolata)</b>
I <sub>1</sub>	14,15
II <sub>1</sub>	18,82
III <sub>1</sub>	16,94
IV <sub>1</sub>	19,82
V <sub>1</sub>	23,39
I <sub>1</sub> + II <sub>1</sub> + III <sub>1</sub> + IV <sub>1</sub> + V <sub>1</sub>	17,06

Iz rezultata datih u Tabeli 9 vidi se da se sadržaj ekstraktivnih materija u perkolatima povećava (od 14,15 do 23,39 %; m/m). Konačni ekstrakt ima visok sadržaj ekstraktivnih materija (17,06%, m/m).

Ukupni ekstrakt koji predstavlja tečni ekstrakt približno 1: 1 (I<sub>1</sub>+II<sub>1</sub>+III<sub>1</sub>+IV<sub>1</sub>+V<sub>1</sub>) je analiziran i dobijeni su sledeći rezultati:

- Sadržaj ekstraktivnih materija..... 17,06 (g/100 g ekstrakta)
- Sadržaj ukupnih flavonoida sračunatih na rutin..... 0,46 (g/100 g ekstrakta)

- Sadržaj etarskog ulja..... 0,055 (g/100g ekstrakta)
- Sadržaj alkohola..... 33% (m/m)
- Indeks refrakcije  $n_D^{20}$  ..... 1,3804

Primenom sušnice sa raspršivanjem (spray dryer) potpuno je odstranjen rastvarač iz dobijenog tečnog ekstrakta pri sledećim uslovima sušenja:

Ulazna temperatura: 125°C

Izlazna temperatura: 70-80°

Protok: 2 l/h

Analizom suvog ekstrakta dobijeni su sledeći rezultati:

- Sadržaj vlage.....8%
- Sadržaj ukupnih flavonoida sračunatih na katehin .....0,91%
- Sadržaj ukupnih fenola sračunatih na hlorogensku kiselinu .....6,69 %

Na osnovu rezultata analize može da se kaže da konačni proizvod (suvi ekstrakt) sadrži relativno zadovoljavajući prinos flavonoida sračunatih na rutin, ali povećan sadržaj vlage (prema Ph.Jug. IV maksimalni sadržaj vlage ne sme biti veći od 5%).

Za ispitivanje sadržaja flavonolnih glikozida i terpenskih laktona u standardnim ekstraktima ginka Sticher i saradnici [57] su primenili tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom (High Pressure Liquid Chromatography - HPLC). Kao kolona korišćena je Phenomenex Luna 3 $\mu$  C18 (150x4,6 mm), i predkolona Phenomenex Security Guard C8 (4x3 mm), a kao pokretna faza smeša rastvarača: 28% acetonitril, 72% fosforna kiselina i 0,01% trietilamin, sa protokom od 1 ml/min.UV-detektor ( $\lambda= 370$  nm).

Analiza terpenskih laktona je vršena masenim spektrometrijskim detektorom.

Lin-Chin i saradnici [58] su ispitivali flavonolne glikozide ginka primenom HPLC korišćenjem kolone Cosmosil 5C18 AR, i mobilne faze metanol-0,3% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1:1). UV-detektor ( $\lambda= 370$  nm).

Dobro izdvajanje i identifikaciju pojedinih flavonola iz preparata na bazi ginka ostvarili su Mary-Jean Dubber i Isadore Kanfer[59] primenom HPLC korišćenjem kolone Phenomenex Luna 5 $\mu$ m C18 250x2,00 mm, i kao pokretnu fazu: acetonitril- mravlja kiselina(0,3%) pri odnosu, najpre (15 min) 15:85, a zatim 25:75. Ukupno vreme analize je 33 min. Protok je 0,4 ml/min. Komponente su detektovane na 350 nm.

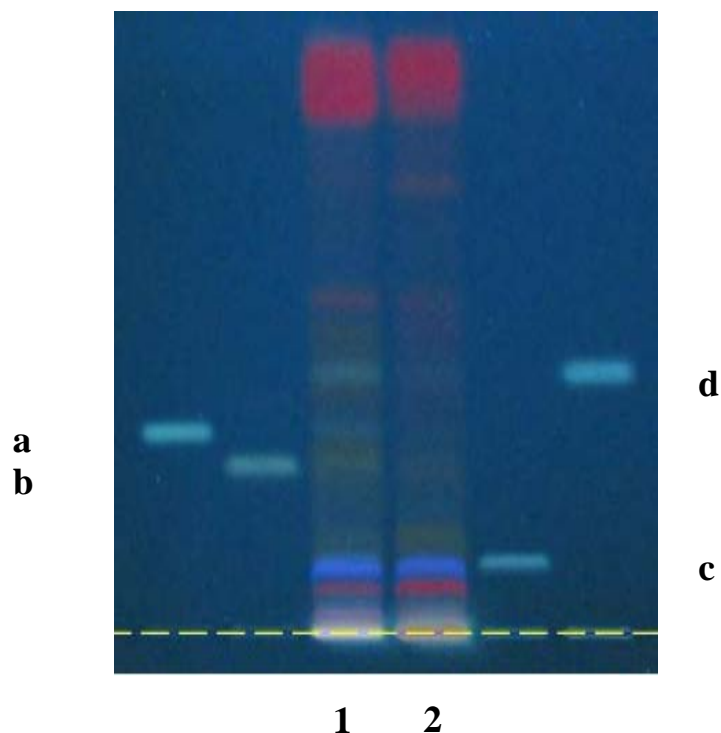
Biflavoni prisutni u ginku se takođe mogu analizirati primenom HPLC metode. Tako na primer P.G.Pietta i saradnici [60] su primenili  $\mu$ Bondapak C18 kolonu, i kao pokretnu fazu

tetrahidrofuran-2-propanol-voda (21:10:69). Takođe su dobre rezultate ostvarili i primenom pokretne faze: acetonitril-voda-sirćetna kiselina (45:55:2). UV-detektor ( $\lambda = 270$  nm).

Za izdvajanje ginkolida i bilobalida u fitopreparatu koji sadrži ekstrakt ginka, se može primeniti kombinacija poliamida (MN-poliamid SC6) i C18 kolone (C18 modifikovani silikagel), a za analizu izdvojenih komponenata primenjuje se HPLC- metod, primenom C18 kolone i smeše rastvarača: metanol-vode (33:67 ,v/v) kao pokretne faze. Koristi se RI-detektor i benzilalkohol kao unutrašnji standard [35].

Wenkui Li i John Fitzloff su razvili HPLC metod za detekciju i kvantifikaciju terpenskih laktona Ginka korišćenjem ELSD ( evaporative light scattering detection) i na ovaj način uspešno kvantifikovali ginkolide A,B,C,J, bilobalid, kvercetin, kemferol, izoramnetin [61]. Ginkolidi ekstrahvani iz lišća ginka i korena etanolom, metanolom, smešom acetona i vode, mogu da se kristalizacijom pojedinačno izoluju iz alkoholno-vodenog ekstrakta i eluiranjem na koloni silika gela sa hloroformom koji u sebi sadrži tragove acetona ili metanola. Takođe mogu da se razdvoje na tankom sloju silika gela, a da se za razvijanje hromatograma koristi smeša toluol : aceton 7:3. Karakterizacija ginkolda može da bude ostvarena gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom trimetilsilil derivata,  $^{13}\text{C}$ -NMR i  $^1\text{H}$ -NMR, kao i kristalografskom analizom sa X-zracima [62].

Pošto nije postojala mogućnost da se analiza ekstrakata izvrši hromatografijom pod visokim pritiskom, jer nismo raspolagali adekvatnim uređajem (HPLC), kvalitativna analiza tečnog i suvog ekstrakta lišća ginka, dobijenog protivstrujnom višestupnom ekstrakcijom, je izvršena primenom tečne hromatografije na tankom sloju silika gela tj. na gotovim HPTLC pločama sa koncentracionom zonom.



Slika 16. HPTLC-hromatogrami ekstrakata lišća ginka

**1** - tečni ekstrakt; **2** - rastvor suvog ekstrakta u metanolu, (10 mg/ml), 10 $\mu$ l  
**a** - ginkolid A; **b** - ginkolid B; **c** - ginkolid C; **d** - bilobalid

*Nepokretna faza:* gotove HPTLC ploče (silika gel 60 F254)

*Pokretna faza:* toluo l- etilacetat – aceton - metanol  
 48,5 : 24,5: 24 : 2,5 (v/v/v/v)

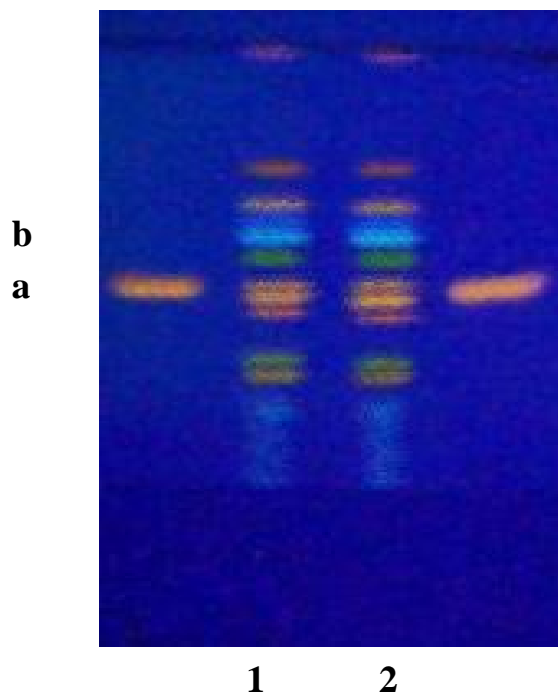
*Izazivanje:* anhidrid sirćetne kiseline,  
 zagrevanje hromatograma na 180°C, 10 min

*Detekcija:* UV ( $\lambda = 365$  nm)

Iz rezultata prikazanih na Slici 16. se vidi da je izvršeno dobro razdvajanje ginkolida i bilobalida. Ispitivani ekstrakti su približno istog sastava (sadrže ginkolide i bilobalide), pri čemu je ginkolid C (bar prema intenzitetu mrlje) zastupljen u mnogo većem iznosu u odnosu na druge ginkolide.

Za analizu flavonoida u ekstraktima takođe je primenjena je hromatografija na tankom sloju silika gela 60 F<sub>254</sub> (gotove HPTLC ploče).

Rezultati ispitivanja su prikazani na hromatogarmu (Slika 17)



Slika 17. HPTLC-hromatogrami flavonoida ekstrakata lišća ginka

1 - tečni ekstrakt; 2 – rastvor suvog ekstrakta u metanolu, 10 mg/ml, 10 $\mu$ l;  
a - rutin ( $R_f = 0,53$ ); b - hlorogenska kiselina ( $R_f = 0,64$ )

*Nepokretna faza:* gotove HPTLC ploče (silika gel 60 F<sub>254</sub>)

*Pokretna faza:* etilacetat - sirćetna kiselina - mravlja kiselina - voda  
72 : 6,5 : 6,5 : 1 : 15 (v/v/v/v)

*Detekcija:* NP/PEG reagensom Natural Products / polietilenglikol  
UV ( $\lambda = 365$  nm)

Iz rezultata prikazanih na Slici 17 se vidi da lišće ginka sadrži različite flavonoide, među kojima i rutin, koji je primenjen kao standardna supstanca. Takođe se iz rezultata zaključuje da ekstrakti sadrže i hlorogensku kiselinu (fenol-karboksilna kiselina) koja se vidi na hromatogramu kao svetlo-plava zona [63].

### 3.3. Ekstrakcija lišća ginka ugljenik (IV)-oksidom pod pritiskom

Kao što je rečeno u opštem delu, ekstrakcija ugljendioksidom pod pritiskom pruža široke mogućnosti za dobijanje ekstrakata lekovitog i aromatičnog bilja, koji imaju primenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

O ekstrakciji lišća ginka gasovima pod pritiskom tj. ugljendioksidom u tečnom i natkritičnom stanju u literaturi ima veoma malo podataka. U nekoliko radova je opisana

ekstrakcija lišća ginka. C. Yang, Y. Xu and W. Yao [64] su ekstrahovali lišće G. bilobe natkritičnim ugljendioksidom, koje je bilo tretirano prethodno 70% etanolom. Eksperimentalni uslovi su prvo optimizovani tako da je odabran ortogonalni model sa tri promenljive (pritisak, temperatura i modifikator –etanol) na dva nivoa svaka. Na osnovu tih rezultata su menjani pritisak i temperaturu (8, 15, 25 i 30 MPa, odnosno 40, 60, 80 i 100°C) uz 5% etanola kao modifikatora. Ekstrakcija natkritičnim ugljendioksidom na 45°C i 335 atm uz 10% metanola korišćena je za pripremu standardizovanog ekstrakta G. biloba i selektivnu ekstrakciju terpenskih trilaktona iz standardizovanog ekstrakta [31,32] U preglednom radu T. Beeka [30] takođe se spominje natkritična ekstrakcija ugljendioksidom na 20 MPa i 40°C, kao optimalnim uslovima, ali opet sa 6 ml/min etanola kao modifikatora (navodi se rad T.Sun i Z.S. Xuebao). Natkritičnom ekstrakcijom lišća G. bilobe čistim ugljendioksidom (pritisak 20,4 i 34,0 MPa, temperatura 40, 60 i 80°C) ili ugljendioksidom sa dodatkom metanola, etanola, vode, radi ekstrakcije bilobalida i ginkolida, bavili su se Choi, J. Kim, K.P.Yoo [65]. Za ekstrakciju flavonoida iz ginka nađeno je da su najpovoljniji uslovi ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom (20 MPa, 40°C, 10 g/min CO<sub>2</sub> i 6 mL/min etanola [66]. I drugi autori su utvrdili da ekstrakcija ginkolida i flavonoida samim ugljendioksidom ( u opsegu 24,2-31,2 MPa i 60-120°C) ne daje dobre rezultate, ali dodatak etanola povećava količine ekstrahovanih terpenskih laktone [67]. I Yang sa saradnicima, je kombinovao primarnu ekstrakciju sa 70% etanolom, pa onda sa natkritičnim ugljendioksidom što omogućava efikasno i ekonomično dobijanje ginkolida. Na 30 MPa, 60°C sa 5% etanola kao modifikatora prinos je bio 2,1% (u odnosu na drogu) [68].

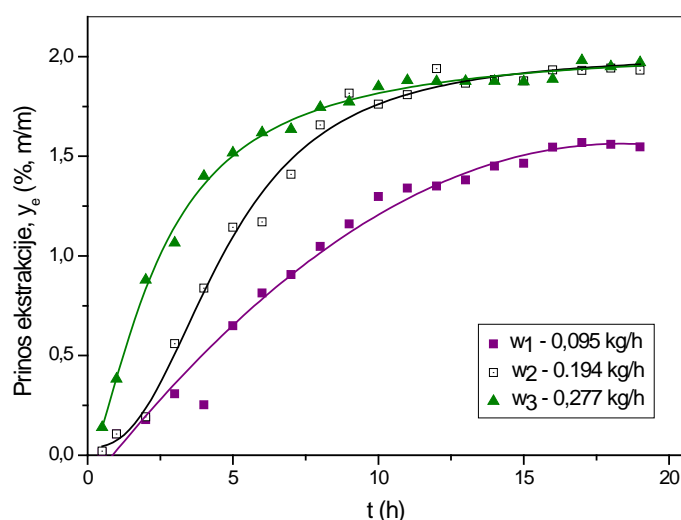
U našim ispitivanjima korišćeno je lišće ginka ubrano sa ženske jedinke i konzervirano sušenjem na 45°C, a droga za ekstrakciju je pripremljena mlevenjem.

Ispitivana su dva postupka ekstrakcije, i to izotermni i izobarni. Prinos ekstrakcije je ispitivan u funkciji protoka rastvarača, stepena usitnjenosti droge, pritiska i temperature.

### **3.3.1. Uticaj protoka rastvarača na prinos ekstrakcije ginka natkritičnim ugljenik (IV) - oksidom**

Da bi se odredio uticaj protoka rastvarača na prinos ekstrakta, lišće ginka je ekstrahovano na 100 bar i 40°C, određeno vreme, sa različitim protocima ekstragensa ( $w_1=0,095$ ,  $w_2=0,194$  i  $w_3=0,277$  kg CO<sub>2</sub>/h, korišćenjem droge stepena usitnjenosti  $d_1=0,190$  mm). Rezultati ovih ispitivanja su prikazani na Slici 18.





Slika 18. Kinetika ekstrakcije ginka u zavisnosti od protoka rastvarača

U početku ekstrakcije kada je koncentracija ekstraktivnih materija u drogi najveća prinos ekstrakcije, koji je različit za različite protoke rastvarača, skoro linearno raste sa vremenom da bi nakon toga prinos ekstrakcije bio skoro ustaljen. Drugim rečima, može da se zaključi da u toku ekstrakcije postoje dva perioda ekstrakcije: period brze i period spore ekstrakcije. Primenom protoka  $w_2 = 0,194$  i  $w_3 = 0,277$  kg CO<sub>2</sub>/h prinos ekstrakcije u kasnijoj fazi je isti, dok primena protoka  $w_1 = 0,095$  kg CO<sub>2</sub>/h utiče tako da je prinos ekstrakcije znatno niži u kasnijoj fazi ekstrakcije. Iz ovih razloga u daljim ispitivanjima je izabran protok rastvarača  $w_2 = 0,194$  kg CO<sub>2</sub>/h.

Nakon isteka 15 sati, izmerena je ukupna masa dobijenog ekstrakta, pri svim ispitivanim protocima ekstragensa, i sračunat prinos ekstrakcije u odnosu drogu. Dobijeni rezultati su dati u Tabeli 10.

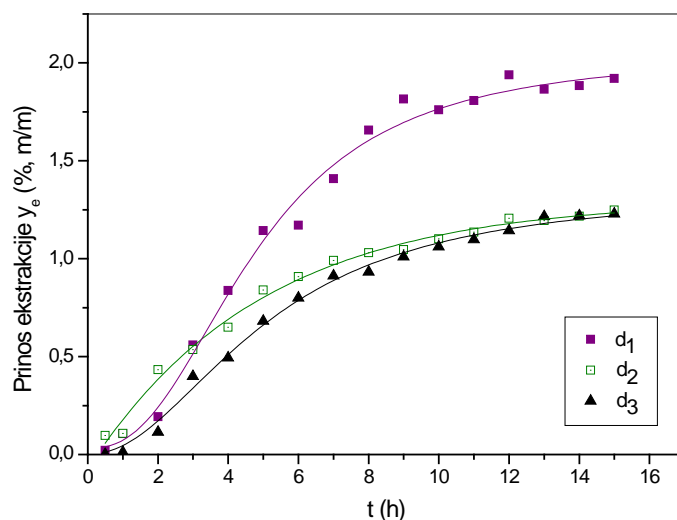
Tabela 10. Rezultati prinosa ekstrakcije lišća G. bilobe dobijeni pri različitim protocima natkritičnog CO<sub>2</sub> (p - 100 bar, T - 40°C, d - 0,190 mm)

Protok ekstragensa (kg/h)	Sadržaj (% m/m)	
	CO <sub>2</sub> -ekstrakt (g/100 g droge)	Etarsko ulje (g/100 g CO <sub>2</sub> kstrakta)
0,095	1,87	8,43
0,194	2,24	9,88

U dobijenom CO<sub>2</sub> ekstraktu određen je sadržaj etarskog ulja destilacijom ekstrakta pomoću vodene pare. Rezultati ovih ispitivanja dati su u Tabeli 10. iz kojih se vidi da se pri protocima od  $w_2 = 0,194$  i  $w_3 = 0,277$  kg CO<sub>2</sub>/h dobija približno isti prinos ekstrakcije (2,13 odnosno 2,24 g/100 g). Primenom protoka  $w_1 = 0,095$  kg CO<sub>2</sub>/h ostvaruje se nešto niži prinos (1,87g/100g). Ekstrakt dobijen pri protoku  $w_3$  sadrži ekstrakt sa najvećim procentom etarskog ulja (26,16%), dok pri ostala dva protoka sadržaj etarskog ulja je približno isti.

### 3.3.2. Uticaj stepena usitnjenosti na prinos ekstrakcije

Ispitivan je uticaj stepena usitnjenosti droge na količinu ekstraktivne materije tokom ekstrakcije za različite srednje prečnike čestica ( $d_1=0,190$  mm,  $d_2=0,467$  mm i  $d_3=1,009$  mm) na 100 bar, 40 °C i pri protoku ugljendioksida od 0,194 kg/h. Uticaj različitog stepena usitnjenosti biljnog materijala na prinos ekstraktivnih materija  $y_e$ , (g/100g droge) prikazan je na Slici 19.



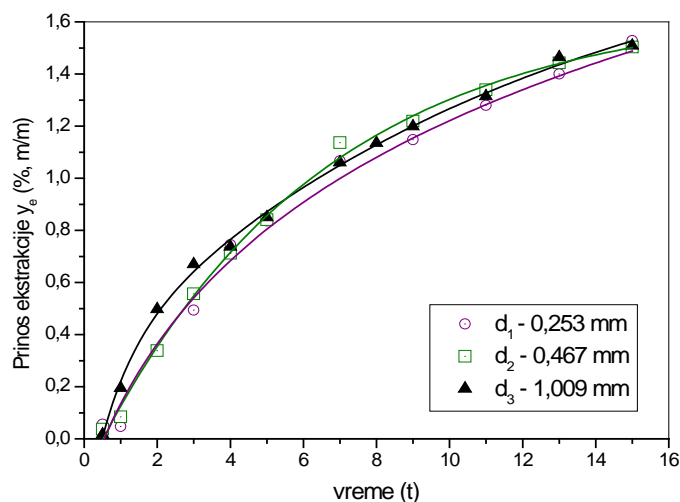
Slika 19. Dijagram kinetike ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija u zavisnosti od stepena usitnjenosti droge (pritisak – 100 bar, temperatura – 40°C, brzina protoka  $w = 0,194$  kg CO<sub>2</sub>/h)

Ekstrakcija je proučavana ispitivanjem kinetike ekstrakcije lišća ginka određivanjem prinosa ekstrakcije tokom vremena. Rezultati su dati u Tabeli 11. Iz rezultata se vidi da stepen usitnjenosti droge igra značajnu ulogu u procesu ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija. Najveći prinos se ostvaruje primenom droge najvećeg stepena usitnjenosti, što je i razumljivo jer takva droga sadrži najveći broj razrušenih ćelija iz kojih se prenos mase vrši konvektivnim putem. Može se reći da se droga stepena usitnjenosti  $d_2=0,467$  mm i  $d_3=1,009$  mm u toku ekstrakcije približno isto ponaša što potvrđuje približno isti tok krivih ekstrakcije.

Tabela 11. Uticaj stepena usitnjenosti droge na prinos ekstrakcije natkritičnim ugljendioksidom  
( $p = 100 \text{ bar}$ ,  $T = 40^\circ \text{C}$ ,  $w = 0,194 \text{ kg/h}$ )

Srednji prečnik čestica (mm)	Sadržaj (% m/m)	
	CO <sub>2</sub> -ekstrakt (g/100 g droge)	Etarsko ulje (g/100 g CO <sub>2</sub> estrukta)
0,190	2,24	9,88
0,467	1,48	14,60
1,009	1,71	10,29

Na sličan način je vršeno ispitivanje uticaja stepena usitnjenosti droge na prinos ekstrakcije lišća ginka korišćenjem tečnog ugljendioksida na 65 bar, 25 °C i pri protoku ugljendioksida od 0,194 kg/h. Rezultati ovih ispitivanja dati su Tabeli 12 i prikazani na Slici 20.



Slika 20. Dijagram kinetike ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija u zavisnosti od stepena usitnjenosti droge ( $p = 65 \text{ bar}$ ,  $T = 25^\circ \text{C}$ ,  $w = 0,194 \text{ kg CO}_2/\text{h}$ )

Prinos ekstrakcije bitno ne zavisi od stepena usitnjenosti ispitivanog biljnog materijala, kao i u slučaju ekstrakcije natkritičnim ugljendioksidom droge stepena usitnjenosti  $d_2$  i  $d_3$ . I u ovom slučaju se uočavaju dva perioda ekstrakcije, brza i spora ekstrakcija.

Tabela 12. Uticaj stepena usitnjenosti droge na prinos ekstrakcije tečnim ugljendioksidom  
( $p = 65 \text{ bar}$ ,  $T = 25^\circ \text{C}$ ,  $w = 0,194 \text{ kg/h}$ )

Srednji prečnik čestice (mm)	Sadržaj (% m/m)	
	CO <sub>2</sub> -ekstrakt (g/100 g droge)	Etarsko ulje (g/100 g CO <sub>2</sub> ekstrakta)
0,253	1,77	2,67
0,467	1,47	5,85
1,009	1,69	9,02

Na osnovu podataka iz Tabela 13 i 14 i rezultata prikazanih na Slikama 21 i 22 izvršeno je određivanje parametra kinetičkog ponašanja ekstrakcije, koeficijenta brze (b) i spore (k) ekstrakcije. U ovom slučaju određivanja kinetičkih parametara je vršeno prikazivanjem eksperimentalnih rezultata  $1-q_i/q_0$  u funkciji vremena tj. na osnovu eksperimentalnih rezultata iscrpljenja sirovine za pravolinijski deo kinetičke krive  $8 < \tau < 15$

Tabela 13. Rezultati ispitivanja kinetike ekstrakcije sistema: lišće ginka-natkritični ugljendioksid ( $q_0 = 1,923$  %)

Vreme (h)	Stepen usitnjenosti											
	I				II				III			
	qi' (%)	qi (%)	qi/qo	1-qi/qo	qi' (%)	qi (%)	qi/qo	1-qi/qo	qi' (%)	qi (%)	qi/qo	1-qi/qo
0,5	0,02	1,91	0,99	0,01	0,10	1,84	0,95	0,05	0,001	1,93	1,00	0,00072
1,0	0,11	1,83	0,95	0,05	0,11	1,83	0,94	0,06	0,01	1,92	0,99	0,01

2,0	0,19	1,74	0,90	0,10	0,43	1,50	0,78	0,22	0,11	1,82	0,94	0,06
3,0	0,56	1,37	0,71	0,29	0,54	1,40	0,72	0,28	0,40	1,53	0,79	0,21
4,0	0,84	1,09	0,57	0,43	0,65	1,28	0,66	0,34	0,49	1,44	0,74	0,26
5,0	1,14	0,79	0,41	0,59	0,84	1,09	0,57	0,43	0,68	1,25	0,65	0,35
6,0	1,17	0,76	0,39	0,61	0,91	1,02	0,53	0,47	0,80	1,13	0,59	0,41
7,0	1,41	0,52	0,27	0,73	0,99	0,94	0,49	0,51	0,91	1,02	0,53	0,47
8,0	1,66	0,28	0,14	0,86	1,03	0,90	0,47	0,53	0,93	1,00	0,52	0,48
9,0	1,76	0,17	0,09	0,91	1,05	0,89	0,46	0,54	1,01	0,92	0,48	0,52
10,0	1,76	0,17	0,09	0,91	1,10	0,83	0,43	0,57	1,06	0,87	0,45	0,55
11,0	1,81	0,12	0,06	0,94	1,14	0,80	0,41	0,59	1,10	0,83	0,43	0,57
12,0	1,83	0,10	0,05	0,95	1,21	0,73	0,38	0,62	1,14	0,79	0,41	0,59
13,0	1,87	0,07	0,03	0,97	1,20	0,74	0,38	0,62	1,22	0,72	0,37	0,63
14,0	1,88	0,05	0,02	0,98	1,22	0,72	0,37	0,63	1,22	0,71	0,37	0,63
15,0	1,88	0,05	0,03	0,97	1,25	0,68	0,35	0,65	1,23	0,70	0,36	0,64

$q_0$ - sadržaj ukupnih materija u drogi, %  
 $q_i$ - sadržaj zaostalih materija u drogi, %  
 $q_i'$ -sadržaj ekstrahovanih materija, %

Stepen usitnjenosti:

I:  $d_1 = 0,190$  mm,  
 II:  $d_2 = 0,467$  mm,  
 III:  $d_3 = 1,009$  mm,

Tabela 14. Rezultati ispitivanja kinetike ekstrakcije sistema: lišće ginka-tečni ugljendioksid, ( $q_0 = 2,52\%$ )

Vreme (h)	Stepen usitnjenosti											
	I				II				III			
	$q_i'(\%)$	$q_i(\%)$	$q_i/q_0$	$1-q_i/q_0$	$q_i'(\%)$	$q_i(\%)$	$q_i/q_0$	$1-q_i/q_0$	$q_i'(\%)$	$q_i(\%)$	$q_i/q_0$	$1-q_i/q_0$

0,5	0,06	2,46	0,98	0,02	0,04	2,48	0,99	0,01	0,02	2,50	0,99	0,01
1,0	0,05	2,47	0,98	0,02	0,08	2,44	0,97	0,03	0,20	2,32	0,92	0,08
2,0	0,34	2,18	0,87	0,13	0,34	2,18	0,87	0,13	0,50	2,02	0,80	0,20
3,0	0,49	2,03	0,80	0,20	0,56	1,96	0,78	0,22	0,67	1,85	0,73	0,27
4,0	0,74	1,78	0,70	0,30	0,71	1,81	0,72	0,28	0,74	1,78	0,71	0,29
5,0	0,84	1,68	0,67	0,33	0,84	1,68	0,67	0,33	0,85	1,67	0,66	0,34
7,0	1,15	1,37	0,54	0,46	1,14	1,38	0,55	0,45	1,06	1,46	0,58	0,42
9,0	1,35	1,17	0,47	0,53	1,22	1,30	0,52	0,48	1,20	1,32	0,52	0,48
11,0	0,06	0,92	0,37	0,63	1,34	1,18	0,47	0,53	1,31	1,21	0,48	0,52
13,0	0,34	2,46	0,98	0,02	1,44	1,08	0,43	0,57	1,46	1,06	0,42	0,58
15,0	0,74	2,18	0,87	0,13	1,50	1,02	0,40	0,60	1,51	1,01	0,40	0,60

Stepen usitnjenosti:

I:  $d_1 = 0,253$  mm

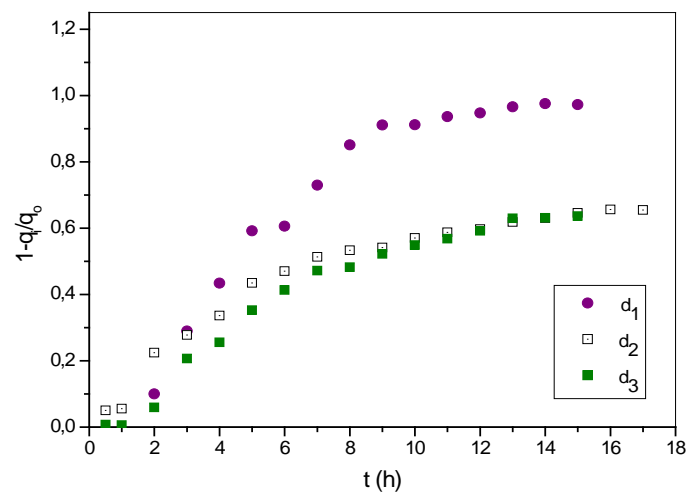
II:  $d_2 = 0,467$  mm

III:  $d_3 = 1,009$  mm

Jednačina pravolinijskog dela krive ima oblik

$$1 - \frac{q_i}{q_0} = k t + b \quad (9)$$

Rezultati određivanja kinetičkih parametara su sumarno dati u Tabeli 15.



Slika 21. Grafički prikaz zavisnosti  $1 - q_i/q_0$  od  $\tau$  (ekstrakcija natkritičnim ugljendioksidom)

Vrednosti za b su izračunate na osnovu

za stepen usitnjenost I (  $\leq \tau \leq$  )

za stepen usitnjenost II (  $\leq \tau \leq$  )

za stepen usitnjenost III (  $\leq \tau \leq$  )

Tabela 15. Rezultati određeni pomoću jednačine  $1 - \frac{q_i}{q_o} = k t + b$

Srednji prečnik čestica (mm)	Ekstrakcija natkritičnim CO <sub>2</sub>		
	b	k	r
0,190	0,76	0,026	0,9753
0,467	0,47	0,011	0,9679
1,009	0,35	0,020	0,9884
Ekstrakcija tečnim CO <sub>2</sub>			
	b	k	r
0,253	0,48	0,012	0,9723
0,467	0,46	0,007	0,9624
1,009	0,47	0,026	0,9531

Iz rezultata datih u Tabeli 15 vidi se da sa povećanjem stepena usitnjenosti droge povećava koeficijent brze ekstrakcije ( za natkritični ugljendioksid od 0,35 do 0,76 )

Takođe se vidi da su vrednost koeficijenta ekstrakcije (b) približno jednake za tečni CO<sub>2</sub> s tim što je koeficijent brze ekstrakcije za drogu najvećeg stepena usitnjenosti najveći (0,48).

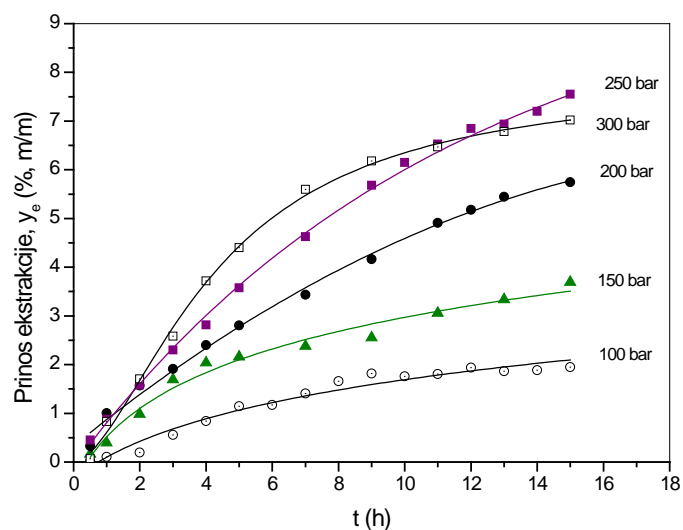
U daljim ispitivanjima korišćena je droga najvećeg stepena usitnjenosti (d=0,190 mm) za ekstrakciju natkritičnim ugljendioksidom i (d=0,253 mm) za ekstrakciju tečnim ugljendioksidom.

### 3.3.3. Izotermni postupak ekstrakcije

#### 3.3.3.1. Ekstrakcija natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom

Kao što je rečeno u natkritičnoj oblasti ekstrakcija se može vršiti promenom pritiska pri konstantnoj temperaturi, pri čemu se u značajnoj meri utiče na osobine rastvarača odnosno na njegovu moć rastvaranja.

Najpre, ekstrakcija droge je vršena na konstantnoj temperaturi i različitim pritiscima (100, 150, 200, 250 i 300 bar). Prinos ekstrakcije u zavisnosti od pritiska je određivan ispitivanjem kinetike ekstrakcije. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su na Slici 23.



Slika 23. Rezultati ispitivanja prinosa ekstrakcije izotermnim postupkom (temperatura  $-40^{\circ}\text{C}$ ,  $d_1$ - 0,190 mm,  $w_2$ -0,194 kg /h)

Iz rezultat prikazanih na Slici 23 vidi se da prinos ekstrakcije uglavnom raste sa povećanjem pritiska natkritičnog ugljendioksida. Interesantni su podaci dobijeni za prinos ekstrakcije pri pritisku 250 i 300 bar u završnoj fazi ekstrakcije. Tako na primer, na pritisku od 300 bar nakon 12 sati ekstrakcije ostvaruje se nešto niži prinos ekstrakcije u odnosu na prinos ostvaren primenom pritiska od 250 bar. Ekstrakcija droge na istim pritiscima nastavljena je i dalje (20 sati), izračunat prinos ekstrakcije, i u dobijenim  $\text{CO}_2$  ekstraktima je određivan sadržaj etarskog ulja. Rezultati ovih ispitivanja su dati u Tabeli 16.

Tabela 16. Rezultati određivanja prinosa ekstrakcije i sadržaja etarskog ulja u dobijenim ekstraktima pri izotermnom postupku ( $t$  -  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $w$ -0,194 kg/h,  $d$ - 0,190 mm)

P (bar)	Sadržaj (% m/m)	
	$\text{CO}_2$ -ekstrakt (g/100 g droge)	Etarsko ulje (g/100 g $\text{CO}_2$ ekstrakta)
100	1,87	9,88
150	4,49	1,85
200	7,11	0,47
250	8,20	0,24
300	7,41	0,57



Iz rezultata u Tabeli 16 se vidi da prinos ekstrakcije raste sa porastom pritiska od 1,87 do 8,20 g/100 g droge, da bi na pritisku od 300 bar, prinos bio nešto niži (7,41 g/100 g droge). Iz rezultata u tabeli se vidi da izdvojeni ekstrakti sadrže etarska ulja čiji sadržaj u CO<sub>2</sub> ekstraktu opada od 9,88 - 0,24 g/100 g droge na 100 odnosno 250 bar. Pri pritisku od 300 bar dobijen je ekstrakt koji sadrži etarsko ulje u iznosu 0,57g/100 g , što je i razumljivo jer je ostvaren niži prinos ekstrakta.

Tendencija smanjenja sadržaja ekstrahovanog etarskog ulja u CO<sub>2</sub> ekstraktu, od nižih ka višim pritiscima, može da se objasni povećanjem prinosa ekstrakcije (od 1,87 do 8,20 g/100 g droge) odnosno povećanjem mase ekstrahovanih masnih ulja, smola i voskova prisutnih u ekstraktima. Ekstrakcijom tečnim ugljendioksidom dobijaju se manji prinosi ekstrakcije i ne ekstrahuje se celokupno ulje prisutno u biljnom materijalu.

Nadalje, ekstrakcija je vršena izotermnim postupkom na 40°, 50° i 60°C pri različitim pritiscima (100, 140 i 180 bar) za vreme od 4 sata. Nakon isteka vremena ekstrakcije, određen je prinos ekstrakcije u svim slučajevima, a u dobijenim ekstraktima određen je sadržaj etarskog ulja destilacijom pomoću vodene pare. Rezultati ispitivanja su dati u Tabeli 17.

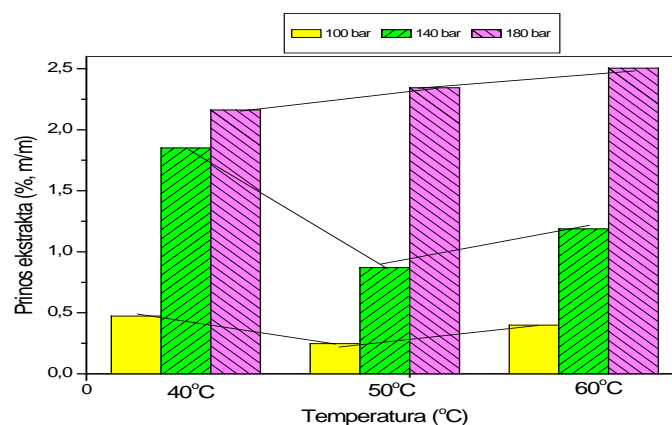
Tabela 17. Rezultati određivanja prinosa ekstrakcije natkritičnim ugljendioksidom i sadržaj etarskog ulja u dobijenim ekstraktima- **izotermni postupak** (w-0,194 kg/h, d<sub>1</sub>- 0,190mm)

Temperatura (°C)	Pritisak (bar)	Sadržaj (% , m/m)	
		CO <sub>2</sub> -ekstrakt (g/100 g droge)	Etarsko ulje (g/100 g CO <sub>2</sub> ekstrakta)
40	100	0,47	21,70
	140	1,85	6,14
	180	2,16	2,68
50	100	0,25	3,91
	140	0,87	11,23

	180	2,34	2,87
60	100	0,40	1,57
	140	1,19	13,41
	180	2,50	2,49

Iz rezultata datih Tabeli 17 vidi se da se pri izotermnom postupku na posmatranim temperaturama sa povećanjem pritiska, u svim slučajevima, povećava prinos ekstrakcije tj. prinos ekstrakata. Ostvareni prinos ekstrakcije na temperaturi 60°C je viši u odnosu na dobijeni prinos pri temperaturama 40° i 50°C. Takođe prinos dobijen na temperaturi 50°C je nešto viši od prinosa ostvarenog na 40°C.

Što se tiče sadržaja etarskog ulja u dobijenim ekstraktima iz rezultata datih u Tabeli 17 vidi se da ekstrakt dobijen pri pritisku od 100 bar i 40°C ima najveći sadržaj etarskog ulja (21,71%) što je u saglasnosti sa literaturnim podacima. Najviši sadržaj etarskog ulja u ekstraktu dobijen pri 50°C, ostvaren je pri pritisku od 140 bar. Isti zaključak je izveden i sa ekstraktom dobijenim pri 60°C i pritisku od 140 bar. Radi preglednosti i izvođenja potpunijih zaključaka, rezultati su prikazani dijagramom na Slici 24.



Slika 24. Histogram prinosa ekstrakcije lišća ginka natkritičnim ugljendioksidom (vreme ekstrakcije 4 h)

### 3.3.3.2. Ekstrakcija droge ugljenik (IV)-oksidom u tečnom stanju

Ugljendioksid na temperaturama ispod kritičnih vrednosti i najčešće na pritisku nešto iznad ili ispod kritičnog pritiska nalazi se u tečnom stanju. On se takođe dosta koristi za ekstrakciju droga biljnog porekla, a kao što je poznato i prva primena ugljendioksida pod pritiskom bila je ekstrakcija tečnim tj. subkritičnim ugljendioksidom.

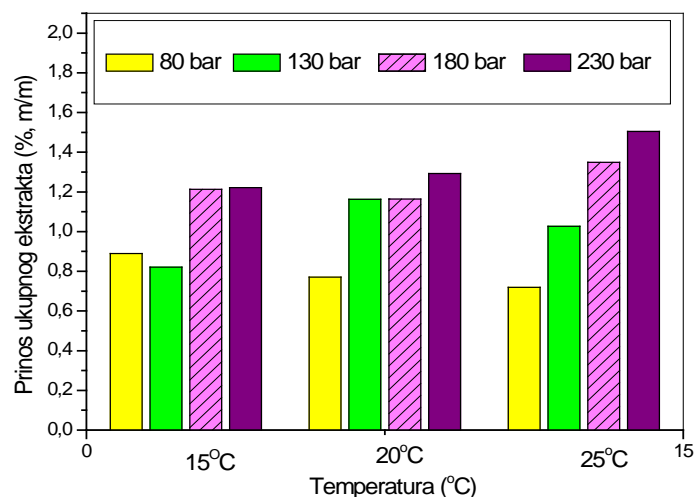
Na sličan način je izvršena ekstrakcija lišća ginka izotermnim postupkom primenom tečnog ugljendioksida pri pritiscima 80, 130, 180 i 230 bar, na tri različite konstantne temperature. U ovom slučaju ekstrakcija je trajala 3 sata. Nakon isteka vremena ekstrakcije

izmerena je masa ekstrakta, izračunat prinos ekstrakcije i određen sadržaj etarskog ulja u ekstraktima destilacijom vodenom parom. Rezultati ovih ispitivanja su dati u Tabeli 18.

Tabela 18. Određivanje prinosa ekstrakcije i sadržaja etarskog ulja u dobijenim ekstraktima tečnim ugljendioksidom (w-0,194 kg/h, d-0,253 mm) - izotermni postupak

Temperatura (°C)	Pritisak (bar)	Sadržaj (% m/m)	
		CO <sub>2</sub> -ekstrakt (g/100 g droge)	Etarsko ulje (g/100 g CO <sub>2</sub> ekstrakta)
15	80	0,89	11,59
	130	0,82	5,36
	180	1,21	2,93
	230	1,22	5,31
20	80	0,77	7,36
	130	1,16	-
	180	1,16	3,11
	230	1,29	3,65
25	80	0,72	4,87
	130	1,03	3,43
	180	1,35	2,61
	230	1,51	3,69

Kao i u slučaju ekstrakcije superkričnim ugljendioksidom, i u ovom slučaju se može zaključiti da se prinos ekstrakcije povećava sa povećanjem pritiska. U ovim ispitivanim slučajevima prinos ekstrakcije se kreće od 0,72 do 1,51 g/100 g droge. Rezultati su prikazani na Slici 25.



Slika 25. Histogram uticaj pritiska i temperature na ukupni prinos ekstrakta lišća ginka (ugljendioksid u tečnom stanju)

Iz rezultata se može zaključiti da temperatura ekstrakcije nema jednoznačan uticaj na prinos ekstrakta. Upoređujući rezultate ostvarenog prinosa ekstrakcije lišća ginka tečnim ugljendioksidom sa rezultatima dobijenim primenom natkritičnog CO<sub>2</sub> vidi se da se u ovom drugom slučaju dobija znatno veći prinos ekstrakcije, što je u saglasnosti sa teoretskim principima.

Ekstrakt dobijen pri 80 bar i 15°C sadrži najviše etarskog ulja (11,59 g/100 g ekstrakta) u odnosu na druge ispitivane slučajeve, gde se sadržaj etarskog ulja kreće od 2,61 do 7,36 g/100 g ekstrakta.

Ukoliko se posmatra sadržaj etarskog ulja u ekstraktima, dobijenim tečnim i natkritičnim ugljendioksidom, izražen u odnosu na drogu, može se uočiti da je on značajno veći nego njegov sadržaj u biljnom materijalu određen oficinalnim postupkom (0,0083%). Ovo povećanje sadržaja etarskog ulja u odnosu na drogu se kreće od 4 (za ekstrakciju lišća ginka tečnim ugljendioksidom) do 10 puta (za ekstrakciju lišća ginka natkritičnim ugljendioksidom). Objašnjenje ove pojave se može tražiti u činjenici da lišće ginka, pored tzv. "slobodnog" etarskog ulja sadrži i masna ulja, smole, voskove, u kojima je rastvoren jedan deo etarskog ulja. Postupkom destilacije sa vodenom parom, koji za određivanje sadržaja etarskog ulja u drogi propisuju sve svetske farmakopeje, izdvaja se po svemu sudeći samo slobodno etarsko ulje koje je dostupno vodenoj pari. Ekstrakcijom lišća ginka ugljendioksidom pod pritiskom, pored slobodnog etarskog ulja ekstrahuju se i masno ulje, voskovi i smole, kao i u njima rastvoreno etarsko ulje. Kada se CO<sub>2</sub> ekstrakti, radi određivanja etarskog ulja, podvrgnu destilaciji sa vodenom parom, razumljivo je da će dobijene vrednosti biti veće od sadržaja etarskog ulja u drogi, određeno oficinalnim postupkom.

### **3.3.4. Izobarni postupak ekstrakcije**

#### **3.3.4.1. Uticaj temperature na prinos ekstrakcije natkritičnim i tečnim ugljenik (IV)-oksidom**

Uticaj temperature na ekstrakciju je teže proceniti nego uticaj pritiska, jer postoje dva suprotna efekta koja utiču na prinos kod ekstrakcije gasovima po pritiskom s obzirom da rastvorljivost organskih jedinjenja zavisi od ravnoteže između gustine fluida i napona pare rastvorka, pri čemu su oba faktor zavisna od temperature i pritiska [66]. Dakle, moć rastvaranja zavisi od gustine rastvarača i od isparljivosti rastvorka. Kada dominira prvi

efekat, povećanje gustine CO<sub>2</sub> može da se postigne ili izotermskim povećanjem pritiska ili izobarskim smanjenjem temperature. Međutim, porast temperature na konstantnom pritisku dovodi do pada gustine natkritičnog rastvarača, što dovodi do smanjenja rastvorljivosti, a s druge strane do porasta pritiska pare manje isparljive supstance, što dovodi do povećanja rastvorljivosti. Na dovoljno visokim pritiscima smanjenje gustine usled povećanja temperature je zanemarljivo. Ako je isparljivost rastvorka dominantan efekat, povećanje rastvorne moći se postiže izobarskim povećanjem temperature, koja uslovljava smanjenje gustine. Rastvorljivost rastvorka može da se poveća, smanjuje ili ostaje ista sa povećanjem temperature na konstantnom pritisku u zavisnosti od toga koji uticaj je dominantniji.

Slika 24 pokazuje efekte pritiska i temperature na prinos ekstraktivnih materija natkritičnim ugljendioksidom, nakon 4 sata ekstrakcije. Povećanje temperature dovodi do povećanog prinosa na višem pritisku verovatno zbog toga što napon pare ekstrahovane materije ima dominantan uticaj. Suprotan efekat uočava se na nižim pritiscima (100 i 140 bar) što ukazuje da je gustina rastvarača glavni faktor koji utiče na povećanje prinosa ekstrakcije. Za ispitivani sistem lišće ginka - natkritični ugljendioksid, pokazalo se da je najefikasniji CO<sub>2</sub> na temperaturi 60°C i pritisku 180 bar, za ispitivani opseg radnih uslova ekstrakcije.

Sličan uticaj temperature na konstantnom pritisak pokazuje se i kod ekstrakcije sa natkritičnim ugljendioksidom i kod ekstrakcije sa tečnim CO<sub>2</sub>.

Rezultati izobarnog postupka ekstrakcije tečnim i natkritičnim ugljendioksidom dati su u Tabelama 19 i 20 gde je pregledno dat uticaj temperature na konstantnom pritisku, na prinos ekstrakcije odnosno prinos ekstrakata i sadržaj etarskog ulja u ekstraktima.

Tabela 19. Rezultati ekstrakcije lišća ginka natkritičnim ugljendioksidom  
(w – 0,194 kg/h, d - 0,190mm, τ = 4 h)- **izobarni postupak**

Pritisak (bar)	Temperatura (°C)	Sadržaj (% , m/m)	
		CO <sub>2</sub> -ekstrakt (g/100 g droge)	Etarsko ulje (g/100 g CO <sub>2</sub> ekstrakta)
100	40	0,47	21,71
	50	0,40	1,57
	60	0,25	3,91
140	40	0,87	11,23
	50	1,19	13,41
	60	1,85	6,14

180	40	2,16	2,68
	50	2,34	2,88
	60	2,51	2,49

Tabela 20. Rezultati ekstrakcije lišća ginka- tečnim ugljendioksidom  
(w- 0,194 kg/h, d - 0,253 mm,  $\tau = 3$  h) - **izobarni postupak**

Pritisak (bar)	Temperatura (°C)	Sadržaj (% , m/m)	
		CO <sub>2</sub> -ekstrakt (g/100 g droge)	Etarsko ulje (g/100 g CO <sub>2</sub> ekstrakta)
80	15	0,89	11,59
	20	0,77	7,36
	25	0,72	4,87
130	15	0,82	5,36
	20	1,16	-
	25	1,03	3,43
180	15	1,21	2,93
	20	1,16	3,11
	25	1,35	2,61
230	15	1,22	5,31
	20	1,29	3,65
	25	1,51	3,69

### 3.4. Kvalitativna i kvantitativna analiza CO<sub>2</sub>-ekstrakta i etarskih ulja

Kvalitativna i kvantitativna analiza je vršena primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom GC-MS. Za analizu su selektovani ekstrakti i etarska ulja dobijena ugljendioksidom u natkritičnom stanju i tečnim ugljendioksidom, kao i ekstrakt dobijen metilenhloridom kao ekstragensom.

Analizirani su sledeći ekstrakti i etarska ulja koji su radi lakšeg snalaženja obeleženi oznakama:

**S<sub>1</sub>** - ekstrakt dobijen ekstrakcijom lišća ginka superkritičnim ugljendioksidom

(p = 100 bar; T = 40°C; w = 0,095 kg/h; d = 0,190 mm)

**S<sub>2</sub>** – etarsko ulje izdvojeno iz S1 ekstrakta destilacijom pomoću vodene pare

(p = 100 bar; T = 40°C; w = 0,095 kg/h; d = 0,190 mm)

**T<sub>1</sub>** - ekstrakt dobijen ekstrakcijom lišća ginka superkritičnim ugljendioksidom

(p = 130 bar; T = 20°C; w = 0,194 kg/h; d = 0,253 mm)

**T<sub>2</sub>** - etarsko ulje izdvojeno iz T<sub>1</sub> ekstrakta destilacijom pomoću vodene pare

(p = 130 bar; T = 20°C; w = 0,194 kg/h; d = 0,253 mm)

**M<sub>1</sub>** - ekstrakt dobijen ekstrakcijom droge – lišće ginka metilenhloridom postupkom ekstrakcije sa povremenim ispuštanjem (20 presifoniranja)

**M<sub>2</sub>** – etarsko ulje dobijeno iz M<sub>1</sub> destilacijom pomoću vodene pare

Nakon izdvajanja etarskog ulja iz ekstrakata, ostatak ekstrakta u balonu je ekstrahovan smešom rastvarača metilenhlorid – etar odnosa 7:3 (v/v), odstranjen rastvarač i dobijeni ostatak takođe analiziran gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom. Oznake uzoraka dobijenih iz odgovarajućih ekstrakata S i T su **S<sub>3</sub>** i **T<sub>3</sub>**.

Rezultati kvantitativne i kvalitativne analize uzoraka primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom prikazani su hromatogramima (Slike 26, 27 i 28) i dati u Tabelama 21, 22 i 23. Radi uporedne analize u tabelama je data i odgovarajuća analiza etarskog ulja.

Radi preglednijeg tumačenja rezultata i u ovom slučaju su komponente prisutne u analiziranim uzorcima podeljene u tri grupe: n-alkani, supstituisani n-alkani i jedinjenja sa kiseonikom. Rezultati ispitivanja su dati u Tabeli 21. Radi uporedne analize sastava etarskih ulja, u istoj tabeli dat je i sastav etarskog ulja dobijen iz droge destilacijom pomoću vodene pare. Iz rezultata u tabeli vidi se da se u pogledu ukupnog sadržaja analiziranih komponenata ekstrakti međusobno razlikuju. Najveći sadržaj ukupnih analiziranih komponenata imaju ekstrakti dobijeni tečnim ugljendioksidom (48,67%), natkritičnim ugljendioksidom (33,87%) i ekstrakt ginka dobijen metilenhloridom (12,82%). Pada u oči rezultat koji je ostvaren analizom ekstrakata dobijen metilenhloridom kao ekstragensom. Naime, u ovom slučaju prisutno je najmanje ukupnih komponenata u poređenju sa rezultatima dobijenim pri analizi za T<sub>1</sub> i S<sub>1</sub> ekstrakata što govori o visokoj neselektivnosti ekstragensa. Karakteristično je da etarska ulja dobijena iz odgovarajućih ekstrakata imaju znatno veći sadržaj ukupnih komponenata u poređenju sa ukupnim sadržajem komponenata dobijenim u etarskom ulju izolovanom iz droge destilacijom pomoću vodene pare. Etarsko ulje dobijeno iz uzorka S<sub>1</sub> sadrži najveći procenat jedinjenja sa kiseonikom (66,36%). Takođe i etarsko ulje dobijeno iz uzorka T<sub>1</sub> ima visok sadržaj ukupnih komponenata (77,67%) sa najvećim procentom jedinjenja sa kiseonikom (58,24%). Sadržaj n-alkana u etarskim uljima izolovanim iz odgovarajućih ekstrakata i droge se kreće od 11,54% do 18,96%. Nasuprot ovome, sadržaj supstituisanih n-alkana je veoma nizak. Ekstrakt sa oznakom

T<sub>1</sub> (dobijen tečnim ugljendioksidom) ima najveći sadržaj n-alkana (30,22%), što je skoro dvostruko veći sadržaj od n-alkana prisutnih u uzorku S<sub>1</sub> (ekstrakt dobijen natkritičnim ugljendioksidom) 14,38%. Na osnovu dobijenih rezultata analiza ekstrakta dobijenog natkritičnim ugljendioksidom (100 bar, 40°C, τ=28 h) uočava se da se komponente prisutne u većem procentu javljaju pri analizi nakon retencionog vremena oko 17 min do 21.03 min. Uočava se značajan procenat (5,13%) komponente grubo identifikovane kao fenol sa zasićenim ugljovodoničnim ostatkom (R<sub>T</sub>=18,65 min). Takođe se uočava prisustvo fenola sa nezasićenim ugljovodoničnim ostatkom (5,66%) sa retencionim vremenom 20,47 min i retencionim vremenom 22,10 min u ukupnom iznosu od 7,65%. U relativno visokom procentu prisutan je n-pentakozan (9,91%) i neidentifikovana komponenta sa sa retencionim vremenom 21,03 min (6,76%).

Etarsko ulje izdvojeno iz natkritičnog CO<sub>2</sub> ekstrakta destilacijom sa vodenom parom sa oznakom S<sub>2</sub> u većem procentu sadrži komponente nakon R<sub>T</sub>=12,37min (80,21%). U najvećem procentu sadrži palmitinsku kiselinu (43,9%), n-heneikozan (6,67%) linoleinsku kiselinu (5,25%), fenol sa zasićenim ugljovodoničnim ostatkom (3,15%) kao i fenol sa nezasićenim ugljovodoničnim ostatkom (1,1%). Neidentifikovana komponenta sa retencionim vremenom 21,03 min prisutna je skoro u istom procentu koji je nađen u ekstraktu (6,02%).

Što se tiče selektovanog ekstrakta lišća Ginka dobijenog tečnim ugljendioksidom pri (130 bar, 20°C, τ = 3h) uočava se da su u većem procentu prisutne komponente čije je retenciono vreme veće od 15,38 min. Ukupni sadržaj komponenata počevši od komponente sa R<sub>T</sub> =15,47 min zaključno sa komponentom sa R<sub>T</sub>=22,33 min, izuzimajući komponente sa sadržajem manjim od 0,5% iznosi (62,11%). Komponenta sa retencionim vremenom 20,53 min (n-pentakozan) prisutna je u procentu (17,39) kao iftalna kiselina (14,78%), n-heptakozan (10,19%), 9,12,15-oktadekatrien-1-ol (9,5%), fenol sa zasićenim ugljovodoničnim ostatkom (5,78%).

Što se tiče etarskog ulja izdvojenog iz tečnog CO<sub>2</sub> ekstrakta sa oznakom T<sub>1</sub> možemo reći da je procentni sadržaj pojedinih komponenata relativno jednako rasporede tokom celog hromatograma sa najvećim procentom komponente sa retencionim vremenom 15,72 min (palmitinska kiselina) od 21,47%

Uzorci označeni sa T<sub>3</sub> i S<sub>3</sub> predstavljaju ostatak ekstrakata nakon izdvajanja etarskog ulja destilacijom pomoću vodene pare. Vidi se da ovi uzorci takođe imaju visok sadržaj ukupnih analiziranih komponenata (32,92% do 36,68%).

Na osnovu rezultata analize zaključuje se da ostatak ekstrakta nakon izdvajanja etarskog ulja, sa oznakom S<sub>3</sub> u najvećem procentu sadrži n-pentakozan (16,72%), za razliku od uzorka T<sub>3</sub> (ostatak ekstrakta nakon izdvajanja etarskog ulja iz ekstrakta sa oznakom T<sub>2</sub>) koji ima najviše n-



heptadekana (10,17%) i ftalne kiseline (14,08%) za razliku od sadržaja koji je nađen u uzorku S<sub>2</sub> (9,04%).

Radi direktnog međusobnog upoređivanja sastava etarskih ulja izolovanih iz odgovarajućih ekstrakata i droge destilacijom pomoću vodene pare na Slici 29 su prikazani uporedni dijagrami.

Tabela 21. Ukupan sadržaj n-alkana, račvastih alkana i jedinjenja sa kiseonikom u analiziranim uzorcima

Komponente	Sadržaj (% , m/m)									
	EU	T1	T2	T3	S1	S2	S3	M1	M2	
n-alkani	14,88	30,22	18,96	11,70	14,38	11,54	17,68	0,29	16,76	
Račvast alkani	0,475	-	0,472	0,039	0,532	0,998	0,069	0,341	0,887	
Jedinjenja sa kiseonikom	32,45	18,45	58,24	21,18	18,89	66,36	18,93	12,19	23,09	
<b>UKUPNO:</b>	<b>47,81</b>	<b>48,67</b>	<b>77,67</b>	<b>32,92</b>	<b>33,80</b>	<b>78,90</b>	<b>36,68</b>	<b>12,82</b>	<b>40,74</b>	

Tabela 22. Sadržaj ugljovodonika (n-alkani, račvasti alkani i dr.) u ispitanim uzorcima

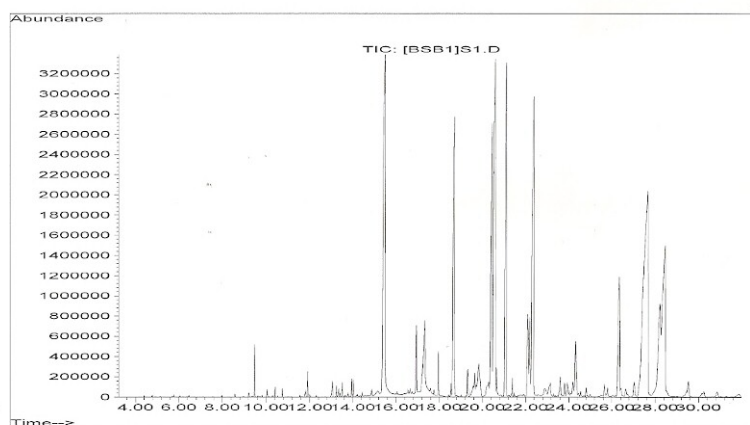
Redni broj	R <sub>T</sub> (min)	Ugljovodonici	Sadržaj (% , m/m)									
			Proizvod									
			EU	T1	T2	T3	S1	S2	S3	M1	M2	
1.	4,91	n-undekan	0,043	0,018	0,240	0,018	0,037	0,028	0,024	0,036	-	
2.	5,98	n-dodekan	0,040	0,015	0,597	-	-	0,088	0,016	-	0,145	
3.	7,19	n-tridekan	0,046	0,068	1,085	0,018	0,029	0,263	0,043	0,032	0,401	
4.	7,99	2-metil tridekan	-	-	0,269	0,039	0,092	0,046	0,050	-	-	
5.	8,17	2,6,10-trimetil dodekan	0,111	-	0,176	-	-	0,046	0,019	-	0,887	
6.	8,48	n-tetradekan	-	-	1,971	-	-	0,225	-	-	0,533	
7.	9,29	2,6,10,14-tetrametil heksadekan	0,364	-	-	-	-	0,442	-	-	-	
8.	9,61	α-amorfen	-	-	-	-	0,093	-	-	-	-	
9.	9,79	n-pentadekan	0,429	0,057	2,333	-	-	0,650	-	0,022	1,659	
10.	10,24	Delta kadinen	0,351	-	-	-	-	0,141	-	-	-	
11.	11,08	n-heksadekan	0,663	0,063	1,764	0,057	-	0,348	-	-	1,639	

12.	11,53	ciklotetradekan	3,029	-	-	-	0,136	0,537	-	-	-
13.	11,66	2,6,10-trimetil pentadekan	-	-	-	-	-	-	0,094	-	-
14.	12,00	ciklododekan	0,729	-	-	-	0,058	-	-	-	-
15.	12,30	n-heptadekan	1,825	0,193	1,814	10,168	0,065	-	0,061	0,198	1,773
16.	12,37	2,6,10,14-tetrametil pentadekan	-	-	-	-	-	0,464	-	-	-
17.	13,49	n-oktadekan	1,834	-	0,787	-	0,258	2,220	-	-	1,383
18.	13,61	2,6,10,14-tetrametil heksadekan	-	-	-	-	-	-	-	0,341	-
19.	13,96	neofitadien	-	-	-	-	0,444	-	0,372	-	8,424
20.	14,63	n-nonadekan	-	-	0,629	-	-	0,255	-	-	1,118
21.	16,66	fluoranten	-	-	-	-	-	-	-	-	0,608
22.	16,77	n-heneikozan	0,372	-	1,889	-	-	6,676	-	-	-
23.	17,77	n-dokozan	0,821	1,342	0,673	-	-	-	-	-	0,473
24.	18,73	n-trikozan	1,973	-	-	-	-	-	-	-	-
25.	19,64	n-tetrakozan	1,578	0,386	0,946	0,843	-	0,388	0,526	-	2,495
26.	20,53	n-pentakozan	3,553	17,39	2,775	-	9,912	-	16,721	-	4,942
27.	21,37	n-heksakozan	0,716	0,502	-	0,593	0,558	0,398	0,352	-	0,201
28.	22,23	n-heptakozan	2,533	10,19	1,469	-	-	-	-	-	-
29.	23,12	n-dotriakontan	0,112	-	-	-	0,981	-	-	-	-
30.	24,24	n-nonakozan	0,314	-	-	-	2,131	0,417	-	-	-
31.	27,14	n-tetratetrakontan	-	-	-	-	0,419	-	-	-	-
UKUPNO:			21,44	30,22	19,42	11,74	15,21	13,63	18,28	0,63	26,28

Tabela 23. Sadržaj jedinjenja sa kiseonikom u ispitivanim uzorcima

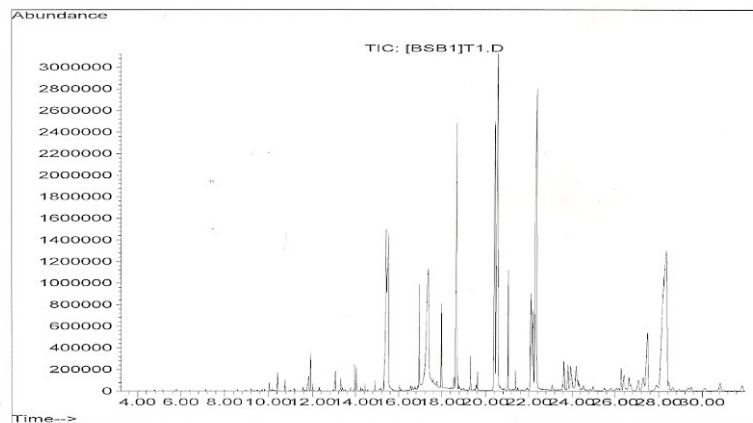
Redni broj	R <sub>T</sub> (min)	Komponente sa kiseonikom	Sadržaj (% m/m)								
			Proizvod								
			EU	T1	T2	T3	S1	S2	S3	M1	M2
1.	3,81	benzaldehyd	0,495	-	0,027	0,015	0,045	-	0,032	-	-
2.	4,36	benzilalkohol	0,228	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	5,56	menton	0,125	0,032	-	0,013	0,028	0,013	0,035	-	-
4.	5,68	(+)-izomenton	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.	5,75	L-mentol	0,050	-	-	-	0,117	0,189	-	-	-
6.	6,22	verbenon	-	-	-	-	0,012	-	-	-	-
7.	6,74	nonanska kiselina	0,292	-	0,171	-	0,071	0,105	-	-	-
8.	7,15	1 S-neomentilacetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.	8,00	dekanska kiselina	0,461	-	-	-	-	-	-	0,505	-
10.	10,06	2,6-bis (1,1-dimetiletil) fenol	-	0,172	0,201	-	0,132	0,170	0,124	0,278	-
11.	10,42	dihidroaktindiolid	0,310	-	-	0,316	0,140	-	-	-	-

12.	10,63	dodekanska kiselina	2,750	-	1,094	-	-	0,348	-	-	-
13.	10,98	- (-) spatulenol	-	-	-	-	0,043	-	-	-	-
14.	11,21	4-(2,4,6-trimetil fenil)-butan-2-ol	0,428	-	0,331	-	-	-	0,091	-	0,456
15.	13,21	tetradekanska kiselina	8,694	-	3,710	-	-	1,492	-	0,288	5,950
16.	13,79	izopropilmiristat	-	0,108	-	-	0,097	3,651	0,072	-	-
17.	14,06	6,10,14-trimetil, 2-pentadekanon	10,09	-	2,668	-	-	1,603	-	-	-
18.	14,21	pentadekanska kiselina	0,237	0,193	0,276	-	-	-	-	0,380	-
19.	14,88	eikozanska kiselina	-	-	-	-	0,155	-	-	-	-
20.	14,91	farnezil aceton C	-	-	0,761	-	-	1,005	-	-	2,295
21.	15,38	1,2 – benzene likarbonska kiselina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22.	15,47	ftalna kiselina	-	-	10,54	14,08	-	-	9,041	-	-
23.	15,72	Heksadekanska kiselina	1,721	-	21,47	-	-	43,90	-	-	11,45
24.	17,00	fitol	0,839	2,048	5,231	-	0,787	3,58	-	-	-
25.	17,27	linoleinska kiselina	-	-	-	-	-	5,252	-	1,337	2,004
26.	17,38	9,12,15-oktadekatrien-1-ol	3,541	9,495	7,209	-	3,564	-	3,326	-	-
27.	18,65	fenol sa zasićenim alkil ostatkom	0,195	5,783	3,440	6,036	5,131	3,147	5,639	9,409	-
28.	19,32	4,8,12,16-tetrametil heptadekan-4-olid	0,867	0,621	0,866	0,718	0,411	0,684	0,596	0,320	0,938
29.	20,47	fenol sa nezasićenim alkil ostatkom	-	-	-	-	5,660	-	-	-	-
30.	22,10	fenol sa nezasićenim alkil ostatkom	0,277	-	-	-	1,992	-	-	-	-
31.	22,267	fenol sa nezasićenim alkil ostatkom	-	-	-	-	-	1,098	-	-	-
32.	23,56	1-heksakozanal	-	-	-	-	0,513	0,123	-	-	-
33.	27,26	1 - eikozanol	0,383	-	-	-	-	-	-	-	-

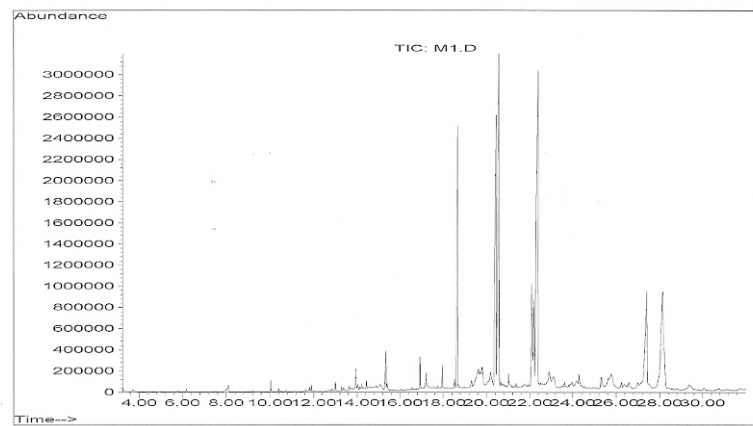


	UKUPNO:	31,98	18,45	57,99	21,18	18,89	66,36	18,96	12,52	23,09
--	---------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

a



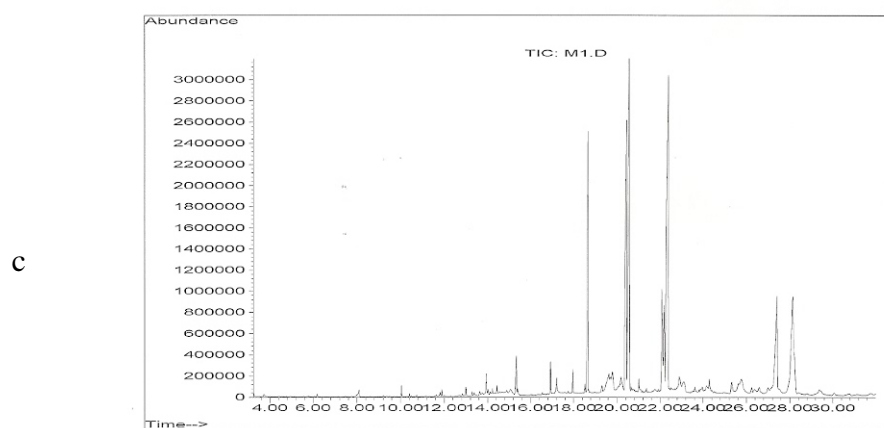
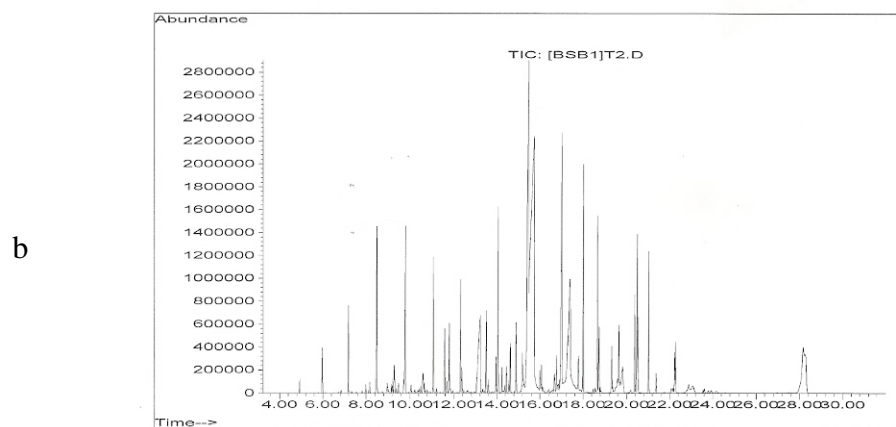
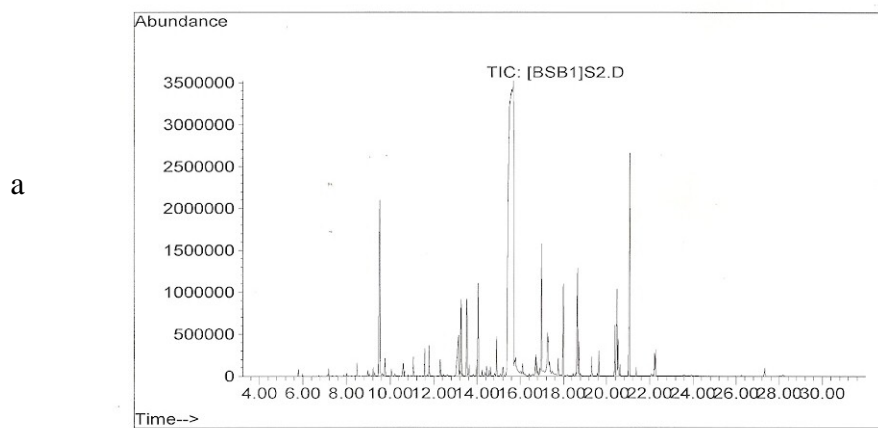
b



c

Slika 26. GC-hromatogrami ekstrakata dobijeni različitim rastvaračima

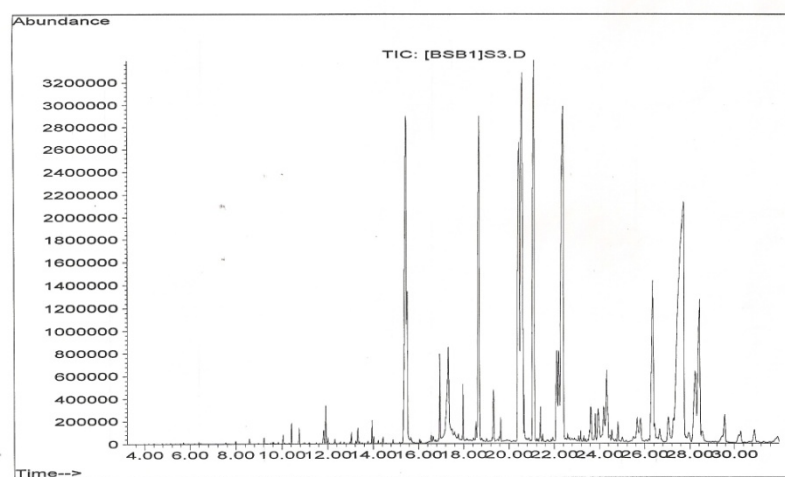
a – S<sub>1</sub> ekstrakt; b – T<sub>1</sub> ekstrakt; c – M<sub>1</sub> ekstrakt



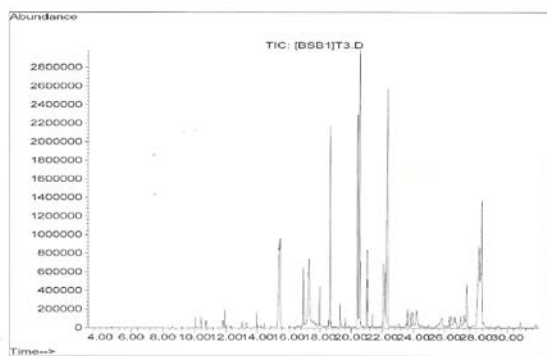
Slika 27. GC-hromatogram etarskih ulja dobijena iz odgovarajućih ekstrakata

a – S<sub>2</sub> etarsko ulje ; b – T<sub>2</sub> etarsko ulje; c – M<sub>2</sub> etarsko ulje

a



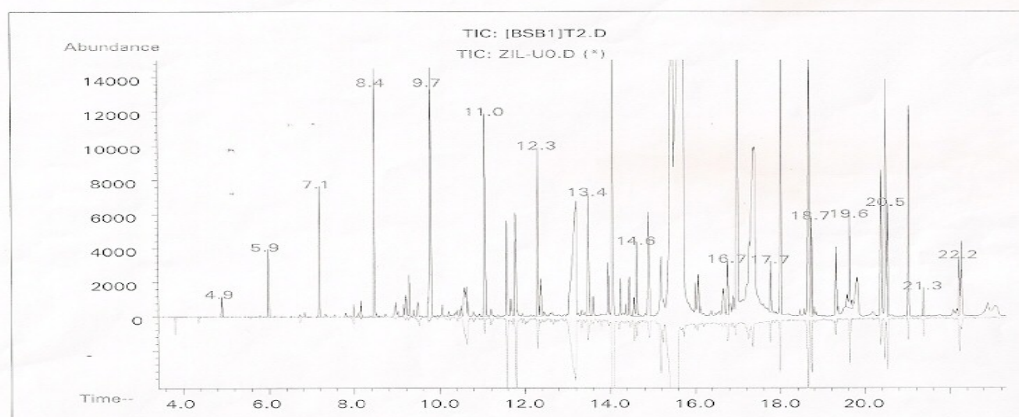
b



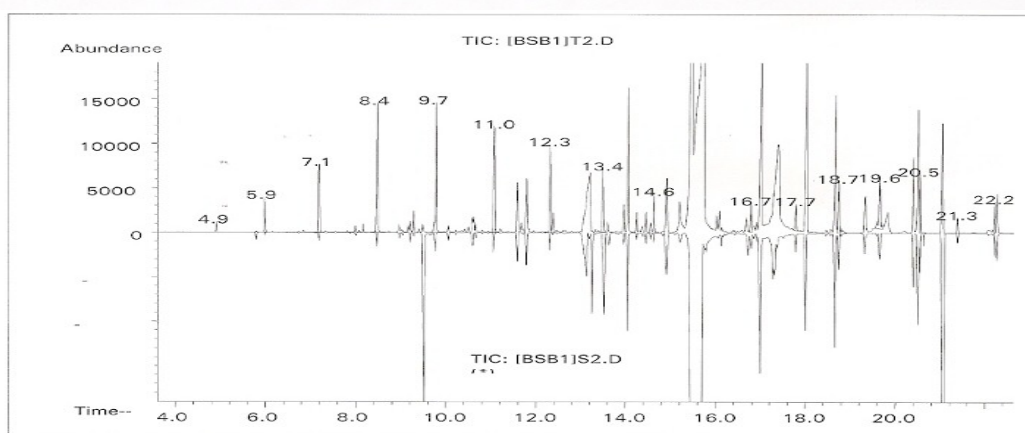
Slika 28. GC-hromatogrami ostataka ekstrakata nakon izdvajanja etarskog ulja destilacijom pomoću vodene pare

a – S<sub>3</sub> ekstrakt ; b – T<sub>3</sub> ekstrakt

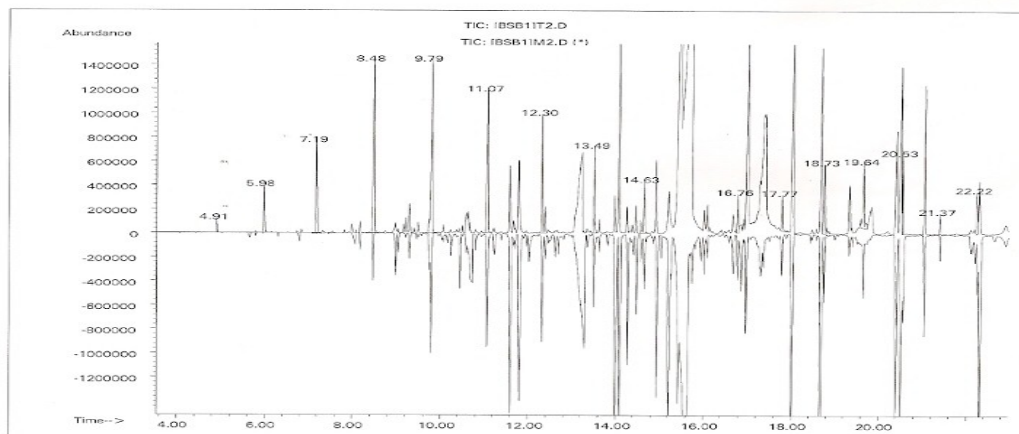
a



b



c



Slika 29. Uporedni GC-hromatogrami etarskih ulja.

Retenciona vremena signala u etarskom ulju T<sub>2</sub> odgovaraju n-alkanima

(C<sub>11</sub>H<sub>24</sub> do C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>) i (C<sub>21</sub>H<sub>44</sub> do C<sub>27</sub>H<sub>56</sub>)

R<sub>T</sub> (4,91-14,63) i R<sub>T</sub> (16,77 -22,23)

- a) T<sub>2</sub> (etarsko ulje dobijeno iz ekstrakta T<sub>1</sub>) i EU (etarsko ulje dobijeno iz droge)
- b) T<sub>2</sub> (etarsko ulje dobijeno iz ekstrakta T<sub>1</sub>) i S<sub>2</sub> (etarsko ulje dobijeno iz S<sub>1</sub>)
- c) T<sub>2</sub> (etarsko ulje dobijeno iz ekstrakta T<sub>1</sub>) i M<sub>2</sub> (etarsko ulje dobijeno iz M<sub>1</sub>)

Ekstrakcija je vršena natkritičnim ugljendioksidom na pritiscima 80,100, 150, 250 bar i tečnim ugljendioksidom na 80, 180 i 230 bar radi dobijanja odgovarajućih CO<sub>2</sub>-ekstrakata. Takođe je izvršena analiza odgovarajućih ekstrakata gasnom hromatografijom s masenom spektrometrijom pri čemu su doneti zaključci:

Ekstrakti dobijeni natkritičnim ugljendioksidom na 80,100, 250 bar sadrže fenole sa zasićenim ugljovodoničnim ostatkom od 5,1 – 8,4%, dok etarsko ulje izdvojeno natkritičnog CO<sub>2</sub>-ekstrakta dobijenog na 100 bar sadrži 3,1%.

Takođe, etarsko ulje izdvojeno iz tečnog CO<sub>2</sub>-ekstrakta dobijenog na 130 bar sadrži 3,4% ove komponente, dok se njen sadržaj u ekstraktima dobijenim na 80, 130 i 230 bar i 20°C kreće od 5,2 do 6,075%. Visok sadržaj ovog fenola sa nalazi u metilenhloridnom ekstraktu (9,4%). Nasuprot ovom, komponenta sa retencionim vremenom 20,47 min identifikovana kao fenol sa nezasićenim ostatkom, prisutna je samo u ekstraktu dobijenim natkritičnim ugljendioksidom na 100 bar (5,66%). Ekstrakti dobijeni natkritičnim ugljendioksidom na 80,100 i 250 bar sadrže u visokom procentu n-pentakozan od 9,9 do 25,4%. Ova komponenta je prisutna takođe u visokom procentu i u ekstraktima dobijenim tečnim ugljendioksidom na pritiscima 80, 130, 180 i 230 bar, i 20°C (8,57 -17,4%). Sadržaj ove komponente u etarskom ulju dobijenom iz droge destilacijom pomoću vodene pare je daleko niži i iznosi 3,6%.

Etarsko ulje izdvojeno iz ekstrakta dobijenog na 130 bar i 20°C takođe sadrži nizak procenat ove komponente (2,8%) kao i etarsko ulje izdvojeno iz metilenhloridnog ekstrakta (oko 5%). Komponente sa retencionim vremenom 21,03 min koje nije identifikovana takođe je prisutna u ekstraktu kao i u etarskom ulju izdvojenom iz ovog ekstrakta dobejenom natkritičnim ugljendioksidom na 100 bar (oko 6%).

Na osnovu rezultata analize ekstrakata, dobijenih natkritičnim ugljendioksidom na pritiscima 80,150 i 250 bar, kao i ekstrakata dobijenih tečnim ugljendioksidom na 80,180 i 230 bar, gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom zaključuje se da izdvojeni ekstrakti u relativno značajnom procentu sadrže pojedine komponente sa retencionim vremenima od 15,47 do 21,03 min. naime, ekstrakti dobijeni natkritičnim ugljendioksidom na 150 i 250 bar sadrže ftalnu kiselinu od 8,06 do 8,46% za razliku od ekstrakata dobijenih tečnim CO<sub>2</sub> na 180 bar, koji sadrže ftalnu kiselinu u iznosu od 12,54%. Pojedini analizirani ekstrakti sadrže u značajnom procentu fenole sa zasićenim ostatkom (5,0-6,0%). U značajno visokom procentu pojedini ekstrakti sadrži i komponentu sa R<sub>T</sub> =20,53 min identifikovanoj kao n-pentakozan (8,57-25,36%).



### 3.5. Modelovanje ekstrakcionog sistema: lišće ginka–ugljenik (IV)-oksid

Zajedno sa istraživanjima u oblasti natkritične ekstrakcije, razvijani su matematički modeli za opisivanje ovih procesa. Matematički modeli omogućavaju kvantitativno opisivanje ekstrakcije. Neophodni su u planiranju i prenosu postupka sa laboratorijskog na industrijski nivo. Matematički model ne sme da bude samo matematički instrument, nego mora da bude odraz fizičke slike koja proizilazi iz ispitivane materije i eksperimentalnih ispitivanja.

Modeli mogu da budu empirijski [69, 70,71] zasnovani na analogiji prenosa toplote i prenosa mase [72] ili na integraciji diferencijalnog bilansa mase za ekstraktor [73, 74, 75, 76]. Reverchon i saradnici (1993) primenili su model za natkritičnu ekstrakciju iz lista ruzmarina, bosiljka i majorana, koji opisuje prenos mase između jedne sferne, porozne čestice i natkritičnog rastvarača [77].

Metod koji je predložila Sovová [75] je najčešće korišćen model i posmatra klipno proticanje natkritičnog rastvarača kroz fiksiran sloj mlevenog biljnog materijala, zasnovan je na rešavanju diferencijalnog bilansa mase. Ovaj model može da se primeni na natkritičnu ekstrakciju bilo kog biljnog materijala i na ekstrakciju kako etarskih tako i masnih ulja. Mana ovog modela je veliki broj parametra kojima se ovi procesi opisuju, a koji se određuju na osnovu eksperimentalnih podataka.

Empirijski modeli nastaju iz eksperimentalnih podataka i mogu da budu 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 samo interpolaciju eksperimentalnih rezultata.

Ekstrakcija tečnim i natkritičnim ugljendioksidom i modelovanje datih sistema je predmet mnogih istraživanja, kao na primer kamilice [78], timijana [79, 80], lavande [81], nevena[82], lana [83], ruzmarina [84] i drugih prirodnih proizvoda [85,86], etarskih ulja [87] itd.ali podataka o modelovanju sistema ginko-ugljendioksid pod pritiskom pregeledom literature nije pronađen.

### 3.5.1. Primena empirijskog modela Naika i saradnika na modelovanje ekstrakcije lišća ginka tečnim i natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom

Naik i saradnici su ekstrahovali nekoliko biljnih vrsta (đumbir, karanfilić, morač) tečnim ugljendioksidom, i dobijene rezultate modelovali [70]. Prinos ekstrakcije,  $y$ , u funkciji vremena predstavili su jednačinom koja je slična Langmirovoj adsorpcionoj izotermi:

$$y = \frac{y_{\infty} \cdot t}{b+t} \quad (10)$$

gde je  $y$  – prinos ekstrakta za vreme  $t$

$y_{\infty}$  - maksimalan prinos ekstrakcije

$b$  – konstanta

Transformacijom jednačine (10) dobija se

$$\frac{1}{y} = \frac{b}{y_{\infty}} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{y_{\infty}} \quad (11)$$

Uvodeći smenu  $t' = 1/t$  jednačina (10) se prevodi u oblik prave

$$\frac{1}{y} = \frac{b}{y_{\infty}} t' + \frac{1}{y_{\infty}} \quad (12)$$

odnosno

$$\frac{1}{y} = B t' + \frac{1}{y_{\infty}} \quad (13)$$

gde je:

$$B = \frac{b}{y_{\infty}}$$

U ovom radu je primenjen model Naika za modelovanje eksperimentalnih rezultata ekstrakcije lišća ginka tečnim i natkritičnim ugljendioksidom dobijenih tokom ekstrakcije sa različitim stepenima usitnjenosti droge, različitim protocima ekstragensa i različitim pritiscima.

U cilju primene jednačine (13), za modelovanje ekstrakcionog sistema lišće (*Ginkgo biloba*) - tečni ugljendioksid, korišćenjem modela Naik-a i saradnika, na osnovu eksperimentalnih rezultata dobijenih tokom 15 sati ekstrakcije tečnim CO<sub>2</sub> na 65 bar i 25 °C, za različite stepene usitnjenosti droge, pri protoku ugljendioksida od 0,194 kg/h, izračunate su recipročne vrednosti prinosa  $1/y$  i date u Tabeli 24, a zavisnosti  $1/y$  od  $1/t$  prikazane su na Slici 30.

Tabela 24. Eksperimentalni rezultati ispitivanja kinetike ekstrakcije droge različitog stepena usitnjenosti (d); uslovi ekstrakcije p=65 bar, t=25°C, w=0,194 kg/h. Eksperimentalne vrednosti prinosa ekstrakta ginka (y<sub>e</sub>), a izračunate vrednosti po modelu Naika i sar. (y<sub>m</sub>)

No.	t (h)	1/t (h <sup>-1</sup> )	y <sub>e</sub> (% , m/m)			1/ y <sub>e</sub>			y <sub>m</sub> (% , m/m)			$\left  \frac{y_e - y_m}{y_e} \right  100$		
			<b>Stepen usitnjenosti</b>											
			d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>	d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>	d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>	d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>
1.	0,5	2	0,06	0,04	0,02	17,92	27,10	59,88	0,09	0,10	0,15	67,88*	157,94*	823,39*
2.	1	1	0,05	0,08	0,20	20,92	11,88	5,11	0,18	0,19	0,28	282,69*	121,40*	45,54*
3.	2	0,5	0,34	0,34	0,50	2,97	2,96	2,01	0,35	0,36	0,49	3,69	5,74	0,81
4.	3	0,33	0,49	0,56	0,67	2,03	1,80	1,49	0,50	0,52	0,65	1,53	7,41	2,60
5.	4	0,25	0,74	0,71	0,74	1,34	1,41	1,36	0,64	0,66	0,78	13,95	7,06	5,57
6.	5	0,20	0,84	0,84	0,85	1,20	1,19	1,18	0,77	0,80	0,88	7,99	5,27	3,63
7.	7	0,143	1,07	1,14	1,06	0,94	0,88	0,94	1,00	1,04	1,04	6,47	8,47	2,38
8.	9	0,111	1,15	1,22	1,14	0,87	0,82	0,88	1,19	1,25	1,10	4,10	2,77	3,47
9.	11	0,091	1,22	1,34	1,20	0,82	0,75	0,83	1,37	1,44	1,15	11,76	7,54	4,29
10.	13	0,077	1,35	1,44	1,31	0,74	0,69	0,76	1,52	1,61	1,23	12,58	11,32	6,20
11.	15	0,067	1,53	1,50	1,46	0,65	0,67	0,68	1,65	1,75	1,30	8,06	16,73	11,27
SRD											7,79	8,04	5,06	

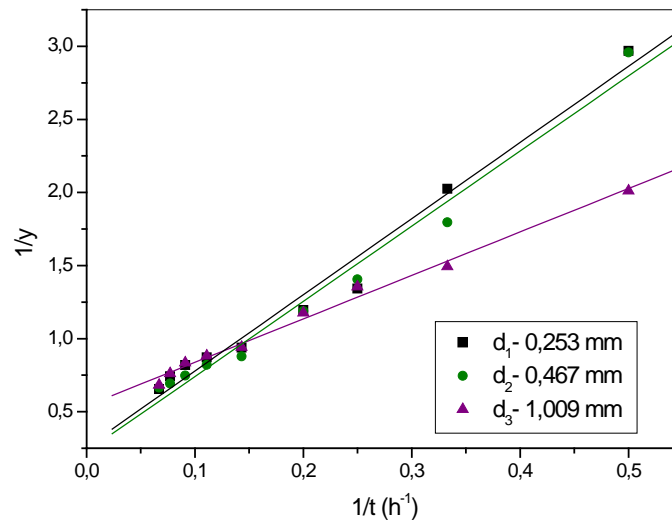
\*- rezultati koji nisu uzeti u obzir pri izračunavanju SRD

$$SRD = \frac{\sum \left| \frac{y_e - y_m}{y_e} \right| 100}{n}$$

y<sub>e</sub> - eksperimentalne vrednosti

y<sub>m</sub> - izračunata vrednost iz model jednačine

n - broj određivanja



Slika 30. Zavisnost recipročne vrednosti prinosa ukupnog ekstrakta ( $1/y$ ) od recipročne vrednosti vremena ekstrakcije

Jednačine za izračunavanje prinosa ukupnog ekstrakta ginka pri navedenim uslovima ekstrakcije tečnim ugljendioksidom, za različite stepene usitnjenosti, date su u Tabeli 25, a izračunate vrednosti za parametre jednačine Naik-a i sar.(10) date su u Tabeli 26.

Tabela 25. Transformisani oblik jednačine Naik-a i sar. za izračunavanje prinosa ekstrakcije lišća ginka ( $y_m$ ) tečnim ugljendioksidom, za različite stepene usitnjenosti

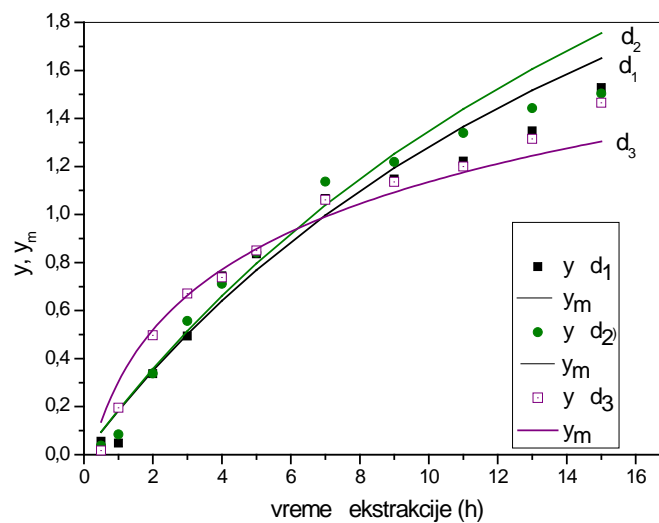
Srednji prečnik čestice $d$ (mm)	Jednačina $1/y = B t' + 1/y_\infty$	$ r $
0,253	$1/y = 5,145 t' + 0,279$	0,99098
0,467	$1/y = 5,135 t' + 0,228$	0,99031
1,009	$1/y = 4,496 t' + 0,285$	0,98509

Tabela 26. Vrednosti  $y_\infty$  i  $b$  u model jednačini Naik-a i sar.

Srednji prečnik čestice $d$ (mm)	$b$	$y_\infty$	Koeficijent korelacije	Srednja relativna devijacija (%)
0,253	18,430	3,582	0,9850	7,79
0,467	22,491	4,379	0,9903	8,04
1,009	15,795	3,513	0,9909	5,06

Na osnovu dobijenih koeficijenata korelacije  $|r|$  može se videti da između veličina  $1/y$  i  $1/t$  postoji jaka korelacija.

S obzirom na eksperimentalne vrednosti prinosa ( $y$ ) i vrednosti prinosa dobijenih preko Naik-ove jednačine ( $y_m$ ), može se zaključiti da Naik-ov model može uspešno da se primeni za modelovanje prinosa ukupnog ekstrakta ginka tečnim ugljendioksidom u vremenskom intervalu od 1 do 10 sati, jer u tom periodu ekstrakcije sistem je postojbi dobra saglasnost sa predviđenim modelom. Tokom duže ekstrakcije, posle 10 sati, sistem lišće ginka – tečni  $\text{CO}_2$  pokazuje znatna odstupanja (Slika 31).



Slika 31. Uticaj stepena usitnjenosti na prinos ekstrakcije lišća ginka tečnim  $\text{CO}_2$ .  
 Simboli predstavljaju eksperimentalne vrednosti prinosa  $y$  (% m/m),  
 a pune linije odgovaraju vrednostima izračunatim prema modelu Naika i sar. ( $y_m$ ).

Jednačina (13) je primenjena na eksperimentalne rezultate dobijenih prinosa ekstrakata lišća ginka ekstrakcijom ugljendioksidom u natkritičnom stanju, pri različitim stepenima usitnjenosti droge ( $d_1=0,190$ ,  $d_2=0,467$  i  $d_3=1,009$  mm) i pri različitim protocima ekstragensa ( $w_1=0,095$ ,  $w_2=0,194$  i  $w_3=0,277$  kg/h), i za modelovanje ovog sistema izračunate su recipročne vrednosti prinosa i vremena ekstrakcije ( $1/y_e$  i  $1/t$ ), i zbirno date u Tabeli 27. U istoj tabeli su date i izračunate vrednosti prinosa po jednačini Naika ( $y_m$ ). Na Slici 32 prikazana je grafička zavisnost  $1/y$  i  $1/t$  za različite stepene usitnjenosti.

Tabela 27 . Eksperimentalni rezultati ispitivanja kinetike ekstrakcije droge različitog stepena usitnjenosti ;  
 uslovi ekstrakcije p=100 bar, t=40°C, w=0,194 kg/h; Eksperimentalne vrednosti prinosa  
 (y<sub>e</sub>), a izračunate vrednosti po modelu Naika i sar. ( y<sub>m</sub>)

No.	t (h)	1/t (h <sup>-1</sup> )	y <sub>e</sub> (% , m/m)			1/ y <sub>e</sub>			y <sub>m</sub> (% , m/m)			$\frac{ y_e - y_m }{y_e} 100$		
			<b>Stepen usitnjenosti</b>									d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>
			d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>	d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>	d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>3</sub>			
1	0,5	2	0,02	0,10	0,0014	47,61	10,32	714,2 9	0,19	0,09	0,07	469,23*	11,16	5208,3*
2	1	1	0,11	0,11	0,01	9,43	9,35	89,45	0,23	0,17	0,15	119,93*	55,81	1203,6*
3	2	0,5	0,19	0,43	0,11	5,18	2,31	8,72	0,44	0,31	0,28	130,12*	27,58	144,63*
4	3	0,33	0,55	0,54	0,40	1,79	1,87	2,51	0,63	0,44	0,41	13,78	17,17	1,78
5	4	0,25	0,84	0,65	0,49	1,19	1,54	2,03	0,81	0,56	0,52	3,19	13,78	5,79
6	5	0,2	1,14	0,84	0,68	0,87	1,19	1,47	0,97	0,67	0,63	14,96	20,82	7,39
7	6	0,17	1,17	0,91	0,80	0,85	1,10	1,25	1,11	0,76	0,73	4,37	16,41	8,36
8	7	0,14	1,41	0,99	0,91	0,71	1,01	1,10	1,25	0,85	0,83	10,83	14,66	9,28
9	8	0,13	1,65	1,03	0,93	0,60	0,97	1,07	1,38	0,92	0,92	16,55	10,28	1,63
10	9	0,11	1,81	1,05	1,01	0,55	0,96	0,99	1,50	1,00	1,00	17,39	4,78	0,83
11	10	0,10	1,76	1,10	1,06	0,57	0,91	0,94	1,60	1,06	1,08	8,60	3,54	1,84
12	11	0,09	1,80	1,14	1,10	0,55	0,88	0,91	1,71	1,12	1,15	5,33	1,06	5,15
13	12	0,08	1,94	1,21	1,14	0,52	0,83	0,87	1,80	1,18	1,23	0,70	2,30	7,20
14	13	0,076	1,86	1,20	1,22	0,54	0,84	0,82	1,89	1,23	1,29	1,65	3,06	6,27
15	14	0,071	1,88	1,22	1,22	0,53	0,82	0,82	1,98	1,28	1,36	5,14	5,20	11,21
16	15	0,067	1,87	1,25	1,23	0,53	0,80	0,81	2,06	1,33	1,42	9,70	6,22	15,21
<b>SRD</b>											8,63	13,36	6,30	

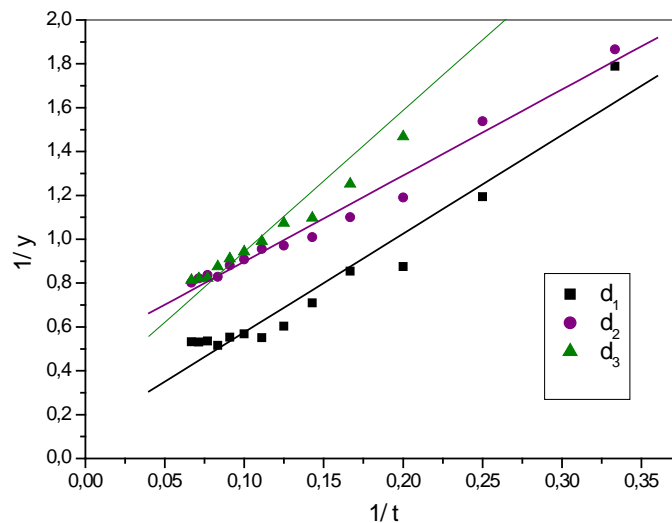
\*- rezultati koji nisu uzeti u obzir pri izračunavanju SRD

$$SRD = \frac{\sum \frac{|y_e - y_m|}{y_e} | 100}{n}$$

y<sub>e</sub> – eksperimentalne vrednosti

y<sub>m</sub> – izračunata vrednost iz model jednačine

n – broj određivanja



Slika 32. Zavisnost vrednosti  $1/y$  od  $1/t$

Jednačine za izračunavanje ukupnog ekstrakta ginka pri navedenim uslovima ekstrakcije natkritičnim  $\text{CO}_2$ , za različite stepene usitnjenosti droge, date su u Tabeli 28. Izračunati parametri jednačine Naik-a (10) dati su u Tabeli 29.

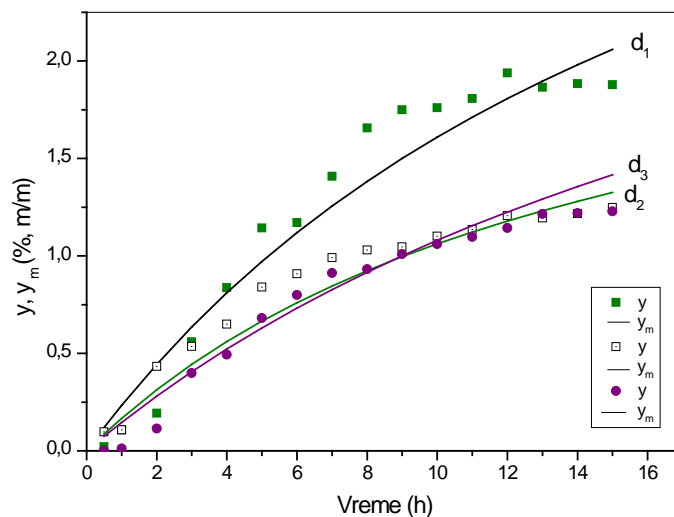
Tabela 28 . Transformisani oblik jednačine Naik-a i saradnika za izračunavanje prinosa ukupnog ekstrakta ginka ( $y_m$ ) natkritičnim ugljendioksidom

Srednji prečnik čestica (mm)	Jednačina $1/y = B t + 1/y_\infty$	$ r $
$d_1=0,190$	$1/y = 4,076 t + 0,214$	0,95467
$d_2=0,467$	$1/y = 5,618 t + 0,379$	0,94970
$d_3=1,009$	$1/y = 6,595 t + 0,267$	0,99049

Tabela 29. Vrednosti  $y_\infty$  i  $b$  u model jednačini Naik-a i saradnik

Srednji prečnik čestica (mm)	$b$	$y_\infty$	Koeficijent korelacije	Srednja relativna devijacija (%)
$d_1=0,190$	19,074	4,680	0,9148	8,63
$d_2=0,467$	14,793	2,633	0,9497	13,36
$d_3=1,009$	24,737	3,751	0,9904	6,30

Na osnovu vrednosti prinosa dobijenih izračunavanjem preko jednačine Naik-a ( $y_m$ ) i njihovim upoređivanjem sa eksperimentalnim vrednostima (Slika 33) može da se zaključi da ne postoji izrazita saglasnost.



Slika 33. Uticaj usitnjenosti droge na prinos ekstrakta ginka. Simboli označavaju eksperimentalne vrednosti prinosa ( $y$ ). Pune linije označavaju vrednostima prinosa izračunatim prema model jednačine Naika i sar.

Radi primene jednačine (13) za modelovanje ekstrakcionog sistema lišće *Ginkgo biloba* – natkritični  $\text{CO}_2$ , određivan je prinos ukupnog ekstrakta, tokom 15 sati ekstrakcije, pri različitim protocima ugljendioksida. Izračunate su recipročne vrednosti prinosa  $1/y$  i date su u Tabeli 30, a grafička zavisnost  $1/y$  od  $1/t$  prikazana je na Slici 34.



Tabela 30. Eksperimentalni rezultati ispitivanja ekstrakcije sistema ginko –natkritični ugljendioksid.  
 Uslovi ekstrakcije p=100 bar, T=40°C, d=0,190 mm. Eksperimentalne vrednosti prinosa ekstrakta (y<sub>e</sub>), a izračunate vrednosti po modelu Naika su (y<sub>m</sub>)

No.	t (h)	1/t (h <sup>-1</sup> )	y <sub>e</sub> (% m/m)			1/y			y <sub>m</sub> (% m/m)			$\left  \frac{y_e - y_m}{y_e} \right  100$		
			<b>Protok</b>											
			w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>	w <sub>3</sub>	w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>	w <sub>3</sub>	w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>	w <sub>3</sub>	w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>	w <sub>3</sub>
1.	0,5	2	0,02	0,02	0,14	64,10	47,61	7,14	0,04	0,12	0,30	175,1*	469,23*	116,27*
2.	1	1	0,11	0,10	0,38	9,35	9,43	2,62	0,09	0,23	0,54	19,20	119,93*	41,24*
3.	2	0,5	0,18	0,19	0,88	5,59	5,181	1,14	0,18	0,44	0,89	1,96	130,12*	0,78
4.	3	0,33	0,31	0,55	1,07	3,25	1,788	0,94	0,27	0,63	1,13	13,24	13,78	5,82
5.	4	0,25	0,25	0,83	1,40	3,95	1,193	0,71	0,36	0,81	1,30	42,99	3,19	6,82
6.	5	0,2	0,35	1,14	1,52	2,89	0,874	0,66	0,46	0,97	1,44	32,74	14,96	5,03
7.	6	0,166	0,81	1,17	1,62	1,23	0,853	0,62	0,56	1,11	1,55	31,21	4,37	4,36
8.	7	0,14	0,84	1,40	1,64	1,19	0,709	0,61	0,66	1,25	1,64	21,16	10,83	0,05
9.	8	0,125	1,05	1,65	1,75	0,95	0,603	0,57	0,77	1,38	1,71	26,41	16,55	2,16
10.	9	0,111	1,27	1,81	1,77	0,78	0,550	0,56	0,88	1,50	1,77	30,76	17,39	0,22
11.	10	0,1	1,30	1,76	1,85	0,77	0,567	0,54	1,00	1,60	1,82	23,21	8,60	1,52
12.	11	0,091	1,27	1,80	1,88	0,78	0,553	0,53	1,12	1,71	1,87	12,45	5,33	0,81
13.	12	0,083	1,28	1,93	1,88	0,78	0,515	0,53	1,24	1,80	1,90	3,12	0,70	1,58
14.	13	0,076	1,38	1,86	1,88	0,72	0,535	0,53	1,37	1,89	1,94	1,14	1,65	3,30
15.	14	0,071	1,45	1,88	1,88	0,69	0,530	0,53	1,50	1,98	1,97	3,17	5,14	4,92
16.	15		1,46	1,87	1,87	0,68	0,53	0,53	1,63	2,06	2,00	11,60	9,70	6,54
SRD											18,30	8,63	3,14	

\*- rezultati koji nisu uzeti u obzir pri izračunavanju SRD

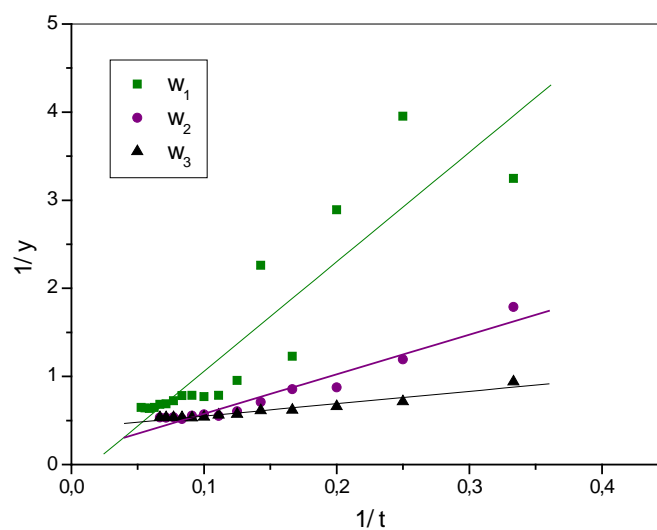
$$SRD = \frac{\sum \left| \frac{y_e - y_m}{y_e} \right| 100}{n}$$

gde je:

y<sub>e</sub> – eksperimentalne vrednosti

y<sub>m</sub> – izračunata vrednost iz model jednačine

n – broj određivanja



Slika 34. Zavisnost recipročne vrednosti prinosa ekstrakta ( $1/y$ ) lišća ginka od recipročne vrednosti vremena ekstrakcije ( $1/t$ )

Jednačine za izračunavanje ukupnog prinosa date su u Tabeli 31, a izračunati parametri jednačine (10) date su u Tabeli 32.

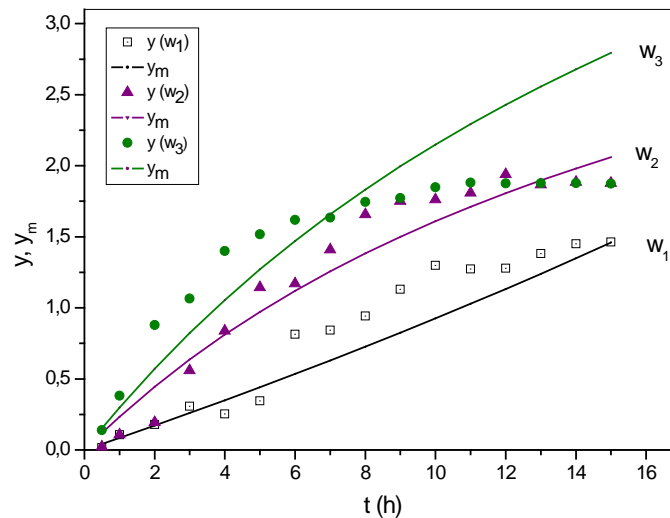
Tabela 31 . Jednačine za izračunavanje prinosa ekstrakta *Ginkgo bilobe* ( $y_m$ ) po modelu Naik-a i sar. u zavisnosti od vremena ekstrakcije, pri različitim protocima ekstragensa

Protok, $w$ (kg/h)	Jednačine	$ r $
$w_1 = 0,095$	$1/y = 28,512 t - 2,715$	0,9397
$w_2 = 0,194$	$1/y = 4,076 t + 0,214$	0,9546
$w_3 = 0,277$	$1/y = 3,217 t + 0,144$	0,9813

Tabela 32. Vrednosti  $y_\infty$  i  $b$ , određene modelovanjem sistema ginko (lišće) – natkritični ugljendioksid (Naik i sar.)

Protok, $w$ (kg/h)	$b$	$y_\infty$	Koeficijent korelacije	Srednja relativna devijacija (%)
0,095	10,029	0,854	0,9095	18,30
0,194	19,075	4,679	0,9148	8,63
0,277	22,424	2,476	0,9741	3,14

Sa slike 35 gde je grafički prikazana zavisnost prinosa ekstrakta ginka (eksperimentalne vrednosti i izračunate po model jednačini) vidi se da model Naika i saradnika nije adekvatan za primenu pri ovim uslovima ekstrakcije.

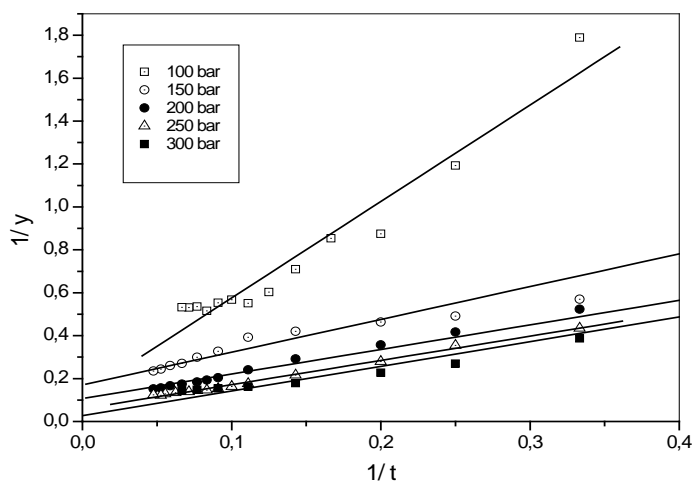


Slika 35. Uticaj protoka natkritičnog ugljendioksida na prinos ekstrakta lišća ginka. Simboli označavaju eksperimentalne vrednosti ( $y$ ). Pune linije odgovaraju vrednostima prinosa izračunatim po model jednačini Naika i sar.

U cilju primene jednačine (13), za modelovanje ekstrakcionog sistema lišće (*Ginkgo biloba*) - natkritični ugljendioksid, određivan je prinos ukupnog ekstrakta tokom 15 sati ekstrakcije natkritičnim ugljendioksidom, na 40 °C, za najmanji stepen usitnjenosti droge  $d_1$ , pri protoku ugljendioksida od 0,194 kg/min, pri različitim pritiscima. Izračunate recipročne vrednosti prinosa i vremena ekstrakcije dati su u Tabeli 33, a na Slici 36 prikazane zavisnosti  $1/y$  od  $1/t$  za različite pritiske.

Tabela 33. Recipročne vrednosti prinosa ekstrakta ( $1/y$ ) u zavisnosti od pritiska

t (h)	1/t (h <sup>-1</sup> )	1/y				
		Pritisak (bar)				
		100	150	200	250	300
0,5	2	47,62	6,09	3,08	2,22	14,99
1	1	9,43	2,53	0,99	1,14	1,20
2	0,5	5,18	1,09	0,64	0,63	0,58
3	0,33	1,79	0,57	0,52	0,434	0,39
4	0,25	1,19	0,49	0,42	0,354	0,27
5	0,2	0,87	0,46	0,36	0,279	0,23
7	0,143	0,71	0,42	0,29	0,216	0,18
9	0,111	0,55	0,39	0,24	0,175	0,16
11	0,091	0,55	0,33	0,20	0,153	0,15
13	0,077	0,54	0,29	0,18	0,144	0,15
15	0,067	0,53	0,27	0,17	0,134	0,14



Slika 36. Zavisnost recipročne vrednosti prinosa ukupnog ekstrakta ( $1/y$ ) od  $1/t$

Na osnovu dobijenih koeficijenta korelacije (Tabela 34) može da se zaključi da je pri svim ispitivanim pritiscima ekstrakcije lišća ginka, osim na 100 bar, dobijena veoma dobra korelacija među veličinama  $1/y$  i  $1/t$ .

U Tabeli 34 dati su izrazi za jednačinu prema kojoj se određuje ukupni prinos ekstrakta lišća ginka ( $y_m$ ) po modelu Naika.

Tabela 34. Jednačine za određivanje prinosa ekstrakta lišća ginka ( $y_m$ ) po model jednačini Naik-a i sar.

p (bar)	Jednačina $1/y = B t + 1/y_\infty$	r
100	$1/y = 4,076 t - 0,214$	0,9148
150	$1/y = 2,920 t - 0,055$	0,9901
200	$1/y = 1,399 t + 0,051$	0,9818
250	$1/y = 1,081 t + 0,065$	0,9998
300	$1/y = 1,118 t + 0,0462$	0,9939

Određeni parametri model jednačine (10) dati su u Tabeli 35, dok je na Slici 37 prikazano pojedinačno slaganje eksperimentalnih i izračunatih vrednosti za prinos ( $y_e$ ,  $y_m$ ) na različitim pritiscima.

Tabela 35. Vrednosti  $y_\infty$  i b u model jednačini Naik-a i sar.

p (bar)	b	$y_\infty$	Koeficijent korelacije	Srednja relativna devijacija (%)
100	19,074	4,679	0,9148	9,79
150	53,089	-18,182	0,9900	37,57
200	27,570	19,701	0,9818	13,86
250	16,509	15,256	0,9998	2,88
300	24,206	21,649	0,9939	9,98

Tabela 35a. Eksperimentalni rezultati ispitivanja ekstrakcije sistema *Ginkgo biloba* –natkritični ugljendioksid.  
 Uslovi ekstrakcije, T=40°C, d=0,190 mm. Eksperimentalne vrednosti prinosa ekstrakta ginka su  $y_e$ , a izračunate vrednosti po modelu Naika su  $y_m$

t (h)	$y_e$ (% , m/m)					$y_m$ (% , m/m)					$\frac{ y_e - y_m }{y_e} \cdot 100$				
	<b>P r i t i s a k ( b a r )</b>														
	100	150	200	250	300	100	150	200	250	300	100	150	200	250	300
0,5	0,02	0,16	0,32	0,45	0,07	0,19	0,17	0,35	0,45	0,44	469,2*	6,25	9,37	0,00	528,5*
1	0,11	0,40	1,00	0,88	0,83	0,23	0,35	0,69	0,87	0,86	109,1*	12,50	31,00	1,14	3,61
2	0,19	0,98	1,57	1,58	1,71	0,44	0,71	1,33	1,65	1,65	131,6*	27,55	15,29	4,43	3,51
3	0,55	1,76	1,91	2,30	2,58	0,63	1,09	1,93	2,35	2,39	14,55	38,07	1,05	2,17	7,36
4	0,84	2,04	2,40	2,82	3,72	0,81	1,48	2,50	2,98	3,07	3,57	27,45	4,17	5,67	17,47
5	1,14	2,16	2,80	3,58	4,40	0,97	1,89	3,02	3,55	3,71	14,91	12,50	7,86	0,84	15,68
7	1,41	2,38	3,44	4,63	5,60	1,25	2,76	3,99	4,54	4,86	11,35	15,97	15,99	1,94	13,21
9	1,81	2,55	4,16	5,68	6,18	1,50	3,72	4,85	5,39	5,87	17,13	45,88	16,59	5,11	5,02
11	1,80	3,06	4,91	6,53	6,47	1,71	4,76	5,62	6,10	6,76	5,00	55,56	14,46	6,58	4,48
13	1,86	3,34	5,44	6,93	6,78	1,89	5,91	6,31	6,72	7,56	1,61	76,95	15,99	3,03	11,50
15	1,87	3,69	5,75	7,45	7,02	2,06	7,18	6,94	7,51	8,28	10,16	94,58	20,70	0,81	17,95
SRD											9,79	37,57	13,86	2,88	9,98

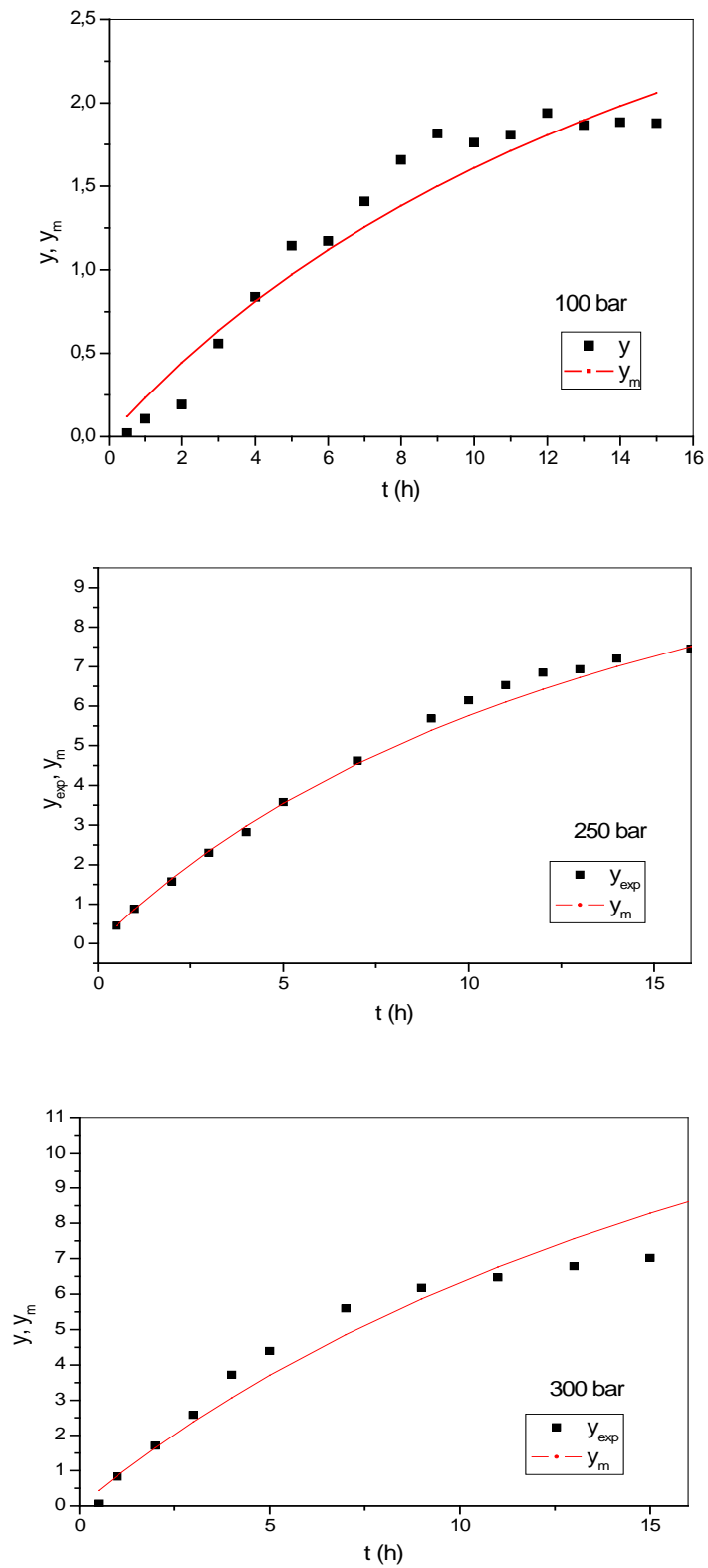
\*- rezultati koji nisu uzeti u obzir pri izračunavanju SRD

$$SRD = \frac{\sum \left| \frac{y_e - y_m}{y_e} \right| \cdot 100}{n}$$

$y_e$  – eksperimentalne vrednosti

$y_m$  – izračunata vrednost iz model jednačine

n – broj određivanja



Slika 37. Grafički prikaz eksperimentalnih i izračunatih vrednosti prinos a preko model jednačine Naika za različite pritiske

Sa Slike 37 uočava se da je slaganje eksperimentalnih podataka i primenjenog modela veoma dobro, posebno na 250 bara, tako da ovaj model, iako je razvijen za ekstrakciju tečnim ugljendioksidom, može da bude primenjen i za ekstrakciju natkritičnim ugljendioksidom, i pri višim pritiscima. Međutim, ono što je uočeno kod ekstrakcije sa tečnim ugljendioksidom, uočava se i kod superkritične ekstrakcije, na svim pritiscima, a to je da se veća odstupanje primenjenog modela od eksperimentalnih podataka javlja nakon dužeg trajanja ekstrakcije, posle 8-10 sati.

### 3.5.2. Primena modifikovane model jednačine Reverchon Sesti-Osseo-a za modelovanje ekstrakcionog sistema ginko-ugljenik (IV)-oksid

Reverchon i Sesti-Osseo ekstrahovali su bosiljak natkritičnim ugljendioksidom, i za modelovanje dobijenih rezultata primenili su bilansnu jednačinu za diferencijalni element ekstraktora ( $dh$ ), za slučaj konstantnih vrednosti protoka i zapreminske mase ugljendioksida. [88].

$$uV \frac{\partial c}{\partial h} + \varepsilon V \frac{\partial c}{\partial t} + (1 - \varepsilon)V \frac{\partial \bar{c}}{\partial t} = 0 \quad (14)$$

$$(1 - \varepsilon)V \frac{\partial \bar{c}}{\partial t} = -A_p K (\bar{c} - \bar{c}^*) \quad (15)$$

Gde su:

$\varepsilon$  – poroznost biljnog materijala

$V$  – zapremina ekstraktora ( $m^3$ )

$c$  – koncentracija ekstraktivnih materija u fluidnoj fazi ( $kg/m^3$ )

$\bar{c}$  - koncentracija ekstraktivnih materija u čvrstoj fazi, odnosno biljnom materijalu ( $kg/m^3$ )

$u$  – brzina fluida, odnosno reagensa ( $m/s$ )

$A_p$  – površina za prenos mase između čestica biljnog materijala i fluida ( $m^2$ )

$K$  – ukupan koeficijent prenosa mase ( $m/s$ )

$\bar{c}^*$  - koncentracija na međufaznoj površini čvrsto-fluid ( $kg/m^3$ )

$h$  – visina sloja biljnog materijala u ekstraktoru ( $m$ )

$t$  – vreme ( $s$ )



Da bi se pojednostavile navedene jednačine, uvode se sledeće pretpostavke:

1. ekstrakcija je uniformna duž ekstraktora, pa se saglasno tome jednačine (14) i (15) mogu napisati u obliku diferencijalnih jednačina
2. Koeficijent slobodne difuzije može da se zanemari u odnosu na koeficijent unutrašnje difuzije, pa se ukupni koeficijent prenosa mase  $K$  svodi na koeficijent unutrašnje difuzije. Izraz  $A_p K / (1-\varepsilon) V$  u jednačini (15) je konstantan i može da bude zamenjen recipročnom vrednošću vremena ( $1/t_i$ ), pri čemu je  $t_i$  vreme unutrašnje difuzije.

Na osnovu usvojenih pretpostavki dobijene su jednačine:

$$\left(\frac{W}{\rho}\right) c + \varepsilon V \frac{dc}{dt} + (1 - \varepsilon) V \frac{d\bar{c}}{dt} = 0 \quad (16)$$

$$\frac{d\bar{c}}{dt} = -\frac{1}{t_i} (\bar{c} - \bar{c}^*) \quad (17)$$

gde je:

$W$ - maseni protok fluida ( $\text{kg/m}^3$ )

$\rho$  – zapreminska masa fluida ( $\text{kg/m}^3$ )

Jednačine 16 i 17 mogu da se reše ako je poznata linearna ravnotežna zavisnost, odnosno ako je  $c = k_p \bar{c}^*$ , pri čemu je  $k_p$  koeficijent ravnotežne raspodele ekstrakta između čvrste i fluidne faze. Za početne uslove  $\bar{c} = \bar{c}_0$  i  $t = t_0$  ( $\bar{c}_0$  – polazna koncentracija u biljnom materijalu), uz zanemarivanje akumulacije ekstrakta u fluidnoj fazi u jednačini (17), dobija se sledeći oblik jednačine:

$$\bar{c} = \bar{c}_0 \exp \left[ \frac{-k_p t}{\frac{(1-\varepsilon)V\rho}{W} + k_p t_i} \right] \quad (18)$$

Uvodeći u jednačinu (18) normalizovan prinos ekstrakta, definisan kao:

$$Y = \frac{\bar{c}_0 - \bar{c}}{\bar{c}_0} 100 \quad (19)$$

Jednačina (18) dobija oblik:

$$Y = 100 \left[ 1 - \exp \frac{-k_p t}{\frac{(1-\varepsilon)V\rho}{W} + k_p t_i} \right] \quad (20)$$

Uz pretpostavku da je  $(1-\varepsilon) \nu \rho / W \ll k_p t_i$ , izraz na levoj strani imenioca u jednačini (20) može da se zanemari, pa je u uprošćenom obliku jednačina (21)

$$Y = 100 \left[ 1 - \exp \left( -\frac{t}{t_i} \right) \right] \quad (21)$$

U slučaju kada je unutrašnja difuzija jedini limitirajući faktor, jednačina (21) može da se koristi kao model jednačina. Međutim, kada difuzija i fazna ravnoteža utiču na brzinu ekstrakcije, oba fenomena se moraju uzeti u obzir, pa se kao model koristi jednačina (18)

Villemaux [VM 46] je prikazao vezu između vremena unutrašnje difuzije ( $t_i$ ) i koeficijenta unutrašnje difuzije ( $D_u$ ) za različite geometrije čestica i predložio relaciju:

$$t_i = \mu^* \frac{l^2}{D_u} \quad (22)$$

gde je:

$\mu^*$  - faktor oblika koji zavisi od geometrije čestice (za sfernu česticu njegova vrednost je 0,6)  
 $l$  - karakteristična geometrijska veličina čestica (m) (za sfernu česticu  $l = d/3$ ,  $d$  - srednji prečnik čestice).

Za modelovanje ekstrakcije sistema lišće ginka- natkritični ugljendioksid upotrebljena je model jednačina Reverchon – Sesti Osseo (21)  $Y=100 [1- \exp (- t/t_i)]$ , ali modifikovana .

Da bi se izbeglo određivanje vremena unutrašnje difuzije jednačina je modifikovana na osnovu pretpostavke da za neke određene sisteme i uslove ekstrakcije,  $t$  može da se aproksimira konstantom, pa se usvajanjem da je

$$Z = -\frac{t}{t_i}, \quad \text{odnosno} \quad -\frac{t}{t_i} = Z = a t + b \quad (24)$$

$t$  -vreme ekstrakcije (h)

$t_i$  - vreme unutrašnje difuzije

$$\text{gde je } Z \text{ je definisano kao} \quad Z = \ln \left( 1 - \frac{Y}{100} \right) \quad (25)$$

$Y$  - normalizovan prinos ekstrakcije (%) definisan kao

$$Y = \frac{y}{y_{max}} \cdot 100 \quad (26)$$

$y_{max}$  - prinos ekstrakta na kraju ekstrakcije (g/100 g droge)

$y$  -prinos ekstrakta posle vremena ekstrakcije  $t$  (h)

dobija jednačina:

$$Y=100[1-\exp (a t + b)] \quad (27)$$

Konstante  $a$  i  $b$  u jednačini (26) se određuju na osnovu eksperimentalnih podataka.

Ovako modifikovana jednačina Reverchon –Sesti Osseo korišćena je uspešno za modelovanje različitih ekstrakcionih sistema [78-80], te je i za modelovanje ekstrakcionog sistema lišće ginka – natkritični ugljendioksid izabrana ova modifikovana model jednačina Reverchon – Sesti Osseo  $Y=100 [1-\exp(at + b)]$ .

### Uticaj stepena usitnjenosti droge na prinos ekstrakcije

U cilju primene modifikovane jednačine  $Y=100[1-\exp (a t + b)]$  za modelovanje datog sistema ginko (lišće) - natkritični ugljendioksid, pri različitom stepenu usitnjenosti biljnog materijala ( $d_1=0,190\text{mm}$ ,  $d_2=0,467\text{mm}$ ,  $d_3=1,009\text{ mm}$ ) izračunate su, na osnovu eksperimentalnih rezultata, vrednosti normalizovanog prinosa  $Y$  (za ukupni prinos ekstrakta), a zatim i odgovarajuće vrednosti  $Z$  primenom jednačine  $Z =\ln (1-Y/100)$  i date u Tabeli 36.

Na osnovu zavisnosti  $Z$  od vremena ( $Z=a t + b$ ) (Slika 38) određeni su parametri  $a$  i  $b$  i dati u Tabeli 37, a na osnovu tako određenih parametara dobijene su modifikovane model jednačine za izračunavanje normalizovanog prinosa,  $Y_m^*$ , (Tabela 38) odnosno prinosa ekstrakcije  $y_m$ . Dobijeni rezultati su takođe dati u Tabeli 36.

Tabela 36. Eksperimentalne ( $y_e$ ) i računске vrednosti ( $Y$ ,  $y_m$ ) prinosa ekstrakcije ( $y_m$ ) po model jednačini ( $y_m$ ) u zavisnosti od stepena usitnjenosti

Tabela 36.1

t (h)	$d_1$					
	$y_e$	$Y$	$Z$	$Y_m^*$	$y_m$	$\left  \frac{y_e - y_m}{y_e} \right  100$
0,5	0,02	1,12	-0,01	-104,46	-1,96	9451,43*
1	0,11	5,64	-0,06	-65,13	-1,22	1255,16*
2	0,19	10,27	-0,11	-7,72	-0,15	175,16*
3	0,56	29,73	-0,35	29,74	0,56	0,01
4	0,84	44,57	-0,59	54,17	1,02	21,52
5	1,14	60,80	-0,94	70,10	1,32	15,30
6	1,17	62,29	-0,98	80,50	1,51	29,24
7	1,41	74,95	-1,38	87,28	1,64	16,45
8	1,66	88,14	-2,13	91,70	1,72	4,04
9	1,82	96,60	-3,38	94,59	1,78	2,08
10	1,76	93,67	-2,76	96,47	1,81	2,99
11	1,81	96,17	-3,26	97,70	1,84	1,59
12	1,93	96,81	-3,44	98,50	1,85	1,74
13	1,93	99,26	-4,90	99,02	1,86	0,24
14	1,87	99,89	-6,85	99,36	1,87	0,53
15	1,88	100,00		99,58	1,87	0,42
SRD						7,40

\*vrednosti koje nisu uzete za izračunavanje SRD

Tabela 36.2

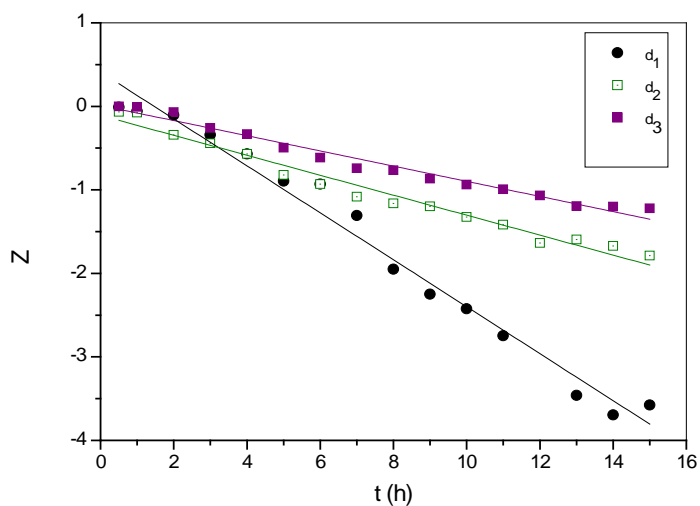
t (h)	d <sub>2</sub>					
	y <sub>e</sub>	Y	Z	Y <sub>m</sub> *	y <sub>m</sub>	$\left  \frac{y_e - y_m}{y_e} \right  100$
0,5	0,09	6,46	-0,07	-12,96	-0,19	311,11*
1	0,11	7,14	-0,07	-3,9	-0,06	154,55*
2	0,43	28,89	-0,35	12,09	0,18	58,14*
3	0,54	35,76	-0,44	25,63	0,38	29,63
4	0,65	43,37	-0,57	37,08	0,55	15,38
5	0,84	56,05	-0,82	46,77	0,69	17,85
6	0,91	60,65	-0,93	54,97	0,82	9,89
7	0,99	66,12	-1,08	61,90	0,92	7,07
8	1,03	68,72	-1,16	67,76	1,01	1,94
9	1,05	69,79	-1,19	72,73	1,08	2,86
10	1,10	73,46	-1,32	76,93	1,14	3,64
11	1,13	75,73	-1,41	80,48	1,19	5,31
12	1,21	80,53	-1,64	83,48	1,24	2,48
13	1,19	79,73	-1,59	86,03	1,28	7,56
14	1,22	81,20	-1,67	88,18	1,31	7,38
15	1,25	83,27	-1,79	89,99	1,34	7,20
SRD						8,77

\*vrednosti koje nisu uzete za izračunavanje SRD

Tabela 36.3

t (h)	d <sub>3</sub>					
	y <sub>e</sub>	Y	Z	Y <sub>m</sub> *	y <sub>m</sub>	$\left  \frac{y_e - y_m}{y_e} \right  100$
0,5	0,001	0,08	-0,001	-37,15	-0,64	64100*
1	0,01	0,64	-0,006	-6,73	-0,46	6100*
2	0,11	6,58	-0,07	-8,22	-0,14	227,27*
3	0,39	22,86	-0,26	7,60	0,13	66,67
4	0,49	28,31	-0,33	21,10	0,37	24,49
5	0,68	39,07	-0,49	32,63	0,57	16,18
6	0,79	45,84	-0,61	42,47	0,74	6,33
7	0,91	52,32	-0,74	50,88	0,88	3,30
8	0,93	53,46	-0,76	58,06	1,01	8,60
9	1,01	57,89	-0,86	64,19	1,12	10,89
10	1,06	60,83	-0,94	69,42	1,21	14,15
11	1,09	62,99	-0,99	73,89	1,28	17,43
12	1,14	65,57	1,07	77,70	1,35	18,42
13	1,21	69,76	1,19	80,96	1,41	16,53
14	1,22	69,93	-1,22	83,74	1,46	19,67
15	1,23	70,51	-1,22	86,12	1,49	21,14
SRD						11,07

\*vrednosti koje nisu uzete za izračunavanje



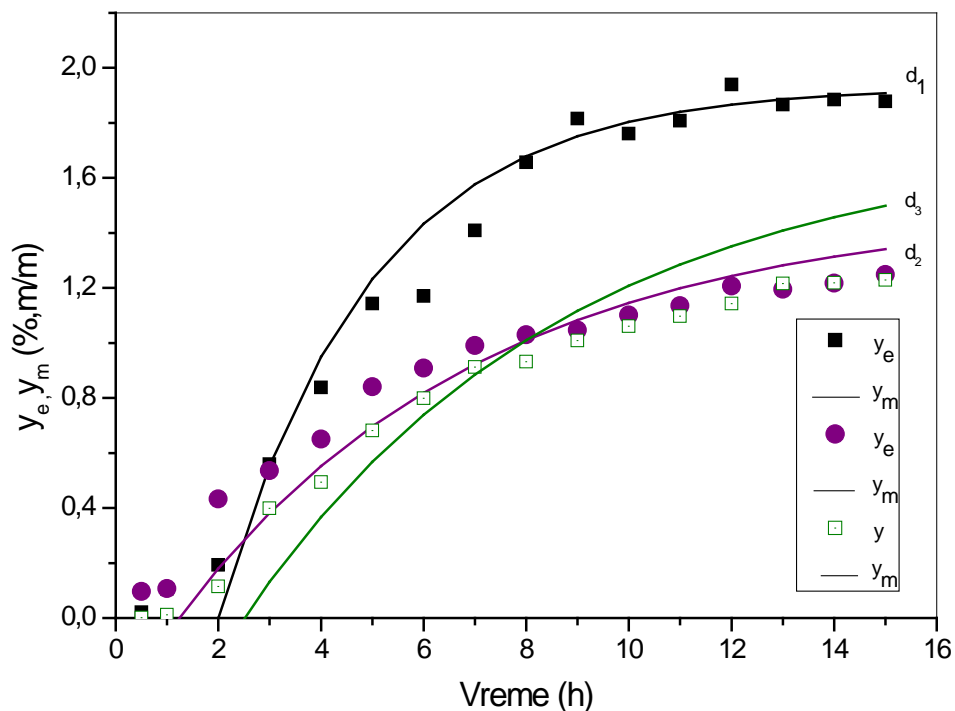
Slika 38 . Zavisnost Z od vremena prema jednačini ( $Z=a t + b$ )

Tabela 37. Vrednosti parametara a i b u jednačini za dati stepen usitnjenosti čestice

Srednji prečnik čestice (mm)	a	b	r
$d_1=0,190$	-0,339	0,679	0,9468
$d_2=0,467$	-0,167	0,205	0,7905
$d_3=1,009$	-0,158	0,395	0,9094

Tabela 38. Modifikovani oblik jednačine Reverchon-Sesti Osseo-a

Srednji prečnik čestice (mm)	$Y_{m=100} [1-\exp (a t + b)]$	r	SD
$d_1=0,190$	$Y_{m=100} [1-\exp(-0,339 t + 0,679)]$	0,9468	0,61643
$d_2=0,467$	$Y_{m=100} [1-\exp(-0,167 t + 0,205)]$	0,7905	0,81955
$d_3=1,009$	$Y_{m=100} [1-\exp(-0,158 t + 0,395)]$	0,9094	0,44273



Slika 39. Uticaj stepena usitnjenosti droge na prinos ekstrakcije. Simboli označavaju eksperimentalne vrednosti prinosa ( $y_e$ ), pune linije označavaju vrednosti prinosa model jednačine ( $y_m$ )

### Uticaj protoka na prinos ekstrakata

Modelovanje ekstrakcionog sistema lišće *Ginkgo biloba* – natkritični ugljendioksid izvršeno je u zavisnosti od protoka ekstragensa.

U cilju primene modifikovane jednačine  $Y=100[1-\exp(-a \cdot t + b)]$  za modelovanje datog sistema ginko (lišće) - natkritični ugljendioksid pri različitim protocima izračunate su, na osnovu eksperimentalnih rezultata, vrednosti normalizovanog prinosa  $Y$  (za ukupni prinos ekstrakta), a zatim i odgovarajuće vrednosti  $Z$  primenom jednačine  $Z = \ln(1 - Y/100)$  i dati u Tabeli 39.

Na osnovu zavisnosti  $Z$  od vremena ( $Z = a \cdot t + b$ ) (Slika 40) određeni su parametri  $a$  i  $b$  i dati u Tabeli 40, a na osnovu tako određenih parametara dobijene su modifikovane model jednačine za izračunavanje normalizovanog prinosa,  $Y_m$ , (Tabela 41) odnosno prinosa ekstrakcije  $y_m$ . Dobijeni rezultati su takođe dati u Tabeli 39.

Tabela 39. Eksperimentalne ( $y_e$ ) i računске vrednosti normalizovanog prinosa  $Y_m^*$  i prinosa ekstrakcije po model jednačini ( $y_m$ ) u zavisnosti od protoka

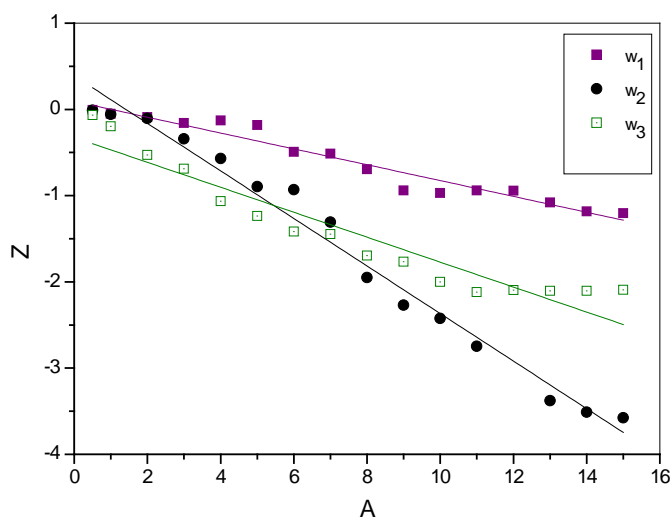
t (h)	$W_1 = 0,095 \text{ kg/h}$					
	$y_e$	Y	Z	$Y_m^*$	$y_m$	$\left  \frac{y_e - y_m}{y_e} \right $
0,5	0,016	0,74	0,007	-4,86	-0,10	15,68*
1	0,11	5,11	-0,05	-0,37	-0,007	106,36*
2	0,18	8,55	-0,09	8,033	0,17	5,56
3	0,31	14,72	-0,16	15,74	0,32	3,23
4	0,25	12,09	-0,13	22,79	0,47	64,00
5	0,35	16,53	-0,18	29,26	0,61	74,29
6	0,81	38,91	-0,49	35,18	0,73	9,88
7	0,85	16,35	-0,18	40,62	0,84	1,18
8	1,05	50,09	-0,69	45,59	0,95	9,52
9	1,27	60,89	-0,94	50,15	1,05	17,32
10	1,29	62,04	-0,97	54,32	1,13	12,40
11	1,27	60,89	-0,94	58,15	1,21	4,72
12	1,27	61,09	-0,94	61,65	1,28	0,79
13	1,38	66,01	-1,08	64,87	1,35	0,72
14	1,45	69,36	-1,18	67,81	1,41	2,41
15	1,46	69,98	-1,20	70,51	1,47	0,68
SRD						13,16

\*vrednosti koje nisu uzete za izračunavanje RSD

t (h)	$W_2 = 0,194 \text{ kg/h}$					
	$y_e$	Y	Z	$Y_m^*$	$y_m$	$\left  \frac{y_e - y_m}{y_e} \right $
0,5	0,02	1,09	-0,01	-66,42	-1,28	6500*
1	0,11	5,48	-0,06	-40,48	-0,78	809,09*
2	0,19	9,99	-0,11	-0,099	0,0019	101
3	0,56	28,93	-0,34	28,67	0,55	1,79
4	0,84	43,37	-0,57	49,18	0,95	11,65
5	1,14	59,16	-0,89	63,78	1,23	7,52
6	1,17	60,61	-0,93	74,19	1,43	22,22
7	1,41	72,93	-1,31	81,61	1,57	11,35
8	1,66	85,76	-1,95	86,89	1,67	0,609
9	1,82	93,99	-2,81	90,66	1,75	11,35
10	1,76	91,15	-2,42	93,34	1,80	2,27
11	1,81	93,58	-2,75	95,26	1,84	0,60
12	1,93	95,18	-3,03	96,62	1,87	3,11
13	1,93	96,58	-3,37	97,59	1,88	7,00
14	1,87	97,52	-3,69	98,28	1,89	1,07
15	1,88	97,20	-3,58	98,77	1,91	2,27
RSD						49,28

t (h)	$W_3 = 0,277 \text{ kg/h}$					
	$y_e$	Y	Z	$Y_m^*$	$y_m$	$\left  \frac{y_e - y_m}{y_e} \right $
0,5	0,14	7,45	-0,08	-36,65	-0,69	592,10 <sup>*</sup>
1	0,38	20,32	-0,23	-8,18	-0,15	140,28 <sup>*</sup>
2	0,88	46,76	-0,63	32,19	0,61	31,16 <sup>*</sup>
3	1,06	56,65	-0,84	57,49	1,08	1,49
4	1,4	74,47	-1,37	73,36	1,38	1,49
5	1,15	80,69	-1,64	83,30	1,57	3,23
6	1,61	86,12	-1,97	89,53	1,68	3,97
7	1,63	86,97	-2,04	93,44	1,76	7,44
8	1,74	92,87	-2,64	95,89	1,80	3,25
9	1,77	94,31	-2,87	97,42	1,83	3,30
10	1,84	98,35	-4,11	98,38	1,85	0,03
11	1,88	100,05	-6,85	98,99	1,86	0,91
12	1,88	99,73	-5,93	99,37	1,87	0,37
13	1,88	99,84	-6,44	99,60	1,87	0,24
14	1,88	99,84	-6,44	99,75	1,88	0,09
15	1,88	99,68	-5,75	99,84	1,88	0,16
					SRD	4,41

\*vrednosti koje nisu uzete za izračunavanje RSD



Slika 38. Zavisnost Z od vremena prema jednačini



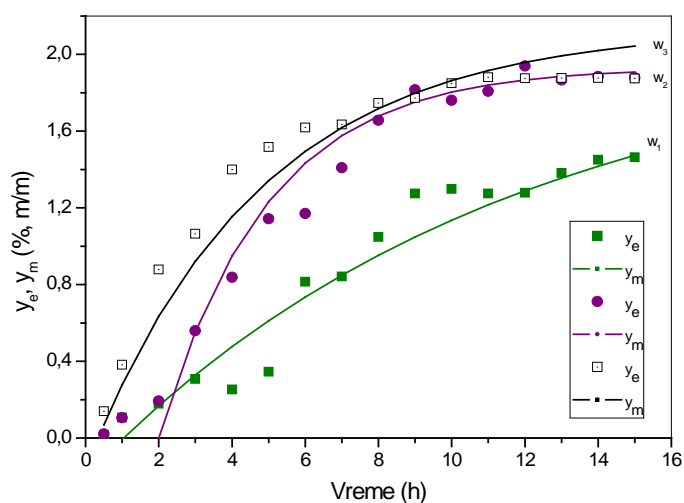
Tabela 40. Vrednosti parametara a i b u jednačini  $Z=a t + b$

Protok, w (kg/h)	a	b	r
$w_1 = 0,095$	-0.087	0.091	0.9695
$w_2 = 0,194$	-0.339	0.679	0.9468
$w_3 = 0,277$	-0.212	0.073	0.8729

Tabela 41. Modifikovani oblici jednačine Reverchon-Sesti Osseo za izračunavanje normalizovanog prinosa ekstrakcije ginka za različite protoke

Protok, w (kg/h)	$Y_{m=100} [1-\exp(a t + b)]$	r	SD
$w_1 = 0,095$	$Y_{m=100} [1-\exp(-0.087 t + 0.091)]$	0.9695	0.13989
$w_2 = 0,194$	$Y_{m=100} [1-\exp(-0.339 t + 0.679)]$	0.9468	0.061643
$w_3 = 0,277$	$Y_{m=100} [1-\exp(-0.212 t + 0.073)]$	0.8729	0.070367

SD-standardna devijacija



Slika 40. Uticaj protoka na prinosa ekstrakcije. Simboli označavaju eksperimentalne vrednosti ( $y_e$ ), pune linije odgovaraju vrednostima prinosa na osnovu model jednačine

## Uticaj pritiska na prinos ekstrakata

Kako je pritisak značajan parametar za ekstrakciju, izvršeno je modelovanje eksperimentalnih rezultata ekstrakcije ginka natkritičnim CO<sub>2</sub> u zavisnosti od pritiska.

U cilju primene modifikovane jednačine  $Y=100[1-\exp(a t + b)]$  za modelovanje datog sistema izračunate su, na osnovu eksperimentalnih rezultata, vrednosti normalizovanog prinosa  $Y$  (za ukupni prinos ekstrakta), a zatim i odgovarajuće vrednosti  $Z$  primenom jednačine  $Z = \ln(1-Y/100)$  i dati u Tabeli 42.

Na osnovu zavisnosti  $Z$  od vremena ( $Z = a t + b$ ) (Slika 41) određeni su parametri  $a$  i  $b$  i dati u Tabeli 43, a na osnovu tako određenih parametara dobijene su modifikovane model jednačine za izračunavanje normalizovanog prinosa,  $Y_m$ , (Tabela 44) odnosno prinosa ekstrakcije  $y_m$ . Dobijeni vrednosti za  $Y_m$  i  $y_m$  su takođe dati u Tabeli 42.

Tabela 42. Eksperimentalne ( $y_e$ ) i računске vrednosti ( $Y_m$ ,  $y_m$ ) prinosa ekstrakcije po model jednačini ( $y_m$ ) u zavisnosti pritiska

Tabela 42.1

t (h)	100 bar					
	$y_e$	$Y$	$Z$	$Y_m^*$	$y_m$	$\left  \frac{y_e - y_m}{y_e} \right  100$
0,5	0,02	1,087	-0,01	-66,42	-1,28	6500*
1	0,11	5,48	-0,06	-40,48	-0,78	809,4*
2	0,19	9,98	-0,10	-0,099	-0,002	101*
3	0,56	28,93	-0,34	28,67	0,55	1,79
4	0,84	43,37	-0,57	49,17	0,95	11,65
5	1,14	59,16	-0,89	63,78	1,23	7,52
7	1,17	60,61	-0,93	74,19	1,43	22,22
9	1,41	72,93	-1,30	81,61	1,57	11,35
11	1,66	85,76	-1,95	86,89	1,67	0,60
13	1,82	93,99	-2,81	90,66	1,75	7,00
15	1,76	91,15	-2,42	93,34	1,80	2,27
SRD						6,32

\*vrednosti koje nisu uzete za izračunavanje SRD

Tabela 42.2

t (h)	150 bar					
	$y_e$	Y	Z	Ym*	$y_m$	$\left  \frac{y_e - y_m}{y_e} \right  100$
0,5	0,16	3,64	-0,04	2,06	0,092	42,50*
1	0,39	8,78	-0,09	7,93	0,35	10,26
2	0,98	21,84	-0,25	18,61	0,83	15,31
3	1,75	39,04	-0,49	28,06	1,26	28,00
4	2,04	45,33	-0,60	36,41	1,63	20,40
5	2,16	48,05	-0,65	43,79	1,96	9,26
7	2,38	52,89	-0,75	56,09	2,52	5,88
9	2,55	56,72	-0,84	65,69	2,95	15,69
11	3,06	67,98	-1,14	73,19	3,29	7,52
13	3,33	74,18	-1,35	79,06	3,55	6,61
15	3,69	82,08	-1,72	83,64	3,76	1,90
21	4,24	94,47	-2,89	92,19	4,14	2,36
SRD						12,06

\*vrednosti koje nisu uzete za izračunavanje SRD

Tabela 42.3

t (h)	200 bar					
	$y_e$	Y	Z	Ym*	$y_m$	$\left  \frac{y_e - y_m}{y_e} \right  100$
0,5	0,32	4,767	-0,049	-12,80	-0,87	371,88*
1	1,00	14,72	-0,16	-4,55	-0,31	131*
2	1,57	23,08	-0,26	10,18	0,69	56,05
3	1,91	28,15	-0,33	22,84	1,55	18,85
4	2,39	35,28	-0,43	33,71	2,29	4,18
5	2,82	41,23	-0,53	43,05	2,92	3,55
7	3,43	50,54	-0,70	57,97	3,94	14,87
9	4,16	61,27	-0,95	68,98	4,68	12,50
11	4,91	72,21	-1,28	77,11	5,24	6,72
13	5,44	80,11	-1,61	83,101	5,65	3,86
15	5,75	84,57	-1,87	87,53	5,95	3,48
SRD						6,72

\*vrednosti koje nisu uzete za izračunavanje SRD

Tabela 42.4

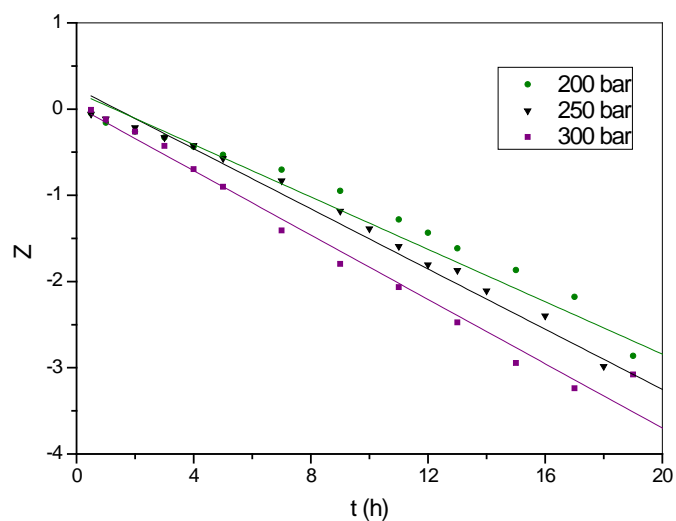
t (h)	250 bar					
	$y_e$	Y	Z	Ym*	$y_m$	$\left  \frac{y_e - y_m}{y_e} \right  100$
0,5	0,45	5,49	-0,06	-16,42	-1,34	397,78*
1	0,87	10,67	-0,11	-6,69	-0,54	162,07*
2	1,58	19,26	-0,21	10,39	0,85	46,20*
3	2,30	28,08	-0,33	24,74	2,03	11,74
4	2,82	34,36	-0,42	36,79	3,01	6,74
5	3,57	43,64	-0,57	46,91	3,84	7,68
7	4,62	56,42	-0,83	62,55	5,12	10,82
9	5,68	69,33	-1,18	73,58	6,03	6,16
11	6,53	79,66	-1,59	81,36	6,66	1,99
13	6,93	84,59	-1,87	86,85	7,12	2,74
16	7,45	90,89	-2,39	92,21	7,55	1,34
SRD						5,42

\*vrednosti koje nisu uzete za izračunavanje RSD

Tabela 42.5

t (h)	300 bar					
	$y_e$	Y	Z	Ym*	$y_m$	$\left  \frac{y_e - y_m}{y_e} \right  100$
0,5	0,0667	0,90	-0,009	5,95	0,44	559,67*
1	0,83	11,21	-0,12	14,33	1,06	27,71*
2	1,70	23,04	-0,26	28,91	2,14	25,88*
3	2,58	34,85	-0,43	41,01	3,03	17,44
4	3,72	50,21	-0,69	51,05	3,77	1,34
5	4,39	59,36	-0,90	59,38	4,39	0
7	5,59	75,53	-1,41	72,03	5,33	4,64
9	6,18	83,42	-1,79	80,74	5,97	3,40
11	6,47	87,33	-2,06	86,74	6,42	0,77
13	6,78	91,57	-2,47	90,87	6,72	0,88
15	7,02	94,74	-2,94	93,71	6,93	1,28
SRD						7,18

\*vrednosti koje nisu uzete za izračunavanje RSD



Slika 41. Zavisnost Z od vremena

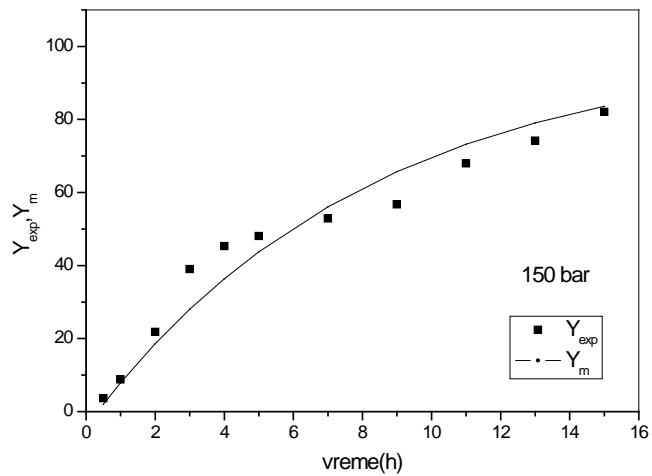
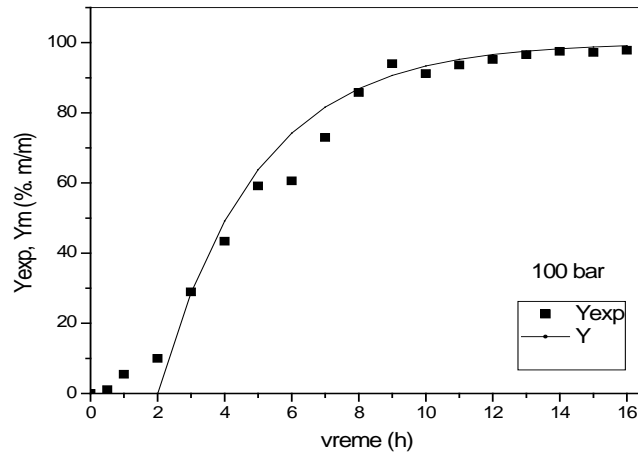
Tabela 43. Vrednosti parametara a i b u jednačini  $Z = a t + b$

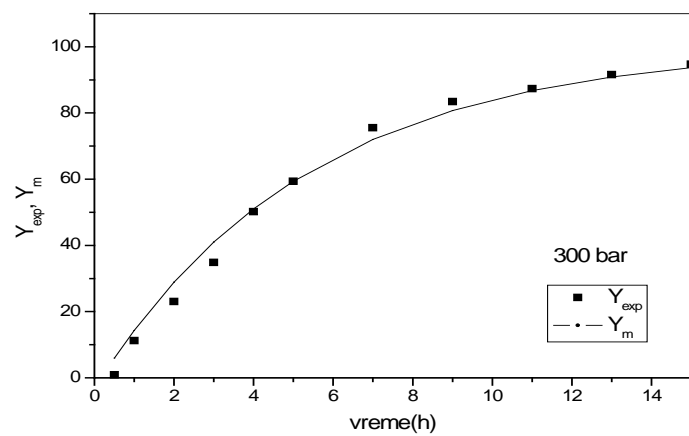
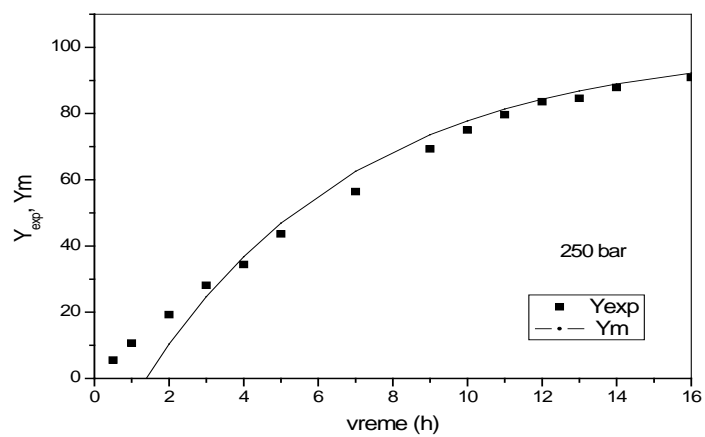
Pritisak (bar)	$Z = a t + b$		
	a	b	r
100	-0,339	0,679	0,9468
150	-0,123	0,041	0,9821
200	-0,152	0,196	0,9756
250	-0,175	0,239	0,9884
300	-0.186	0.032	0.9932

Na osnovu dobijenih vrednosti koeficijenta korelacije (r) kod ekstrakcije na pritiscima od 150-300 bar može da se zaključi da postoji vrlo visoka linearna zavisnost izmedju veličine Y i vremena ekstrakcije (t).

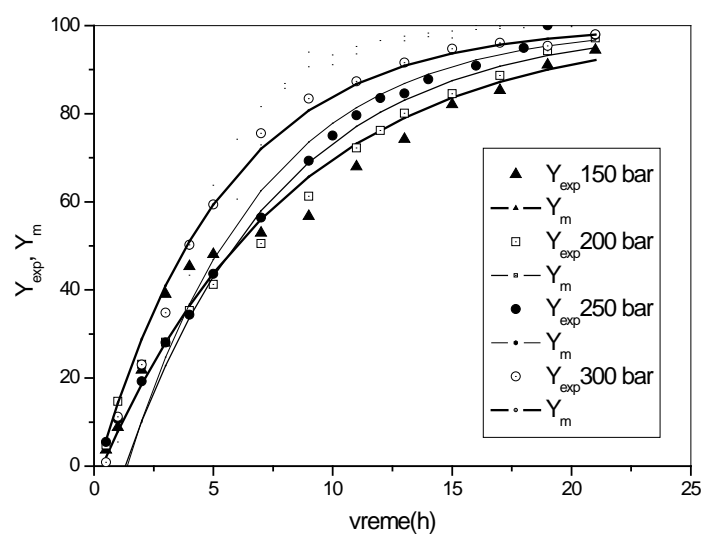
Tabela 44. Modifikovana model jednačina za izračunavanje normalizovanog prinosa ( $Y_m$ ) ekstrakcije

Pressure (bar)	$Y_{m=100} [1-\exp(a t + b)]$	r	SD
100	$Y_{m=100} [1-\exp(-0,339 t + 0,679)]$	0,9468	0,6164
150	$Y_{m=100} [1-\exp(-0,123 t + 0,041)]$	0,9821	0,1715
200	$Y_{m=100} [1-\exp(-0,152 t + 0,196)]$	0,9756	0,2393
250	$Y_{m=100} [1-\exp(-0,175 t + 0,239)]$	0,9884	0,1752
300	$Y_{m=100} [1-\exp(-0,186t + 0,032)]$	0,99319	0,1586

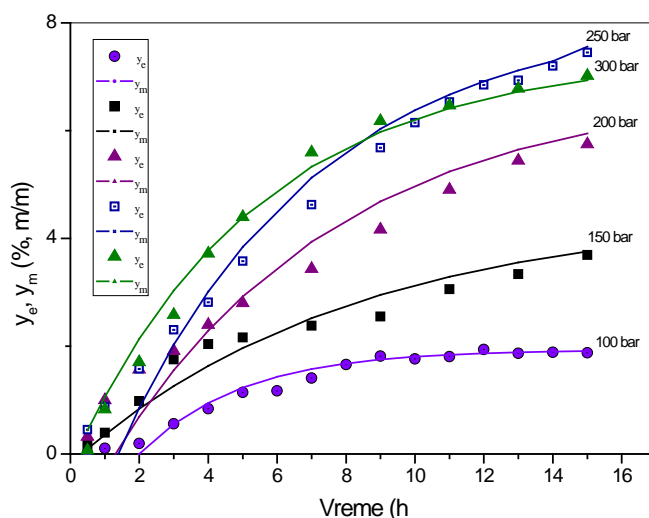




Slika 42. Rezultati fitovanja normalizovanog prinosa ekstrakcije tokom pri izotermnom postupku (40°C)



Slika 43. Rezultati fitovanja normalizovanog prinosa ekstrakcije pri izotermnom pritisku (40°C)



Slika 44. Uticaj pritiska na prinos ekstrakcije lišća ginka pri izotermnom postupku (40°C). Simboli označavaju eksperimentalne vrednosti ( $y_e$ ), pune linije odgovaraju vrednostima prinosa prema model jednačini

Kao zaključak može se reći da jednačina modifikovanog modela Reverchon Sesti-Osseo dobro fituje eksperimentalne podatke, posebno na višim pritiscima, dok na nižim pritiscima dolazi do odstupanja u početnim vremenima ekstrakcije.

### 3.5.3. Modelovanje ekstrakcije lišća ginka primenom modela koji je predložila Sovová

Model koji je predložila Sovová posmatra klipno proticanje natkritičnog rastvarača kroz fiksiran sloj mlevenog biljnog materijala. Ovaj model predpostavlja da je punjenje homogeno i izotropno i da je rastvorljiv materijal jednako rastvoran u sirovom biljnom materijalu. Duž kolone je distribucija čestica po veličini, temperatura i pritisak su konstantni, a pad pritiska je zanemarljiv [75].

Osnovna postavka modela je da deo ćelija (hipotetičkih jedinica u kojima je sadržana rastvorljiva supstanca) otvoren ili razoren mlevenjem polaznog materijala, kojim se omogućava bolji kontakt između rastvorka i rastvarača. Posle usitnjavanja veliki udeo rastvorka postane slobodan za kontakt sa rastvaračem, ali neke ćelije ostaju nedirnute sa rastvorkom unutar ćelije. Zasnovano na razrušenim, sa lako dostupnim rastvorkom, i



nedirnutim nerazorenim ćelijama u kojima se nalazi teže dostupni rastvorak, Sovova je prepostavila model u kome se rastvorak deli na dve frakcije

Prenos mase iz čvrstog matriksa do površine određen je koeficijentom unutrašnjeg prenosa mase ( $k_s$ ), dok je prenos mase od površine do fluida određen koeficijentom prenosa mase u tečnoj fazi ( $k_f$ ).

U ukupni otpor prenosu mase uključeni su otpori prenosu mase u filmu rastvarača koji okružuju česticu (određuje brzinu ekstrakcije lako dostupnog rastvorka), i u unutrašnjosti čestice (određuje brzina prenosa mase vezanog rastvorka). Brzina ekstrakcije vezanog rastvorka ( $\bar{c}_s < c_k$ ) proporcionalna je koeficijentu prenosa mase u čvrstoj fazi  $k_s$  i srednjoj rezidualnoj koncentraciji rastvorka u materijalu  $\bar{c}_s$ . Otpor prenosu mase u filmu natkritičnog fluida Sovová (Sovova 1994, BB 79) je uključila uvođenjem faktora  $(1 - c_f/c_{sat})$  u izraz za fluks prenosa mase  $J$ :

$$J = k_f(c_{sat} - c_f) \quad \text{za } (c_o > \bar{c}_s > c_k)$$

$$J = k_s \left(1 - \frac{c_f}{c_{sat}}\right) \bar{c}_s \quad \text{za } (\bar{c}_s - c_k)$$

Lako dostupne supstance iz razorenih biljnih ćelija prvo se ekstrahuju, a zatim sledi sporija ekstrakcija iz usitnjavanjem nedirnutih - netaknutih ćelija. Tok ekstrakcije može da se подели u tri perioda: brz period, prelazni i spor period. U početnom periodu, ekstrakcija se odvija konstantnom brzinom, koja je određena otporom filma natkritičnog fluida. U toku brzog perioda brzina ekstrakcije limitirana je rastvorljivošću lako dostupne materije. Na kraju ovog perioda čestice biljnog materijala na mestu ulaza fluida u ekstraktor (položaj najbrže ekstrakcije pri klipnom toku) ostaju bez lako dostupnog (slobodnog) rastvorka. Međutim rastvorak koji je smešten dublje u unutrašnjosti čestica još uvek ostaje prisutan u ovim česticama i u prelaznom periodu, počinje njegova ekstrakcija. U toku prelaznog perioda, slobodni rastvorak se uklanja sa površine svih ostalih čestica, odnosno i ostale čestice postaju delimično iscrpljene. Zona u kojoj su čestice oslobođene rastvorka pomera se u pravcu toka fluida i napreduju kao front iscrpljivanja, ispred koga se nalaze čestice sa slobodnim rastvorkom. Na početku trećeg ekstrakcionog perioda, kada je celokupna količina dostupnog rastvorka iscrpljena, u svim česticama je prisutan samo „vezan“ rastvorak, odnosno rastvorak koji je smešten dublje u unutrašnjosti čestice. Nastupa spori period ekstrakcije, gde ukupnu brzinu ekstrakcije određuje difuzija unutar čestice. Količine ekstrakata ukupne mase biljne sirovine koje se ekstrahuju tokom prvog, drugog i trećeg ekstrakcionog perioda je predstavljeni su u funkciji specifične potrošnje rastvarača  $q$  kao:

$$\begin{aligned}
& qy^*[1-\exp(-Z)] && q < q_m \\
e = \{ & [y^* - q_m \exp(z_w - Z)] && q_m \leq q < q_n \\
& x_0 - \left(\frac{y^*}{W}\right) \ln \left(1 + \left[\exp\left(\frac{Wx_0}{y^*}\right) - 1\right] \exp\left[W(q_m - q)\frac{x_k}{x_0}\right]\right) && q > q_n
\end{aligned}
\tag{28}$$

Polazne koncentracija lako dostupnog ulja (ekstrakta) u razorenim ćelijama materijala je  $(x_0 - x_k)$ , a početna koncentracija ulja (ekstrakta) unutar nerazorenih čestica materijala je  $x_k$ .

Veličina  $x_k$  može da se objasni na sledeći način: kada pri iscrpljivanju biljnog materijala lako dostupnog rastvorka, masa rastvorljivih supstanci po masi nerastvorljive čvrste faze opadne na vrednost  $x_k$ , menja se mehanizam prenosa mase. Smatra se da je početna masa ekstrakta dostupna u čvrstoj fazi jednaka asimptotskoj vrednosti mase ekstrakta  $m_{e\infty}$ . Ako je  $y_\infty$  asimptotski prinos tada je

$$x_0 = \frac{m_{e\infty}}{m_0 - m_{e\infty}} = \frac{y_\infty}{1 - y_\infty} \tag{29}$$

Količina rastvarača  $q_m$  i  $q_i$ , koje definišu prelazni režim između perioda brze i spore ekstrakcije, izračunavaju se iz jednačine (30) i (31).  $Z_w$ , koja predstavlja presek sloja u kome je koncentracija rastvorka –ulja jednaka  $x_k$ , izračunava se iz izraza (32)

$$q_m = \frac{(x_0 - x_k)}{y^* Z} \tag{30}$$

$$q_n = q_m + \frac{1}{W} \ln \left[ \frac{x_k + (x_0 - x_k) \exp\left(\frac{Wx_0}{y^*}\right)}{x_0} \right] \tag{31}$$

$$\frac{Z_w}{Z} = \frac{y^*}{Wx_0} \ln \left[ \frac{x_0 \exp [W(q - q_m)] - x_k}{x_0 - x_k} \right] \tag{32}$$

Parametar  $Z$  je direktno proporcionalan koeficijentu prenosa mase u fazi rastvarača, a obrnuto proporcionalan specifišnom protoku rastvarača  $\dot{q}$ :

$$Z = \frac{k_f a \rho}{\dot{q}(1-\varepsilon)\rho_s} = \frac{F}{\dot{q}} \quad (33)$$

Parametar  $W$  je direktno proporcionalan koeficijentu prenosa mase u čvrstoj fazi, a obrnuto proporcionala specifičnom protoku rastvarača:

$$W = \frac{k_s a}{\dot{q}(1-\varepsilon)} = \frac{S}{\dot{q}} \quad (34)$$

Vrednost specifičnog protoka rastvarača  $\dot{q}$  je poznata, kao i polazna koncentracija ekstrakta u materijalu  $x_o$  i rastvorljivost ekstrakta  $y^*$ . Parametri  $x_k$ ,  $F$ ,  $S$  se optimizuju prema sledećem kriterijumu:

$$\text{SSE} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m (e_{exp,j} - e(q_i))^2$$

Parametri  $Z, W$  i  $x_k$  podešeni su i određeni minimiziranjem greške između eksperimentalnih podataka i izračinatih vrednosti za prinos. Greške su kvantifikovane definisanjem prosečne apsolutne relativne devijacije (AARD)

$$\text{AARD} (\%) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{y_i - y_{mod,i}}{y_i} \right| 100 \quad (35)$$

$$\text{SD} (\%) = 100 \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_i - y_{mod,i})^2}{n-1}} \quad (36)$$

gde je  $n$  broj eksperimentalnih tačaka,  $y_i$  je prinos određen eksperimentom u tački  $i$ , a  $y_{mod,i}$  prinos dobijen modelom u tački  $i$ .

Model parametri korišćeni su da se odredi teško dostupan rastvorak ( $x_k$ ), koeficijenti prenosa mase u fluidu ( $k_f a$ ) i u čvrstoj fazi ( $k_s a$ ).

Karakteristika ovog modela je veliki broj parametara kojima se proces ekstrakcije opisuje, a koji ne mogu da se izračunaju. Vrednosti tih parametara moraju da se pretpostave tako da se ekstrakcioni prinosi predviđeni modelom poklapaju sa eksperimentalno dobijenim ekstrakcionim prinosima. To su  $k_s$  –koeficijent prenosa mase kroz čvrstu fazu,  $y_r$  -ravnotežna rastvorljivost rastvorka u natkritičnom ugljen (IV)–oksidu (kg ekstrakta/kgCO<sub>2</sub>,  $x_k$  – kg ekstrakta po kg nerastvorljive čvrste faze nakon iscrpljivanja biljnog materijala i

bezdimenziona veličina,  $x_o$  – kg ekstrakta po kg nerastvorljive čvrste faze na početku ekstrakcije i bezdimenziona veličina.

Ovaj model primenjan je za ekstrakciju masnih ulja iz različitog biljnog materijala [82,89,90].

Ovaj model je primenjen na postupku ekstrakcije sistema: lišća *Gingko biloba* – natkritični ugljendioksid, na temperaturi 40°C, i različitim pritiscima 100, 150, 200, 250 i 300 bar, a rezultati modelovanja su dati u Tabeli 45. Početne koncentracije ekstrakata procenjene su u odnosu na maksimalno ostvarene prinose u svakom eksperimentu. Eksperimentalni podaci ekstrakcionih krivih fitovani su pomoću Sovová modela. Za fitovanje krivih prinosa razvijen je kompjuterski program. U Tabeli 45 su date vrednosti za koeficijente prenosa mase u tečnoj fazi  $k_f a$  i koeficijente prenosa mase u čvrstoj fazi  $k_s a$ .

Tabela 45 . Rezultati modelovanja sistema: lišće ginko-natkritični ugljendioksid;izotermni postupak (na 40°C)

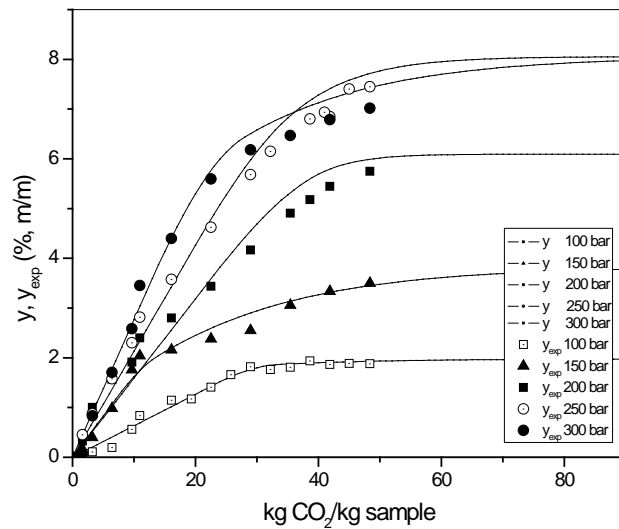
	Pressure (bar)				
	100	150	200	250	300
$x_k$	$1.453 \cdot 10^{-3}$	0.021	0.013	0.028	0.023
F (s <sup>-1</sup> )	0.405	0.81	0.757	0.674	0.674
S (s <sup>-1</sup> )	0.059	0.048	0.175	0.105	0.050
Z	444.06	872.03	798.16	697.02	697.01
W <sub>k</sub>	64.2	52.07	184.35	108.6	51.4
a <sub>o</sub>	$3.158 \cdot 10^4$	$3.158 \cdot 10^4$	$3.158 \cdot 10^4$	$3.158 \cdot 10^4$	$3.158 \cdot 10^4$
k <sub>s</sub> (m s <sup>-1</sup> )	$8.62 \cdot 10^{-7}$	$7.12 \cdot 10^{-7}$	$2.58 \cdot 10^{-6}$	$1.55 \cdot 10^{-6}$	$7.313 \cdot 10^{-7}$
k <sub>s</sub> a <sub>o</sub> (s <sup>-1</sup> )	0.027	0.022	0.081	0.049	0.023
U (m/s)	$6.782 \cdot 10^{-5}$	$5.467 \cdot 10^{-5}$	$5.084 \cdot 10^{-5}$	$4.852 \cdot 10^{-5}$	$4.690 \cdot 10^{-5}$
k <sub>f</sub> (s <sup>-1</sup> )	$1,418 \cdot 10^{-5}$	$2.285 \cdot 10^{-5}$	$1.987 \cdot 10^{-5}$	$1.687 \cdot 10^{-5}$	$2.447 \cdot 10^{-5}$
k <sub>f</sub> a <sub>o</sub> (s <sup>-1</sup> )	0.448	0,722	0.627	0.533	0.773
q <sub>m</sub>	23.80	7.23	21.10	17.96	13.17
q <sub>n</sub>	33.63	14.07	40.09	33.12	27.96
r	0.073	0.541	0.213	0.347	0.281
SD(%)	0.094	0.223	0.403	0.191	0.097
AARD (%)	48.791	19,479	19,232	6.135	3.087

## Oznake simbola

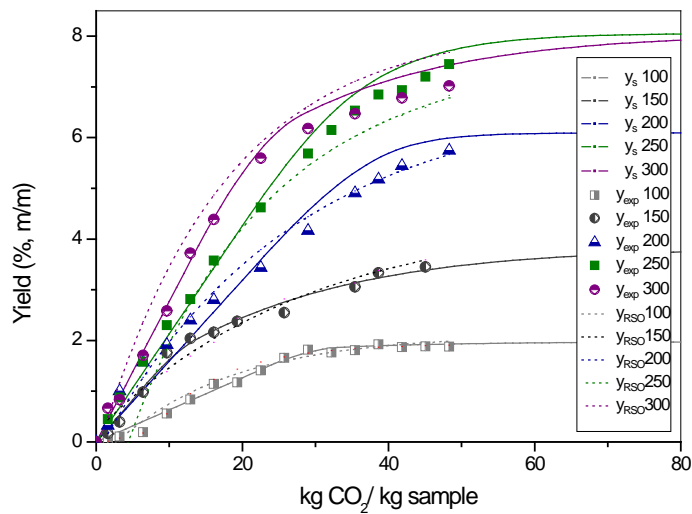
$a$	specifična međufazna površina ( $m^{-1}$ )
$e$	masa ekstrakta (masa ekstrahovanog rastvorka u odnosu na masu nerastvornog dela materijala)
$k_f a$	koeficijent prenosa mase u filmu natkritičnog fluida koji okružuje česticu materijal ili spoljašnji koeficijent prenosa ( $s^{-1}$ )
$k_s a$	koeficijent prenosa mase u čvrstoj fazi ili unutrašnji koeficijent prenosa mase ( $s^{-1}$ )
$q$	masa rastvarača (kg)
$Q$	protok rastvarača (kg/s)
$t$	vreme(s)
$W$	bezdimenzioni parametar koji je predložila Sovova i koji je proporcionalan unutrašnjem koeficijentu difuzije odn koeficijentu prenosa u čvrstoj fazi
$x_k$	maseni odnos rastvorka unutar čestica (nerazorena ćelija materijala) i nerastvornog dela materijala (kg/kg)
$x_p$	maseni odnos rastvorka unutar čestica (razorena ćelija materijala) i nerastvornog dela materijala l (kg/kg)
$x_o$	maseni odnos rastvorka prisutnog u materijaluna početku procesa i nerastvornog dela materijala (kg/kg)
$y$	prinos, izražen kao masa ekstrakta po masi uzorka
$y^*$	pseudo-rastvorljivost, izražena kao masa ekstrakta po masi rastvarača (kg/kg)
$y^*$	rastvorljivost ekstrakta u rastvaraču na datom pritisku i temperaturi (kg/kg)
$Z$	bezdimenzioni parametar koji je predložila Sovova , a koji je proporcionalan spoljašnjem koeficijentu prenosa mase
$Z_w$	bezdimenziona koordinata granice između zone spore i brze ekstrakcije
$\varepsilon$	poroznost čestice materijala
$\rho$	gustina rastvarača ( $kg/m^3$ )
$\rho_s$	ukupna gustina čvrstog materijala (nerastvoran i rastvoran deo) ( $kg/m^3$ )

Model koji je predložila Sovová za opis ekstrakcionih krivih pokazuje dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima dobijenim na 40°C i različitim pritiscima (100-300 bar), što se može videti iz izračunatih vrednosti za AARD i SD. Ovaj model uspešno opisuje ekstrakciju lišća ginka natkritičnim ugljendioksidom, što može da se vidi na Slici 45.

Može da se zaključi da je od primenjenih modela na ekstrakciju sistema ginko –natkritični ugljendioksid, najbolje slaganje sa eksperimentalnim rezultatima ekstrakcije ginka natkritičnim ugljendioksidom dao Sovová model što se može videti sa Slike 46 gde je uporedo prikazana zavisnost prinosa ekstrakcije od pritiska za oba ispitana modela.



Slika 45 Poređenje eksperimentalnih ( $y_e$ ) izračunatih vrednosti prinosa ekstrakcije lišća ginka ( $y_m$ ) ( $d_1 - 0,190$  mm,  $w - 0,194$  kg/h,  $T - 40^\circ\text{C}$ ). Eksperimentalne vrednosti prikazane su simbolima, a pune linije onačavaju izračunate vrednosti ( $y_m$ ) za model koji je predložila Sovová model



Slika 46. Ukupni prinos ekstrakcije u funkciji specifične mase natkritičnog ugljendioksida ( $\text{kg CO}_2/\text{kg}$  uzorka). Simboli predstavljaju eksperimentalne vrednosti prinosa, ( $y_e$ ), pune linije označavaju prinos ekstrakcije sračunat preko modela koji je predložila Sovová ( $y_s$ ), a tačkaste linije označavaju izračunate vrednosti prinosa ( $y_{\text{RSO}}$ ) po modifikovanoj model jednačini Reverchon– Sesti Osseo-a .

### 3.5.4. Određivanje najpovoljnijih parametara ekstrakcije ginka natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom metodom odzivne površine

Klasičan pristup eksperimentalnom radu podrazumeva istraživanje uticaja pojedinih faktora na neku pojavu ili proces. Rezultati takvih eksperimenata ne odražavaju aktuelne promene u sistemu jer ignorišu interakciju između faktora, koja je istovremeno prisutna. Iz tih razloga neophodno je ispitati istovremeni uticaj više faktora, da bi se odredili validni optimalni uslovi ekstrakcije.

Metod odzivne površine RSM (Response Surface Methodology) se pokazao kao moćno sredstvo za određivanje značajnih faktora i njihove interakcije, koji omogućavaju efikasnu optimizaciju procesa sa minimalnim brojem eksperimenata. Koristi se za opisivanje brojnih procesa [92-97].

Metod odzivne površine se može definisati kao empirijska statistička tehnika primenjena za regresionu analizu podataka dobijenih iz planiranih eksperimenata simultanim rešavanjem sistema jednačina. Svaka jednačina se naziva funkcija odziva, a njen geometrijski prikaz se naziva odzivna površina koja može da se prikaže u tri dimenzije ili kao konturna površina. Odzivne funkcije su polinomske oblika s obzirom da se kvalitet fitovanja eksperimentalnih podataka može poboljšati povećanjem stepena polinoma.

Na efikasnost natkritične ekstrakcije ugljendioksidom utiču mnogi faktori uključujući pritisak, temperaturu, i vreme ekstrakcije, pa je metod odzivne površine primenjen za ispitivanje i određivanje uticaja temperature (40-50-60°C), pritiska (100-140-180 bar) i vremena ekstrakcije (2-3-4 h) na ukupni prinos ekstrakta ginka ekstrakcijom natkritičnim ugljendioksidom.

*Eksperimentalna šema.* RSM omogućava vrednovanje efekata više parametara, samih ili u kombinaciji, na odzivnu promenljivu, a takođe i procenjuje ponašanje zavisno promenljive pod datim uslovima.

Metod odzivne površine (RSM) i Box–Behnken šema (BBD) primenjeni su za određivanje optimalnih vrednosti nezavisnih promenljivih (pritiska ( $X_1$ ), temperature ( $X_2$ ) i vremena ekstrakcije ( $X_3$ ) pri dobijanju ekstrakta (prinos  $y$ ) iz lišća ginka natkritičnim ugljendioksidom.

Box–Behnken šema zahteva broj eksperimenata  $N$  u saglasnosti sa sledećom jednačinom:

$$N = 2k \cdot (k - 1) + c_p \quad (29)$$

gde je  $k$  broj faktora, a  $c_p$  broj ponovljenih eksperimenat u centralnoj tački. U šemi postoje tri nivoa  $(-1, 0, +1)$  sa ujednačenim intervalima između nivoa [94].

Promenljive su kodirane prema sledećoj jednačini [92]:

$$X = \frac{x - [x_{\max} + x_{\min}] / 2}{[x_{\max} - x_{\min}] / 2} \quad (30)$$

gde je  $x$  prava vrednost odgovarajuće promenljive,  $X$  je kodirana vrednost, a  $x_{\max}$  i  $x_{\min}$  su maksimalna i minimalna vrednosti odgovarajuće promenljive.

Eksperimentalni podaci fitovani su modelom odzivne površine polinomom drugog reda u skladu sa sledećim oblikom.:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j$$

(31)

gde je  $y$  odzivna funkcija (prinos ekstrakcije, %),  $\beta_0$ ,  $\beta_j$ ,  $\beta_{jj}$ ,  $\beta_{ij}$  su konstante tj. regresioni koeficijenti odsečka, linearni, kvadratni i koeficijenti interakcije među faktorima tj.  $X_i$  and  $X_j$  su kodirane nezavisno promenljive (temperatura, pritisak, vreme). Statistička obrada eksperimentalnih podataka i crtanja površina odziva urađena je primenom komercijalnog softerskog paketa Statistica 8.0. Series 0608c (StatSoft (Europe) GmbH, Hamburg).

U tabeli 46 su dati Box-Behnken matrica, nekodirane, kodirane vrednosti nezavisnih varijabli, njihovi nivoi korišćeni u RSM šemi, gustina ugljendioksida, eksperimentalne i procenjene vrednosti zavisno promenljive (prinos ekstrakcije ginka).

Odzivna površina i konturni crteži razvijeni su (dobijeni) su upotrebom fitovanog polinoma drugog reda i držanjem nezavisne promenljive sa najmanjim efektom na odzivnu varijablu na centralnoj vrednosti, variranjem nivoa druge dve promenljive unutar eksperimentalnog opsega. Analiza varijanse (ANOVA) je takođe korišćena radi vrednovanja kvaliteta fitovanog modela Test statističkog značaja zasnovan je na kriterijumu ukupne greške sa nivoom tačnosti 95%.



**Table 46.** Box-Behnken matrica i oznake parametra koji se koriste za određivanje najpovoljnijih uslova ekstrakcije natkritičnim ugljendioksidom

Redni broj	Kodirani nivoi			Nezavisne promenljive			$\rho_{CO_2}$ (kg/m <sup>3</sup> )	Ekperimentalni prinos, $y_e$ (%, g/100 g)	Procenjeni prinos (%, g/100g)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$P$ (bar)	$T$ (°C)	$\tau$ (h)			
1	-1	-1	0	100	40	3	630	0,559	0,621
2	1	-1	0	180	40	3	820	1,414	1,545
3	-1	1	0	100	60	3	290	0,261	0,139
4	1	1	0	180	60	3	688	1,680	1,618
5	-1	0	-1	100	50	2	385	0,053	0,044
6	1	0	-1	180	50	2	758	0,506	0,428
7	-1	0	1	100	50	4	385	0,247	0,325
8	1	0	1	180	50	4	758	2,344	2,353
9	0	-1	-1	140	40	2	764	0,401	0,347
10	0	1	-1	140	60	2	563	0,257	0,397
11	0	-1	1	140	40	4	764	1,850	1,709
12	0	1	1	140	60	4	563	1,188	1,241
13	0	0	0	140	50	3	674	0,570	0,580
14	0	0	0	140	50	3	674	0,560	0,580
15	0	0	0	140	50	3	674	0,566	0,580

Oznake:

$X_1$  – pritisak (bar)

$$X_1 = (P - 140) / 40$$

$X_2$  -temperatura (°C)

$$X_2 = (T - 50) / 10$$

$X_3$  – vreme ekstrakcije (h)

$$X_3 = (\tau - 3) / 4$$

Regresioni koeficijenti za procenu modela definisanog polinomom drugog reda za ekstrakcioni prinos, izračunati su metodom najmanjeg kvadrata, sumirani su, prikazani u Tabeli 47 gde je prikazan stepen značajnosti svakog faktora preko njihove  $p$  –vrednosti. Kada je  $p$  –vrednost manja od 0,05, faktor pokazuje značajan uticaj na proces (za nivo tačnosti 0,95). Tabela 47 pokazuje da linearni članovi pritisak i vreme ekstrakcije, kvadrat temperature i interakcija pritisak-vreme pokazuju statistički značajan uticaj na proces ekstrakcije.

Table 47. Vrednosti koeficijenata u polinomu drugog reda za prinos reakcije (y)

Term	Koeficijent	Vrednost	t-vrednost	p-vrednost
Konstanta	$\beta_0$	0,580	7.11840	0.000849 <sup>a</sup>
$X_1$	$\beta_1$	0.603	12.08413	0.000069 <sup>a</sup>
$X_2$	$\beta_2$	-0.105	-2.09801	0.089980
$X_3$	$\beta_3$	0.552	11.05561	0.000105 <sup>a</sup>
$X_1^2$	$\beta_{11}$	0.131	1.78614	0.134131
$X_2^2$	$\beta_{22}$	0.267	3.64129	0.014883 <sup>b</sup>
$X_3^2$	$\beta_{33}$	0.076	1.03914	0.346356
$X_1 X_2$	$\beta_{12}$	0.141	1.99981	0.101964
$X_1 X_3$	$\beta_{13}$	0.411	5.82459	0.002107 <sup>a</sup>
$X_2 X_3$	$\beta_{23}$	-0.129	-1.83879	0.125343

Ispitivanjem (analiziranjem) koeficijenta polinoma  $p$ -testom pokazalo se da na prinos ekstrakta veoma značajan uticaj imaju linearni član za pritisak i vreme, interakcija između pritiska i vremena ekstrakcije ( $P < 0,01$ ), dok kvadratni član za temperaturu takođe ima znatan uticaj na prinos ( $0.01 < P < 0,5$ ). Linearni izrazi za temperaturu, izrazi za međusobni uticaj temperature i pritiska, odnosno temperature i vremena ekstrakcije ne pokazuju značajan uticaj na prinos ( $P > 0,05$ ) unutar ispitivanog opsega (intervala).

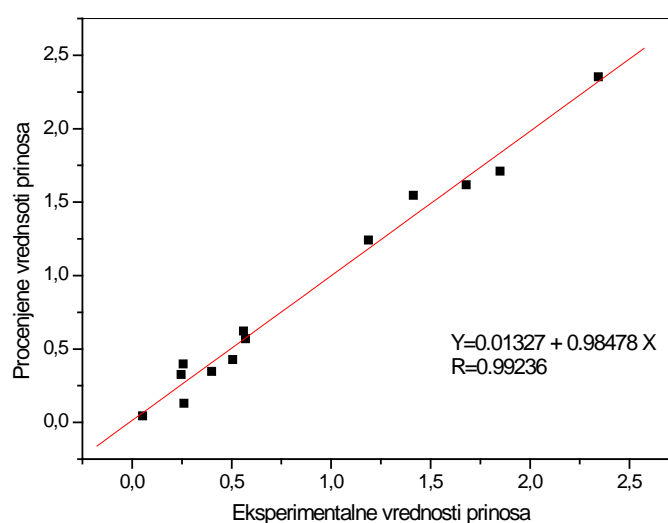
Model polinoma drugog reda korišćen da izrazi ukupni prinos ekstrakcije (y) kao funkciju od nezavisno promenljivih dat je izrazom:

$$y = 0,580 + 0,603 X_1 - 0,105 X_2 + 0,552 X_3 + 0,131 X_1^2 + 0,267 X_2^2 + 0,076 X_3^2 + 0,141 X_1 X_2 + 0,411 X_1 X_3 - 0,129 X_2 \quad (32)$$

Linearni, kvadratni i međusobno zavisni izrazi u modelu prikazanim polinomom drugog reda korišćeni su za formiranje trodimenzionalnog grafika i dvodimenzionalnog konturnog prikaza. Najbolji način da se efekti nezavisno promenljivih na zavisno promenljivu (prinos)

vizualizuju je da se prikaže crtež odzivne površine model jednačine (32) grafički u tri dimenzije. Crteži su nastali crtanjem odziva koristeći z-osu prema dvema nezavisnim varijablama držeći ostale promenljive na nultom nivou, što je prikazano na slikama 48, 49 i 50.

Slika 51 pokazuje procenjene (izračunate) vrednosti prinosa u odnosu na eksperimentalne vrednosti prinosa. Koeficijent determinacije za ovaj dobijeni model je 0,9936, što ukazuje da model polinoma drugog reda adekvatno reprezentuje međusobne odnose među izabranim ekstrakcionim parametrima.



**Slika 51.** Procenjene vrednosti prinosa ekstrakcije prema dobijenim eksperimentalnim vrednostima pri ekstrakciji lišća ginka ugljendioksidom u natkritičnom stanju (stepen usitnjenosti droge,  $d=0,190$  mm)

Izračunavanjem najpovoljnijih uslova, s ciljem dobijanja optimalnih vrednosti prinosa ekstrakcije ginka, dobijene su vrednosti za pritisak od 184,4 bar, za temperaturu  $52,7^{\circ}\text{C}$  i vreme ekstrakcije od 3,86 h. Procenjeni prinos je 2,39 % (m/m). Pod tim optimalnim uslovima, eksperimentalna vrednost za prinos ekstrakta ginka je 2.34%, što je usaglasnosti sa vrednošću dobijenom ovim modelom polinoma drugog reda za optimalne parametre procesa.

Trodimenzionalni graf može da pomogne istraživaču da odredi pravac kojim bi povećao željeni odziv i da grafički prikaže prirodu fitovane površine kao maksimum, minimum ili kao prevojnu tačku. Na konturnim crtežima, krive koje odgovaraju odzivnim vrednostima nacrtane su na površini čije koordinate predstavljaju nivoe nezavisnih promenljivih. Svaka kontura predstavlja specifičnu vrednost za visinu površine, iznad ravni koja je definisana kombinovanim nivoom nezavisnih promenljivih. Zbog toga, različite visine

površina omogućavaju da se pažnja fokusira na nivoe nezavisno promenljivih na kojima se promene u visini odzivne površine pojavljuju.

Slika 48 prikazuje odzivnu površinu i konturni crtež, koji pokazuju efekat temperature i pritiska na ekstrakcioni prinos pri fiksiranom ekstrakcionom vremenu od 3 sata.

Na Slici 49 prikazani su odzivna površina i konturni crtež koji pokazuju međusobni efekat temperature i ekstrakcionog vremena na prinos pri konstantnom pritiku od 140 bar i evidentno je da vreme ekstrakcije ima izražen pozitivan linearni efekat na prinos tokom celog ispitivanog vremenskog intervala.

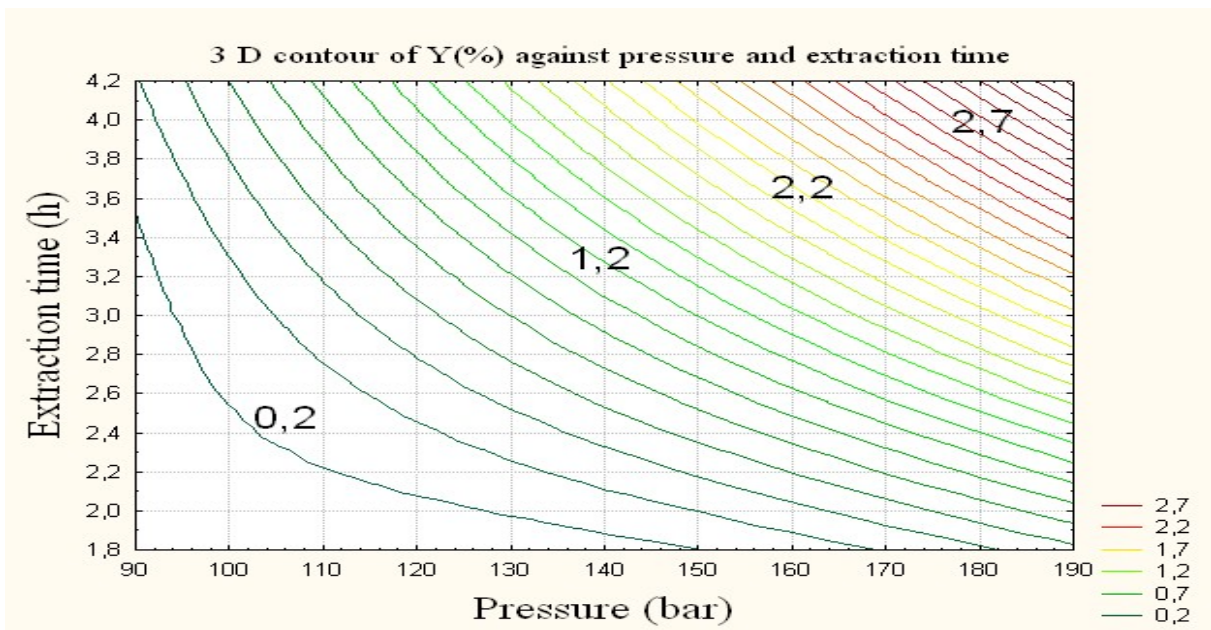
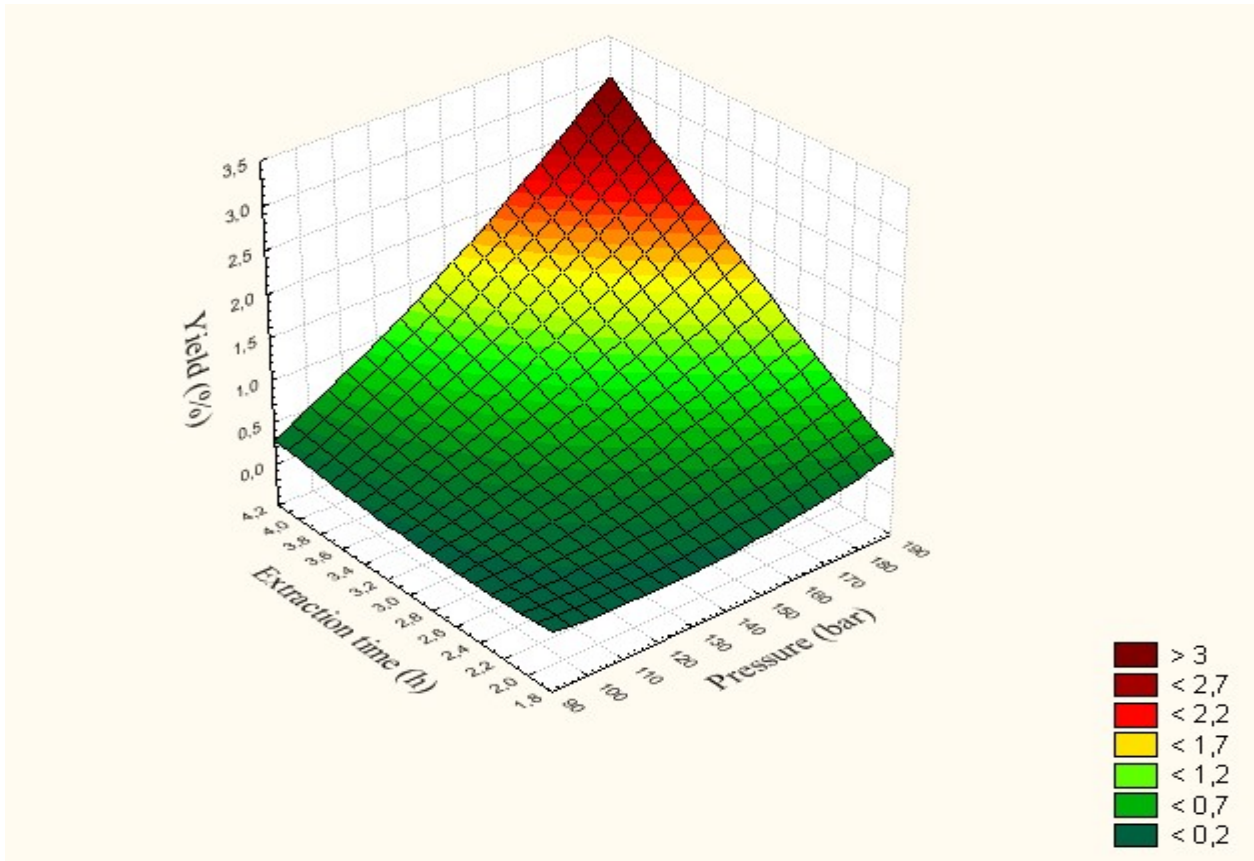
Slika 50 predstavlja odzivnu površinu i konturni crtež, koji pokazuju efekte pritiska i vremena ekstrakcije pri temperaturi od 50° C. Evidentan je značajan uticaj interakcije pritiska i vremena ekstrakcije na prinos ekstrakta, posebno izražen na visokim pritiscima.

S obzirom da različiti faktori utiču na proces ekstrakcije, optimizacija eksperimentalnih uslova predstavlja kritični korak u razvoju metoda superkritične ekstrakcije.

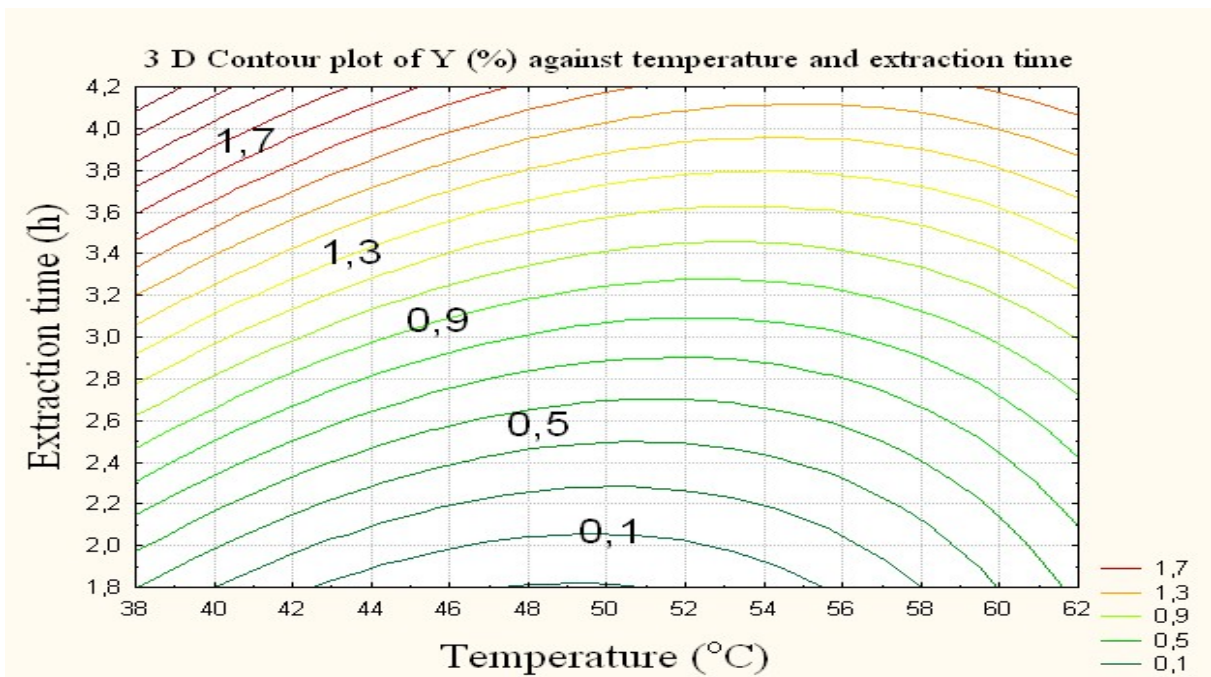
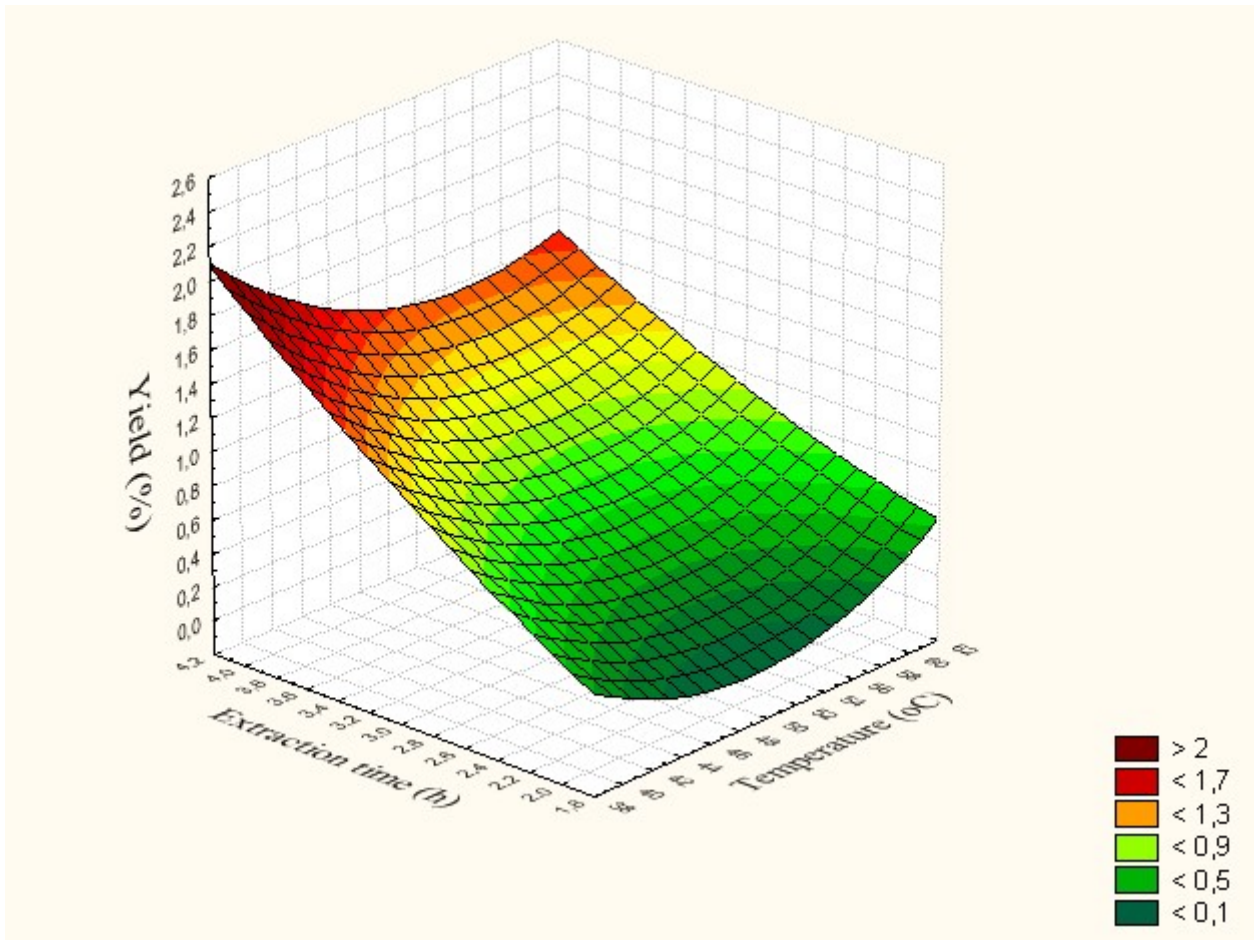
Eksperimentalna šema je prihvaćena na osnovu kodiranih nivoa tri različite promenljive, izvedeno je 15 eksperimenata sa tri ponovljena eksperimenta u centralnoj tački s ciljem da se potvrdi matematički model.

Rezultati ispitivanja su pokazali da je model polinoma drugog reda dovoljan dobar da se opiše i proceni odziv promenljive (prinos ekstrakta) sa promenama procesnih parametara za natkritičnu ekstrakciju unutar eksperimentalnog opsega. Statistička analiza eksperimenata ukazala je da značajni uticaj na prinos ekstrakcije pokazuju pritisak ( $X_1$ ), i vreme ekstrakcije ( $X_3$ ), (linearni član), kvadrat temperature ( $X_2^2$ ) i međusobni uticaj pritiska i temperature ( $X_1X_3$ ).

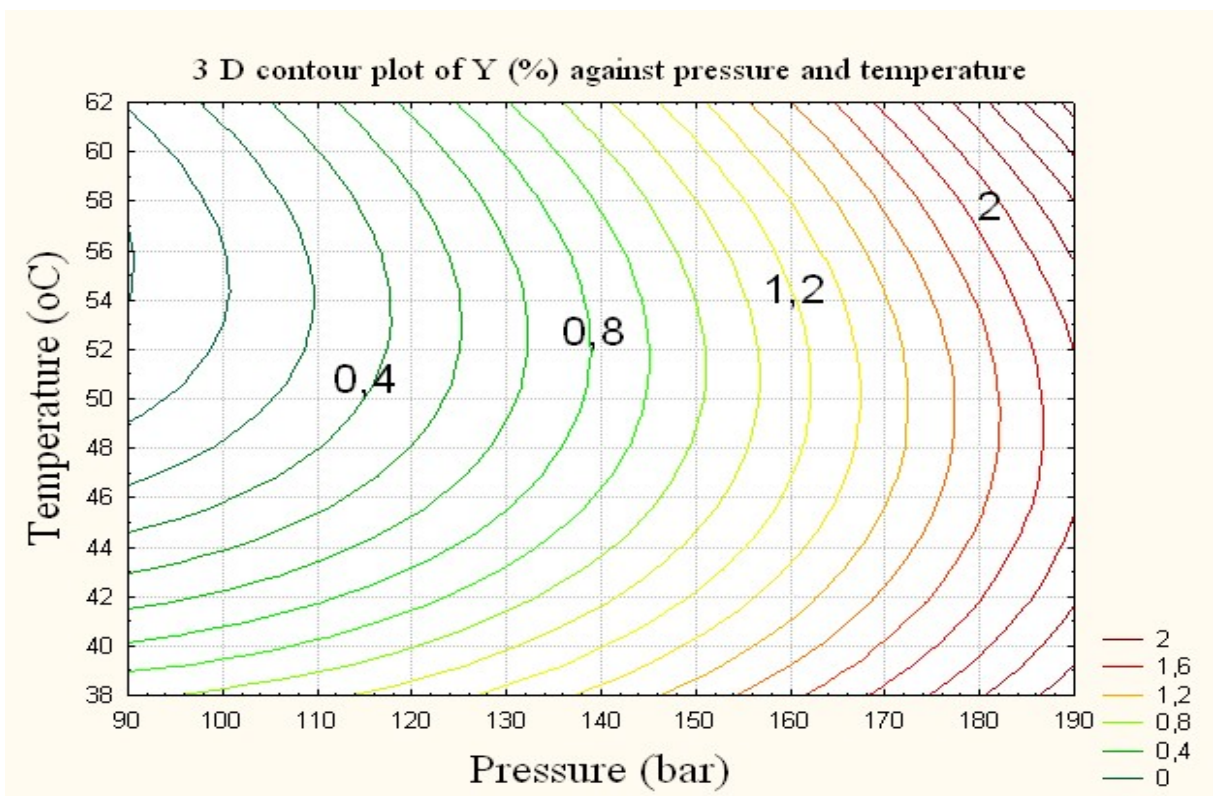
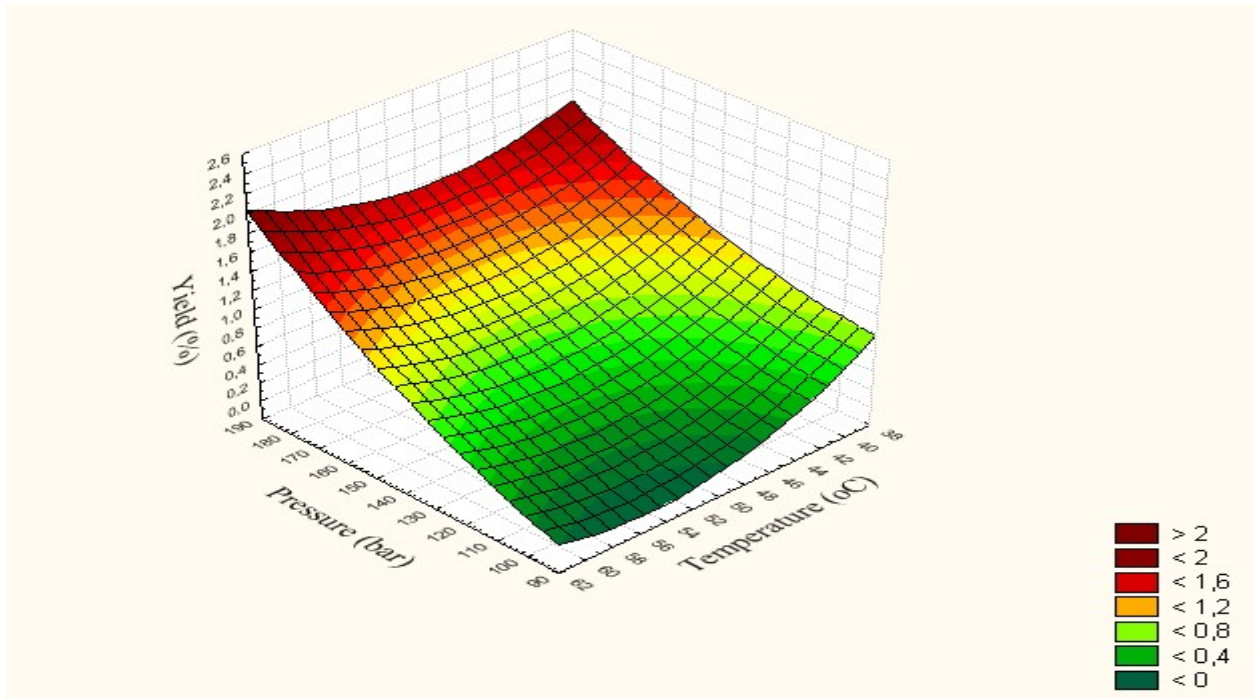
Zasnovano na datom modelu i datom opsegu parametara, izračunati su optimalni uslovi za ekstrakciju lišća ginka, i oni su 184.4 bar, 52,7 °C and 3,86 h. Pod tim uslovima eksperimentalne vrednosti i procenjene-izračunate vrednosti su u dobroj saglasnosti, pa prema tome ova metodologija može da obezbedi osnovu za model kojim bi se utvrdila nelinearna priroda između nezavisnih promenljivih i dobio odgovor o optimalnim vrednostima parametara procesa za relativno kratko vreme i mali broj eksperimenata. Procenjeni prinos ekstrakta za ispitivani interval parametara procesa je 2,39%.



Slika 48. Trodimenzionalni prikaz odzivne površine i konturni crtež koje pokazuju efekat pritiska i vremena Ekstrakcije na prinos ekstrakcije ginka



Slika 49. Trodimenzionalni prikaz odzivne površine i konturni crtež koji pokazuju efekat temperature i vremena ekstrakcije na prinos ekstrakcije ginka



**Slika 50.** Trodimenzionalni prikaz odzivne površine i konturni crtež koji pokazuju efekat pritiska i temperature na prinos ekstrakcije ginka

#### 4. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni rad je urađen u laboratoriji Tehnološkog fakulteta, u Novom Sadu, Katedra za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom je rađena na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu.

**Biljni materijal.** U ispitivanjima je korišćeno lišće ginka (*Ginkgo biloba* L.) ubrano oktobra meseca 2004. godine, sa ženskog stabla, starosti oko 30 godina, koje raste u kampusu Univerziteta u Novom Sadu.

Lišće je konzervirano sušenjem u poluindustrijskoj komornoj sušari, sa lesama, na temperaturi od  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ . Sušara je sopstvene izrade (Institut za sirak i lekovito bilje, Bački Petrovac). Grejači su električni, a nakon dostizanja temperature, koristi se solarno grejanje.

**Hemikalije.** Rastvarači koji su korišćeni u radu su: 95% etanol (Elan, Srbobran), metilen-hlorid, petroletar (Centrohem, Stara Pazova)

Za pokretnu fazu korišćeni su toluol (Lach-Ner, Češka), etilacetat, aceton (Zorka, Šabac), metanol (Centrohem), sirćetna kiselina (Lach-Ner, Češka), mravlja kiselina (Merck).

Rastvori za izazivanje hromatograma su anhidrid sirćetne kiseline (Lach-Ner, Češka).

U cilju kvalitativne analize flavonoida korišćen je kao reagens za detekciju hromatograma: 2-aminoetil estar difenil borne kiseline (98% Acros) i polietilenglikol 4000 (PEG 4000) tj. NP/PEG reagens, Natural products/polietilenglikol .....

Sve ostale hemikalije su stepena čistoće p.a. ukoliko drugačije nije naglašeno.

Za hromatografiju su korišćene gotove HPTLC ploče (silikagel 60 F<sub>254</sub>, 10x20 cm), sa koncentracionom zonom 2,5 cm, podešenih dimenzija približno 5x10 cm, E. Merck, Darmstadt, Germany.

U ispitivanjima su kao standardne supstance korišćeni rutin (standardna supstanca nepoznatog porekla), (+) –katehin hidrat (Fluka Chemika AGCH -9470 Buchs), galna kiselina (Sigma, St. Luis, MO, USA), bilobalid (HPLC stepena čistoće) i ginkolidi A, B, C, hlorogenska



kiselina (HPLC stepena čistoće) AppliChem (BioChemica, Chemical Synthesis Services, Darmstadt),

Komercijalni ugljendioksid čistoće 99% (Tehno-gas, Novi Sad) korišćen je za ekstrakciju.

### **Aparati i uređaji.**

- Za usitnjavanje droge korišćen je komercijalni, električni mlin za kafu Multi Moulinex, 260W).
- Granulometrijski sastav mliva određen je primenom seta sita proizvođača Erweka Apparatebau GmbH, Nemačka
- Ekstrakcija droge uz stalno mešanje je rađena na mešalici (Labor Muszeripani Muvek, Hungary).
- Za odstranjivanje rastvarača korišćen je vakuum uparivač (Devarot, Elektromedicina Ljubljana).
- Dobijanje tečnog ekstrakta (približno 1:1) je izvedeno primenom baterije perkolatora (5 perkolatora). Kao perkolator je korišćena plastična boca jednakog unutrašnjeg prečnika ( $\varnothing$ 10 cm, L=25cm), zapremine 2 l.
- Sušenje tečnih ekstrakata je izvedenom u laboratorijskom Anhydro Spray Drayer-u (APV Anhydro A/S, tip LAB S1, Ostmarken 8, DK-2860, Søborg, Danska) sledećih tehničkih karakteristika: brzina atomizera je max 50000 o/min, snage 10,1 kW, maksimalnog protoka komprimovanog vazduha 120 l/min, vazdušni pritisak 4 bar, ukupne visine uređaja 2,5 m, spoljašnjeg prečnika komore 1,2 m, a visine komore 1,3 m; ulazna temperatura varira od 200 do 250<sup>o</sup> C zavisno od kapaciteta (3 do 7,5 kg/h sračunato na vodu).
- Za dovođenje tečnog ekstrakta u sprej drayer koristi se peristaltička pumpa MULTIFIX sa repulzionim motorom M80, 0-5000 min<sup>-1</sup>
- Za ekstrakciju ugljendioksidom pod pritiskom je korišćen je uređaju za ekstrakciju pod visokim pritiskom (HPEP-High Pressure Extraction Plant, NOVA-Swiss).
- Kriostat, MLW MK 70, Verb MLW, Prüfgeräte Werk, GDR za podešavanje temperature za ekstrakciju tečnim ugljendioksi
- Uzorci su nanešeni pomoću mikropipete (Hamilton-Bonaduz).
- Za posmatranje hromatograma pod UV svetlošću ( $\lambda$  - 254 odn 366 nm) korišćen je Fluotest sa kvarcnom lampom GES.m.b.H., Hanau
- Za određivanje indeksa refrakcije korišćen je Abbe-ov refraktometar (Carlzeiss, Jena).
- Za određivanje specifičnog ugla optičke rotacije korišćen je aparat Polamat A (Institut za hemiju, PMF, Novi Sad)

- Spektrofotometrijska merenja vršena su na spektrofotometrima Specol Carlzeiss Jena i Perkin Elmer Lambda 15 UV/VIS Spectrofotometer.
- Za analizu etarskog ulja i ekstrakta ginka korišćen je gasni hromatograf GCD HP G 1800A (Hewlett- Packard, Palo Alto, CA, USA)

#### 4.1. Priprema biljnog materijala usitnjavanjem

Priprema droge za ekstrakciju je izvršena usitnjavanjem, primenom komercijalnog mlina, vodeći računa da se droga pri mlevenju ne pregreje. Samlevena droga se prosejava kroz set sita. Posle određenog vremena izračunava se masa frakcija  $m_i$  (%), određuje srednji prečnik  $i$ -te frakcije  $d_i$  (mm) i primenom formule

$$\frac{100}{d} = \sum \frac{m_i}{d_i}$$

izračunava stepen usitnjenosti droge preko srednjeg prečnika čestica  $d$ .

#### 4.2. Semipreparativno dobijanje etarskog ulja

Veća količina etarskog ulja može da se dobije primenom aparata za semipreparativno dobijanje etarskog ulja, koji se sastoji od staklenog trogrlog balona od 5 l, okruglog dna, u koji može da stane veća količina biljnog materijala (300-500g droge) i odgovarajuća količina vode. Balon je snabdeven kosim vazdušnim hladnjakom na čijem kraju se nalazi levak za odvajanje, koji služi za prihvatanje kondezata (etarsko ulje – voda) i razdvajanje etarskog ulja od vode. Balon se zagreva preko električne obloge.

##### *Određivanje fizičko-hemijskih osobina etarskog ulja*

Za određivanje optičkog ugla skretanja etarskog ulja korišćen je aparat Polamat A. Specifični ugao skretanja izračunava se preko formule:

$$[\alpha]_D^t = \frac{A \text{ (očitana vrednost)}}{1,17543} \frac{V(\text{cm}^3)}{m(\text{g}) l (\text{cm}^3)}$$

gde je zapremina uzorka  $V = 0,5 \text{ cm}^3$  i dužina kivete  $l = 0,5 \text{ dm}$ ,  $m$  – masa uzorka.

*Indeks refrakcije* se određuje Abbeovim refraktrometrom prema Ph.Jug. (IV) [98].

### **4.3. Određivanje sadržaja etarskog ulja u drogi destilacijom vodenom parom**

Izolovanje i određivanje sadržaja etarskog ulja iz lišća ginka izvedeno je prema sledećem postupku. Droga (50 g) najvećeg stepena usitnjenosti ( $d_1 = 0,190$  mm), unese se u destilacioni balon zapremine  $1000 \text{ cm}^3$ , doda destilovana voda ( $400 \text{ cm}^3$ ), stavi nastavak za destilaciju (aparatura koju propisuje DAB 8) [99]. U graduisanu cev, aparature za određivanje sadržaja etarskog ulja unese se destilovana voda sve dok ne počne da se preliva u balon za destilaciju. Sadržaj balona se zagreva do ključanja. Temperatura se podesi tako da se obezbedi blago ključanje i destilacija vrši 3h. Nakon hlađenja (30 min) vodeni sloj se ispusti i odbaci, a etarsko ulje se ispusti u čašu. Za sušenje etarskog ulja koristi se bezvodni  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Nakon filtriranja i ispiranja petroletrom, rastvarač se odstrani zagrevanjem na vodenom kupatilu  $40\text{--}50^\circ\text{C}$ , a ostatak suši u eksikatoru sa silika gelom. Iz izmerene mase ulja, izračunava se njegov sadržaj u drogi (% , m/m).

### **4.4. Izbor rastvarača za ekstrakciju lišća ginka**

Droga (5 g) prenese se u erlenmajer (100 ml), doda alkohol određene koncentracije (50 ml) i izmeri masa erlenmajera sa uzorkom. Ekstrakcija se vrši maceracijom na mešalici uz stalno mešanje 3,5 sata, proverava se masa erlenmajera sa uzorkom, i po potrebi dodaje alkohol, i ekstrakt se odvoji od čvrstog dela filtriranjem preko papira. Ekstrakt (5 ml) se podvrgava uparavanju radi odstranivanja rastvarača i suši u sušnici na  $105^\circ\text{C}$ , 2 sata. Na osnovu suve mase izračunava se sadržaj ekstrahovanih materija.

### **4.5. Ispitivanje kinetike ekstrakcije sistema**

Svaka tačka kinetičke krive je dobijena sa posebnim uzorkom droge u erlenmajeru. Postupak se sastoji u sledećem: droga (2 g) se prenese u erlenmajer, doda ekstragens (20 ml) i izmeri ukupna masa. Ekstrakcija se vrši maceracijom uz stalno mešanje. Nakon isteka određenog vremena ekstrakcije, proveriti se masa erlenmajera sa uzorkom, po potrebi doda rastvarač, a zatim odvoji ekstrakt od čvrstog dela filtriranjem preko filter papira. Ekstrakt (5 ml) se prenese u balon sa šlifom od 100 ml, rastvarač odstrani na rotacionom uparivaču i ostatak suši u sušnici na  $105^\circ\text{C}$  u toku 2h. Merenjem mase suvog ostatka izračunava se prinos ekstrahovanih materija ( $q_i'$  , g/100g droge).

Radi određivanja početnog sadržaja ekstraktivnih materija ( $q_0$ , g/100g droge), ekstrakcija droge se vrši do potpunog uspostavljanja ravnoteže (48h). Nakon odvajanja ekstrakta filtriranjem i nakon sušenja, izmeri se masa ekstrahovanih materija i izračunava početni sadržaj ekstrahovanih materija izražen u procentima (g/100 g droge). Sadržaj u drogi zaostalih materija ( $q_i$ , g/100g droge) se izračunava na osnovu dobijenih vrednosti za ( $q_0$ ) i ( $q_i'$ ) tj.  $q_i = q_0 - q_i'$ .

#### **4.6. Dobijanje tečnog ekstrakta (*Extracta fluida*) približnog odnosa 1:1**

*Postupak dobijanja tečnog ekstrakta:* Višestupna protivstrujna ekstrakcija se izvodi na sledeći način: droga (300 g) propuštena kroz sito sa otvorima od 3,15 mm, prenese se u prvi perkolator u koji se prethodno na dnu postavi tampon vate. Otvori se slavina perkolatora i dodaje, odozgo, 40% etanol (m/m) sve do pojavljivanja na slavini prvih kapi rastvarača. Zatim se slavina zatvori i doda još toliko rastvarača da njegova visina iznad sloja droge bude 2- 3 cm. Droga se macerira 12 h, a zatim vrši prekolacija (brzina isticanja ekstrakta 1 ml/min), uz istovremeno dodavanje svežeg rastvarača. Izdvoji se prvi perkolat (300 g) i ispušta ekstrakt (1100 ml), kojim se kvasi droga u drugom perkolatoru. Nakon 12 h maceracije, izdvaja se 300 g perkolata uz istovremeno dodavanje ekstrakta koji je izdvojen iz prvog perkolatora. Na ovaj način se izdvajaju I perkolati (5 perkolata). Ukupni ekstrakt (1500 g) predstavlja tečni ekstrakt (približno 1:1).

**4.6.1. Analiza tečnog ekstrakta.** U tečnom ekstraktu se određuju: sadržaj ekstrahovanih materija, sadržaj alkohola, sadržaj etarskog ulja, sadržaj ukupnih flavonoida, indeks refrakcije.

**4.6.1.1. Određivanje sadržaja ukupnih ekstraktivnih materija u ekstraktu.** Perkolat (10 ml) se prenese u balon sa šlifovanim zatvaračem, odstrani rastvarač uparavanjem, ostatak suši i meri masa suvog ostatka. Računski se određuje sadržaj ekstrahovanih materija.

**4.6.1.2. Određivanje sadržaja alkohola u tečnom ekstraktu.** Ekstrakt (50ml) se prenese u balon od 250 ml, doda voda (25ml) i vrši destilacija sve dotle dok se ne dobije destilat (48ml) koji se sakuplja u normalni sud. Za sve ovo vreme destilacije, odmerni sud se hladi hladnom vodom ili ledom. Zatim se odmerni sud temperira 30 min na 20°C i dopuni do crte destilovanom vodom.

*Određivanje zapreminske mase destilata.* Piknometar od 25 ml se napuni destilatom nešto iznad crte, temperira na 20°C i nivo podesi do crte. Zatim se meri masa piknometra sa destilatom ( $m_2$ ; g). Na istovetan način se odredi masa piknometra sa destilovanom vodom ( $m_1$ ; g). Izmeri se masa, čistog, praznog piknometra ( $m$ ; g). Gustina destilata se izračunava prema izrazu:

$$\rho = \frac{m_2 - m_1}{m_1 - m}$$

Sadržaj alkohola se određuje na osnovu izraza:

$$X = \frac{50 \cdot a}{b}$$

gde je :

X- sadžaj alkohola u ekstraktu, (% , m/m); a-sadržaj alkohola na osnovu  $\rho$  (vrednost je očitana iz tablica - Государственная Фармакопея СССР X ); b-zapremina destilata, 50ml.

#### **4.7. Dobijanje suvog ekstrakta (*Extracta sicca*)**

Suvi ekstrakt je dobijen od tečnog ekstrakta odstranjivanjem rastvarača u sušnici sa raspršivanjem (Anhydro Spray Dryer), pri sledećim eksperimentalnim uslovima:

Ulazna temperatura.....125°C;

Izlazna temperatura.....70-80°C;

Protok ekstrakta.....2 l/h.

#### **4.8. Određivanje ukupnih flavonoida i fenola u ekstraktima dobijenim primenom alkohola koncentracije 40% (m/m)**

##### **4.8.1. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktima sračunatih na rutin odnosno (+) - katehin**

###### **Određivanje ukupnih flavonoida sračunatih na rutin**

Izrada standardnog dijagrama. Rutin (50 mg) se prenese u odmerni sud od 50 ml, doda 95% i rutin rastvori u rastvoru za ekstrakciju flavonoida koga čini smeša rastvarača: metanol 70%, sirćetna kiselina 5%, voda 25%. Ovako dobijeni rastvor ima koncentraciju 1 mg/ml.

Od ovako dobijenog rastvora, uzimaju se zapremine: 1,0; 0,8; 0,6; 0,4 i 0,2 ml. U odmerene zapremine standardnog rastvora doda se rastvor za ekstrakciju flavonoida u zapremini koja

obezbeđuje ukupnu zapreminu od 15 ml. Zatim se doda rastvor  $\text{AlCl}_3$  (2,5 ml), sadržaj epruvete promeša i meri apsorbanca rastvora na  $\lambda=405$  nm.

Na osnovu izmerenih vrednosti apsorbanca, konstruiše se dijagram zavisnosti apsorbanca od različitih masa rutina. Metodom najmanjih kvadrata nađe se oblik jednačine

$$A = -0,228 + 1,475 m$$

odnosno

$$m = \frac{A + 0,228}{1,475}$$

gde je:

A-apsorbancija,

m- masa rutina u mg

Iz dobijene vrednosti apsorbanca izračuna se sadržaj rutina u uzorku (m/m).

Potrebni rastvori: rastvor  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (13,3 mg), natrijum acetata (40 mg) se rastvore u malo vode, a zatim rastvor prenese u odmerni sud od 10 ml, i isti dopuni do crte.

#### **Određivanje ukupnih flavonoida u tečnom ekstraktu sračunatih na rutin**

Ekstrakt (2,0 ml) se prenese u balon sa šlifom i rastvarač potpuno odstrani na rotacionom uparivaču, a suvi ostatak se rastvori u rastvoru za flavonoide (10 ml). Za određivanje ukupnih flavonoida uzima se od dobijenog rastvora 1 ml, doda rastvor za ekstrakciju flavonoida (4 ml) i rastvor  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2,5 ml). Zatim se meri apsorbanca na  $\lambda=405$  nm. Iz dobijene apsorbanca odredi se masa rutina iz kalibracionog dijagrama tj. jednačine. Sadržaj ukupnih flavonoida sračunatih na rutin se izračunava u ekstraktu i izražava u % (m/v)

#### **Određivanje ukupnih flavonoida sračunatih na katehin**

Izrada standardnog dijagrama. Katehin hidrat (50 mg) se prenese u odmerni sud od 100 ml i supstanca rastvori u metanolu. Odmerni sud se se dopuni metanolom do crte. Ovako dobijeni rastvor sadrži 0,5 mg/ml. Rastvor bez vode prisutne u katehinu ima koncentraciju 0,431 mg/ml. Od ovako dobijenog rastvora uzima se 1 ml, doda voda (4 ml) i 5%  $\text{NaNO}_2$  (0,3 ml). Dobijenoj smeši se nakon 5 minuta doda 10%  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,3 ml) i nakon 6 minuta doda rastvor NaOH koncentracije 1 mol/dm<sup>3</sup> (2 ml) i voda do ukupne zapremine 10 ml. Apsorbanca rastvora se meri na  $\lambda=510$  nm.

Pripreme se i druge koncentracije tj. mase katehina koje iznose 0,094; 0,188; 0,282; 0,377 mg. Prva pripremljena koncentracija odnosno masa je bila 0,471 mg. Na osnovu vrednosti izmerenih apsorbanci konstruiše se dijagram zavisnosti apsorbance od mase katehina.

Metodom najmanjih kvadrata dobijena je jednačina

$$A = 0,01738 + 2,14738475 m$$

odnosno

$$m = \frac{A - 0,01738}{2,14738}$$

Rastvori: 5% rastvor NaNO<sub>2</sub>; 10% AlCl<sub>3</sub> i 1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH

**Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktu sračunatih na katehin.** Ekstrakt (tečni ekstrakt 2 ml; suvi ekstrakt 50 mg). Ako se analiza vrši u tečnom ekstraktu, onda se ekstrakt podvrgava uparavanju i suvi ostatak rastvara u metanolu (10 ml). Od ovako dobijenog rastvora za analizu se uzima 1 ml, a dalji postupak je u svemu identičan postupku izrade standardnog dijagrama. Nakon merenja apsorbance na 510 nm, na osnovu njene vrednosti odredi se masa ukupnih flavonoida sračunatih na katehin iz jednačine dobijene za standardni dijagram, a računski odredi sadržaj ukupnih flavonoida sračunatih na (+)-katehin.

Za određivanje ukupnih flavonoida u suvom ostatku sračunato na (+)-katehin uzima se suvi ekstrakt (50 mg) prenosi u odmerni sud od 10 ml, rastvori u metanolu i odmerni sud dopuni do crte metanolom. Za analizu se uzima rastvor (1 ml), doda voda (4 ml) i 5% Na NO<sub>2</sub> (0,3 ml). Nakon 5 minuta dodaje se 10% AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,3 ml) i nakon 6 minuta doda rastvor NaOH koncentracije 1 mol/dm<sup>3</sup> (2 ml) i voda do ukupne zapremine 10 ml. Apsorbanca rastvora se meri na λ=510 nm i izračunava sadržaj ukupnih flavonoida sračunatih na katehin.

#### **4.8.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u suvom ekstraktu sračunatih na hlorogensku kiselinu**

Standardni rastvor hlorogenske kiseline. Hlorogenska kiselina (5 mg) se prenese u odmerni sud od 50 ml i rastvori u metanolu. Odmerni sud se dopuni do crte metanolom. Ovako dobijena koncentracija rastvora je 0,1 mg/ml.

Izrada standardnog dijagrama. Uzimaju se sledeće zapremine standardnog rastvora: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 i 0,6 ml što odgovara masi hlorogenske kiseline od 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 i 0,06 mg. Zatim se doda voda, toliko da sa standardnim rastvorom ukupna zapremina bude 8 ml. Dodaje se Follin-Ciocalteu reagens (0,5 ml) koji je prethodno razblažen vodom u odnosu 1:2, 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,5 ml) i nakon 30 minuta meri se apsorbanca na talasnoj dužini λ=750 nm,

Konstruiše se dijagram zavisnosti apsorbancije od različitih masa hlorogenske kiseline, metodom najmanjih kvadrata odredi jednačina

$$A = 0,0348 + 5,89143 \cdot m \quad \text{odnosno} \quad m = \frac{A - 0,0348}{5,89143}$$

**Određivanje sadržaja ukupnih fenola sračunatih na hlorogensku kiselinu.** Ekstrakt (1 ml) se prenese u balon sa okruglim dnom i rastvarač ukloni otparavanjem pri sniženom pritisku na vakuum uparivaču. Suvi ostatak se rastvori u metanolu (10 ml) i za analizu uzima 1 ml rastvora, doda 7,9 ml vode, zatim Follin-Ciocalteu reagens (0,5 ml) koji je prethodno razblažen vodom u odnosu 1:2, 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,5 ml), i nakon 30 minuta meri se apsorbancia na talasnoj dužini  $\lambda=750$  nm.

Izračunavanje sadržaja ukupnih fenola sračunatih na hlorogensku kiselinu se vrši na osnovu vrednosti apsorbance i jednačine dobijene za masu hlorogenske kiseline, a računski odredi sadržaj ukupnih fenola sračunatih na hlorogensku kiselinu.

#### 4.9. Analiza ekstrakata hromatografijom na tankom sloju silika gela

Hromatografija je izvedena upotrebom gotovih HPTLC-ploča sa silika gelom 60 F<sub>254</sub>.

**Uzorak tečnog ekstrakta.** Uzorak tečnog ekstrakta je pripremljen na sledeći način: droga ( 5 g) je ekstrahovana etanolom (50 g) u ultrazvučnom kupatilu. Rastvor (15 ml=1,5 g droge), je podvrgnut uparavanju pod sniženim pritiskom na rotacionom uparivaču, radi odstranjivanja rastvarača. Suvi ostatak je rastvoren u metanolu (5 ml). Na tanak sloj se nanosi rastvor (10 $\mu$ l).

**Uzorak suvog ekstrakta.** Suvi ekstrakt (500 mg) je rastvoren u metanolu (10 ml) i na tanak sloj se nanosi 10 $\mu$ l.

Uzorci koji su pripremljeni za identifikaciju ginkolida korišćeni su i za identifikaciju flavonoida.

**Analiza ginkolida.** HPTLC-ploče se pre nanošenja uzorka unose u rastvor koji se dobija rastvaranjem natrijum acetata (8 g) u smeši etanol-voda (6:4) (200 ml). Ploče se drže u rastvoru 2 s, a zatim suše na sobnoj temperaturi 5 min. Nakon toga se aktiviraju, zagrevanjem na 90°C u toku 30 min.

**Razvijanje hromatograma.** Nakon nanošenja uzorka na tanak sloj silikagela ploče se unose u kadu zasićenu pokretnom fazom: toluol-etilacetat-aceton-metanol (20: 10: 10: 1,2; v/v/v/v) za analizu ginkolida, odnosno, etilacetat–sirćetnakiselina–mravljakiselina-voda (72: 6,5: 6,5: 15; v/v/v/v) za analizu flavonoida.



**Detekcija ginkolida i flavonoida.** Nakon razvijanja hromatograma ginkolida isti se tretira rastvorom anhidrida sirćetne kiseline, a zatim zagreva na 180°C, 10 min. Posmatranjem pod UV svetlošću na 254 i 366 nm identifikuju se pojedini ginkolidi.

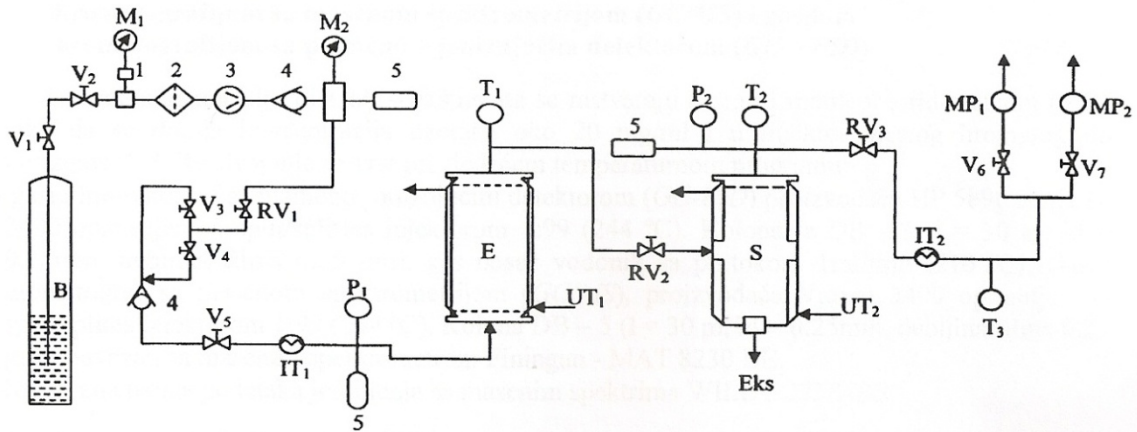
Radi identifikacije flavonoida, hromatogram se tretira NP/PEG reagensom (Natural products-polyetilenglikol reagent), koji se priprema na sledeći način: 2-aminoetil estar difenil borne kiseline (250 mg) se prenese u erlenmajer od 50 ml i postepeno dodaje metanol dok se potpuno ne rastvori, do ukupne mase (25 g). Ovako dobijeni rastvor je 1%. Polietilenglikol 4000 (2,5 g) se rastvori u etanolu uz blago zagrevanje (ukupna masa rastvora 50 g). Dobijeni rastvor ima masenu koncentraciju 5%. Hromatogram flavonoida se prvo tretira metanolnim rastvorom 2-aminoetil estrom difenil borne kiseline (NP), a zatim etanolnim rastvorom polietilenglikola-4000 (PEG) (radi povećanja osetljivosti detekcije). Hromatogram se posmatra (nakon 15 min) pod UV svetlošću na 254 i 366 nm.

#### **4.10. Postupak ekstrakcije droge primenom ugljenik (IV)-oksida u pod pritiskom.**

Droga je ekstrahovana u uređaju HPEP-High Pressure Extraction Plant, (NOVA-Swiss). Glavni delovi i karakteristike uređaja prema fabričkoj specifikaciji su kompresor sa dijafragmom (do 1000 bar), ekstraktor sa unutrašnjom zapreminom 200 cm<sup>3</sup> (p<sub>max</sub>= 700 bar), separator unutrašnje zapremine 200 cm<sup>3</sup> (p<sub>max</sub>= 250 bar), maksimalni protok CO<sub>2</sub> oko 5,7 kg/h. U separatoru je smeštena kiveta prečnika 30 mm i visine 115 mm, u koju se skuplja izdvojeni ekstrakt. Šema uređaja je data na Slici 53.

##### *Postupak ekstrakcije:*

U ekstraktor se unese lišće ginka (60 g), ispitivanog stepena usitnjenosti, isti zatvori i kroz drogu propušta ugljendioksid u gasovitom stanju 5 min. Potom se ekstrakcija vrši na zadatom pritisku, temperaturi i protoku ugljendioksida određeno vreme. Maksimalno odstupanje parametara u toku rada je ± 2,5 %. Ekstrakcija se prekida zatvaranjem veze između ekstraktora i separatora i ispuštanjem ugljendioksida iz separatora (uslovi separacije p = 15 ± 1 bar, t = 25 ± 1°C). Izlazna temperatura ugljendioksida pri kojoj je kalibrisan merač protoka je iznosila 20°C. Izdvojena masa ekstrakta (u kivetu) se meri i izračunava prinos ekstrakcije.



Slika 37. Šema uređaja za ekstrakciju pod visokim pritiskom  
*B* – boca sa ugljendioksidom; *1* – merni konektor; *2* – filter; *3* – kompresor sa dijafragmom; *4* – kontrolni ventil; *5* – sigurnosni ventil; *V* – ventil; *M* – manometar;  
*RV* – regulacioni ventil; *IT* – izmenjivač toplote; *P* – merač pritiska; *E* – ekstraktor ( $V = 200 \text{ cm}^3$ ); *T* – termometar; *UT* – ultratermostat; *S* – separator; *Eks* – ekstrakt;  
*MP* – merač protoka

Slika 53. Šema uređaja za ekstrakciju pod visokim pritiskom

#### 4.10.1. Ispitivanje kinetike ekstrakcije lišća ginka primenom ugljenik (IV)-oksida pod pritiskom

Kinetika ekstrakcije je ispitivana sa istim uzorkom droge, na taj način, što se po isteku određenog vremena, meri masa izdvojenog ekstrakta i ekstrakcija nastavi, do sledeće kinetičke tačke, kada se postupak merenja i ekstrakcije ponavlja.

Vrednosti  $q_i'$  se izračunavaju kumulativno.

Za određivanje količine ekstraktivnih materija u polaznoj drogi ( $q_0$ ), ekstrakcija droge najvećeg stepena usitnjenosti ugljendioksidom je vršena 20 h pri uslovima natkritične ekstrakcije i 40 sati za ekstrakciju tečnim ugljendioksidom.

**4.10.2. Određivanje sadržaja etarskog ulja u  $\text{CO}_2$ -ekstraktima.**  $\text{CO}_2$  ekstrakt (oko 0,5 g, tačno izmerena masa) u staklenoj posudici, unese se u balon od 1000 ml, doda destilovana voda (400 ml), postavi nastavak za destilaciju etarskog ulja i destilacija vrši u svemu identično kao poglavlju 4.3.

**4.10.3. Određivanje ostatka ekstrakta nakon izdvajanja etarskog ulja destilacijom vodenom parom.** Nakon izdvajanja etarskog ulja destilacijom pomoću vodene pare iz  $\text{CO}_2$

ekstrakta, ostatku u balonu se doda smeša rastvarača metilenhlorid-petroletar (7:3, v/v) (70 ml) i ekstrakt prenosi u levak za odvajanje (1 l). Nakon odvajanja organskog sloja prenese u čašu i ostatak u levku za odvajanje ekstrahuje još sa 2 puta 30ml smeše rastvarača. Ekstrakti se spoje, suše bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odvoji sulfat, i nakon odstranjivanja rastvarača izmeri masa.

#### **4.11. Analiza etarskog ulja i CO<sub>2</sub>-ekstrakta gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (GC-MS)**

Za kvantitativnu i kvalitativnu analizu etarskih ulja i CO<sub>2</sub> ekstrakata ginka korišćen je gasni hromatograf HP GCD G 1800A (Hewlett Packard (Agilent), Palo Alto, CA, USA), kolona HP-5 MS (30,0 m x 0,25 mm; 0,25µm), pri sledećem temperaturno programu:

injektor 250°C;

detektor 280°C;

početna temperatura 50°C;

porast temperature: 20°C/min do 130°C (1 min);

zatim: 9°C/min do 280°C (8,33 min);

ukupno vreme analize: 30 min;

uzorci su rastvoreni u etilacetatu: 5,45 mg/ml;

Auto sampler/injektor Hewlett Packard HP6890

injektovana zapremina: 1µl;

protok helijuma: 0,7 ml/min;

raspon masa: 45-425 D;

energija jonizacije 70eV

baza podataka: Wiley.

## **5. ZAKLJUČAK**

Semipreparativnim postupkom izdvojeno je etarsko ulje iz lišća ginka destilacijom pomoću vodene pare i određeni su neki fizičko-hemijski parametri. Izdvojeno ulje ima sledeće karakteristike:

izgled ..... bistra, žućkasto obojena tečnost

indeks refrakcije,  $n_D^{30}$  ..... 1,4732

specifični ugao skretanja,  $\alpha_D^{21,5}$  .....  $-1,19^\circ$

Takođe, destilacijom pomoću vodene pare određen je sadržaj etarskog ulja koji iznosi 0,0083 % ( m/m).

Primenom smeše alkohol-voda kao rastvarača i različitih koncentracija alkohola, a na osnovu određivanja ukupnih ekstraktivnih materija i sadržaja ukupnih flavonoida i fenola u dobijenim ekstraktima, primenom postupka maceracije uz stalno mešanje, odabrana je koncentracija alkohola u smeši 40%.

Ispitana je kinetika ekstrakcije ukupnih ekstraktivnih materija tokom vremena primenom odabranog rastvarača pri čemu je zaključeno da se u toku ekstrakcije uočavaju dva perioda ekstrakcije: period brze ekstrakcije gde se prenos mase odvija konvektivnim putem iz razorenih ćelija i period spore ekstrakcije (prenos mase se vrši molekulskom difuzijom).

U ispitivanjima je primenjena droga različitog stepena usitnjenosti određena srednjim prečnikom čestica  $d$  ( $d_1=0,190$  mm,  $d_2=0,467$  mm i  $d_3=1,009$  mm).

Određen je koeficijent brze ( $b$ ) i spore ( $k$ ) ekstrakcije kao mera kinetičkog ponašanja ekstrakcije. Nađeno je da prinos ekstrakcije raste od nižeg ka višem stepenu usitnjenosti droge tj. vrednosti  $b$  i  $k$  rastu od 0,066 do 0,857 odnosno za  $k$  od 0,641 do 0,758  $h^{-1}$ . Na osnovu rezultata ispitivanja kinetike reakcije, aproksimativno su izračunate vrednosti koeficijenta unutrašnje difuzije  $D_u$  za pretpostavljeni oblik čestica (cilindar i ploča).

Zaključeno je da su vrednosti koeficijenta unutrašnje difuzije reda veličine  $10^{-9}$   $cm^2/s$  i da se smanjuju ka česticama većeg stepena usitnjenosti. Nađeno je da koeficijent unutrašnje difuzije kod čestica za koje se predpostavlja oblik cilindra imaju veće vrednosti za razliku od čestica za koje je predpostavljeno da imaju oblik ploče.

Za dobijanje tečnog ekstrakta sa visokim sadržajem ukupnih ekstraktivnih materija, koji se direktno može primeniti za dobijanje suvog ekstrakta u sušnicama sa raspršivanjem, primenjen je postupak višestupne protivstrujne ekstrakcije (5 stupnjeva) sa varijantom izdvajanja prvih ekstrakata (perkolata). Ukupni ekstrakt sadrži relativno visok procenat ekstraktivnih materija (17,06 %, m/m). Pored ovoga i sadržaj ukupnih flavonoida sračunat na

rutin je relativno visok (0,46 %, m/m). U dobijenom ekstraktu je određen i sadržaj alkohola (33 %, m/m) i indeks refrakcije  $n_D^{20} = 1,3804$ .

Iz tečnog ekstrakta dobijen je suvi ekstrakt postupkom sušenja u sušnici sa raspršivačem (spray dryer) pri sledećim parametrima sušenja: ulazna temperatura je 125°C, izlazna temperatura je 70-80°C, protok tečnog ekstrakta 2 l/h. Zaključeno je da suvi ekstrakt ima sledeće karakteristike: sadržaj vlage 8%, sadržaj ukupnih flavonoida sračunatih na katehin 0,913% , ukupnih fenola sračunatih na hlorogensku kiselinu 6,68%.

Na osnovu kvalitativnog i kvantitativnog sastava tečnog i suvog ekstrakta lišće ginka ispitano hromatografijom na tankom sloju silikagela može se zaključiti da su dobijeni ekstrakti (tečni i suvi) složenog hemijskog sastava sa dominantnim komponentama kao što su ginkolidi, fenoli (hlorogenska kiselina), flavonoidi (rutin) i dr.

Na kraju se može izvesti generalni zaključak da dobijeni suvi ekstrakt može da posluži kao aktivna komponenta u mnogim farmaceutskim preparatima, u različitim farmaceutskim oblicima (tablete, kapsule i dr.).

Izvršena je ekstrakcija lišća ginka primenom ugljenik (IV)-oksida pod pritiskom kao ekstragensa primenom izotermnog i izobarnog postupka.

Najpre je ispitan uticaj protoka rastvarača na konstantnom pritisku (100 bar) i konstantnoj temperaturi (40°C) za određeni stepen usitnjenosti droge. Iz rezultata se zaključuje da je najpovoljniji protok rastvarača pri ekstrakciji lišća ginka 0,194 kg/h. Ovaj protok rastvarača kao najpovoljniji korišćen je u svim ostalim ispitivanjima.

Određivanje koeficijenta brze i spore ekstrakcije, kao parametara ekstrakcije, pri ispitivanju prinosa ekstrakcije korišćenjem droge različitog stepena usitnjenosti ( $d_1=0,190$  mm,  $d_2=0,467$  mm i  $d_3=1,009$  mm) se zaključuje da se najveći prinos ekstrakcije ostvaruje korišćenjem droge najvišeg stepena usitnjenosti. Znači da stepen usitnjenosti droge igra značajnu ulogu pri operaciji ekstrakcije. Isti zaključci se mogu izvesti kao i kod ekstrakcije droge različitog stepena usitnjenosti primenom klasičnog rastvarača (smeša alkohol-voda). Pri ekstrakciji droge tečnim ugljen (IV)-oksidom uticaj stepena usitnjenosti na prinos ekstrakcije je minimalan. Približno iste vrednosti koeficijenta brze ekstrakcije (0,46 do 0,48) su dobijene pri ekstrakciji za sva tri stepena usitnjenosti droge.

Na osnovu rezultata ispitivanja prinosa ekstrakcije primenom tečnog ugljenik (IV)-oksida izotermnim postupkom pri različitim pritiscima (80,130,180 i 230 bar) zaključeno je da se sa porastom pritiska prinos ekstrakcije u svim slučajevima izotermnih postupaka povećava (od 0,72 do 1,51 g/100 g droge). Sa porastom pritiska raste prinos ekstrakcije i kod ekstrakcije sa natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom (od 0,25 do 2,50 g/100 g droge), jer se sa

povećanjem pritiska povećava gustina ekstragensa, i samim tim i moć rastvaranja ekstragensa, što se odražava na prinos ekstrakcije. Povećanje prinosa sa porastom pritiska dolazi više do izražaja kod ekstrakcije sa natkritičnim CO<sub>2</sub>, gde se prinos ekstrakta poveća i 9 puta (na primer na 50°C).

Iz rezultata ispitivanja prinosa ekstrakcije lišća ginka pri izobarnim postupcima tečnim ugljenik (IV)-oksidom (p=80, 130, 180 i 230 bar; T=15, 20, 25°C) i natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom (p=100, 140 i 180 bar; T=40, 50 i 60°C) zaključak o uticaju temperature na prinos ekstrakcije ne može jednoznačno da se izvede. Porast temperature na konstantnom pritisku dovodi do pada gustine rastvarača, što dovodi do smanjenja rastvorljivosti, dok s druge strane dovodi do porasta napona pare rastvorene komponente, što dovodi do povećanja rastvorljivosti. Ako je isparljivost komponente dominantan efekat, povećanje rastvorne moći se postiže izobarskim povećanjem temperature. Rastvorljivost komponente može da se poveća, smanji ili ostane ista sa povećanjem temperature na konstantnom pritisku, u zavisnosti od toga koji uticaj je dominantniji.

Primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) izvršena je analiza selektovanih CO<sub>2</sub>-ekstrakata: ekstrakt dobijen natkritičnim ugljendioksidom (p=100 bar, T=40°C, w=0,095 kg/h, τ=4h), tečnim ugljendioksidom (p=130 bar T=20°C, w=0,194 kg/h, τ=3h), dobijen metilen hloridom kao rastvaračima.

Zaključeno je da analizirani ekstrakti sadrže različite grupe jedinjenja koje su podeljene kao n-alkani, račvasti alkani, cikloalkani, jedinjenja sa kiseonikom gde su posebno apostrofirana jedinjenja koja spadaju u grupu fenola sa zasićenim i nezasićenim alkil ostacima. Zaključeno je da ekstrakt dobijen tečnim ugljenik (IV)-oksidom sadrži najveći broj komponenata tj. najveći sadržaj gore klasifikovanih jedinjenja (48,67%), ekstrakt dobijen natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom (33,80%) i ekstrakt dobijen metilen hloridom (12,82%).

Najniža vrednost je dobijena korišćenjem metilen hlorida kao estragensa, što govori o visokoj neselektivnosti datog rastvarača.

Iz rezultata dobijenih analizom etarskog ulja iz CO<sub>2</sub>-ekstrakata i metilenhloridnog ekstrakta zaključuje se da je etarsko ulje izdvojeno iz ekstrakta dobijenog tečnim i natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom sadrži skoro dvostruko više ukupnih komponenata (77,67 odn. 78,90% ) u odnosu na etarsko ulje iz metilenhloridnog ekstrakta (40,74%). Sadržaj n-alkana u etarskim uljima izolovanim iz odgovarajućih ekstrakata i droge kreće se od 11,54% do 18,96%, dok je sadržaj supstituisanih n-alkana veoma nizak. Najprisutniji n-alkan i u CO<sub>2</sub>-ekstraktima i u etarskim uljima dobijenim uz odgovarajućih ekstrakta, je n-

pentakozan. Komponenta koja je prisutna u svim analiziranim ekstraktima i etarskim uljima je 4,8,12,16-tetrametil-heptadekan -4-olid i fenol sa zasićenim alkil ostatkom.

Upoređivanjem etarskog ulja dobijenog destilacijom vodenom parom iz CO<sub>2</sub>-ekstrakta i metilenhloridnog ekstrakta sa etarskim uljem dobijenim iz droge se zaključuje da izdvojeno etarsko ulje iz pomenutog ekstrakta sadrži znatno veći broj komponenata od etarskog ulja izdvojenog iz droge, te se može reći da ova konstatacija potvrđuje ranije donešen zaključak o slobodnom i vezanom ulju.

Modelovanjem ekstrakcije lišća ginka ugljenik (IV)-oksidom pod pritiskom korišćenjem model jednačine Naik i saradnika, modifikovane model jednačine Reverchon i Sesti-Osseo i modela koji predlaže Sovová, se zaključuje da se eksperimentalni rezultati ispitivanja ekstrakcije lišća ginka ugljenik (IV)-oksidom pod pritiskom relativno dobro fituju pomenutim modelima. Zaključuje se da model koji koristi Sovová na ekstrakciju ginka natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom, pri ispitivanju zavisnosti prinosa ekstrakcije od pritiska, na konstantnoj temperaturi, pokazuje bolju saglasnost sa eksperimentalnim rezultatima od drugih modela u konkretnom slučaju.

Rezultati ispitivanja metodom odzivne površine su pokazali da je model polinoma drugog reda dovoljno dobar da se opiše i proceni odziv promenljive (prinos ekstrakta) sa promenama procesnih parametara za superkritičnu ekstrakciju unutar eksperimentalnog opsega. Statistička analiza eksperimenata ukazala je značajni uticaj na proces ekstrakcije odnosno na prinos ekstrakta pokazuju pritisak i vreme ekstrakcije (linearni član), kvadrat temperature i međusobni uticaj pritiska i temperature.

Zasnovano na datom modelu i datom opsegu parametara, izračunati su optimalni uslovi za ekstrakciju lišća ginka, i oni su 184,4 bar, 52,7 °C and 3,86 h. Pod tim uslovima eksperimentalne vrednosti i procenjene-izračunate vrednosti su u dobroj saglasnosti, pa prema tome ova metodologija može da obezbedi osnovu za model kojim bi se utvrdila nelinearna priroda između nezavisnih promenljivih i dobio odgovor o optimalnim vrednostima parametara procesa za relativno kratko vreme i mali broj eksperimenata. Procenjeni prinos ekstrakta za ispitivani interval parametara procesa je 2,39%.

## 6. LITERATURA

1. I. Žižović, Ekstrakcija etarskih ulja natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom-Matematičko modelovanje na nivou sekrecione strukture, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2009
2. D. Parojčić, D. Stupar, Istorijski osvrt na lekovito bilje i njegovu upotrebu u farmakologiji, Timočki glasnik 28 (2003) 101-109
3. H. Tanko, D.J. Carrier, L. Duan and E. Clausen, Pre- and post-harvest processing of medicinal plants, *Plants Genetic Resources* 3 (2) (2005) 304-313
4. A. Tolić, Operacija ekstrakcije tečno-tečno, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1996
5. Ž. Lepojević, Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2000.
6. B. Pekić, Hemija i tehnologija farmaceutskih proizvoda (alkaloidi i etarska ulja), Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1983.
7. S. G. Deans, In *Essential Oils Waxes*, H. F. Linskens and J.F.Jackson (Eds), Springer-Verlag, Vol. 12, Berlin, Heidelberg, New York, 1991
8. B. Pekić, D. Miljković, Hemija i tehnologija kardiotičnih glikozida, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1980.
9. S. Milić, Ž. Lepojević, D. Adamović, I. Mujić, Z. Zeković, Comparison of mentha extracts obtained by different extraction methods, *Acta Periodica Tehnologica*, Faculty of Tehnology, Novi Sad 37(2006) 145-154
10. E. Reverchon, Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oil and related products, *J. Supercrit. Fluids* 10 (1997) 1-37
11. E. Reverchon, G. Della Porta, F. Senatore, Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Fractionation of Lavander Essential Oil and Waxes, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 1654-1658.
12. E. Lack, H. Seidlitz, Extraction of Food Ingredients with supercritical CO<sub>2</sub>, 9<sup>th</sup> World Congress of Food Science and Tehnology, Budapest, Hungary, 1995, 30-33
13. D. Skala, I. Žižović, S. Gavrančić, Primena natkritične ekstrakcije u prehrambenoj industriji, *Hem. Ind.* 56 (5) (2002) 179-190
14. H. Brongle, CO<sub>2</sub> As a Solvent: Its Properties and Applications, *Chemistry and Industry*, 1982, p 385-390
15. G. D.Porta, S. Porcedda, B. Marongiu, E.Reverchon, Isolation of eucalyptus oil by super- critical fluid extraction, *Flav. Fragr. J.* 14 (1999) 214



16. M. Herrero, A. Cifuentes, Elena Ibanez, 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
17. S. M. Pourmortazavi, S.S. Hajimirsadeghi, Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 2-24
18. B. M. Damjanović, D. Skala, D. Petrović-Djakov, J. Baras, A comparison between the oil, hexane extract and supercritical carbon dioxide extract of *Juniperus communis* L., *Journal of Essential Oil Research* 15 (2003) 91–93
19. E. Reverchon, Iolanda de Marco, Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *J. Supercrit. Fluids* 38 (2006) 144–166
20. E. Reverchon, F. Senatore, Isolation of rosemary oil, Comparison between hydro-distillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction, *Flavour and Fragr. J* 7 (1992) 227–230
21. E. Reverchon, Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, *Journal of Supercritical Fluids* 10 (1997) 1–37
22. B. Pekić, Ekstrakcija lekovitog bilja gasovima pod pritiskom, plenarni referat, X kongres farmaceuta Jugoslavije, Novi Sad, 1988
23. M. Santrač, D. Skala, Reakcije u natkritičnom ugljen-dioksidu, *Hem. Ind.* 55 (10) (2001) 438-456
24. T. Gamse, Industrial applications and current trends in supercritical fluid technologies, *Hem. Ind.* 59 (9-10) (2005) 207-212
25. G. Yiqiang, Y. Hong, H. Bodi, N. Yuanying, W. Shaoxiao, C. Tongyi, Extraction of Natural Vitamin E from Wheat Germ by Supercritical Carbon Dioxide, *J. Agric. Food Chem.* 50 (4) (2002) 685–689
26. L. Chun-ming, Z. Ji-min, L. Hong-mei, S. Feng-riu, Supercritical Fluid extraction of total flavonoids from leaves of *Acanthopanax Senticosus* Harms, *Chem. Res. Chinese U.* 23(2) (2007) 233-236
27. M. Gorunović, P. Lulić, Farmakognozija, Farmaceutski fakultet, Beograd, 2001
28. L. Chia-Ying, L. Chun-Hua, W. Chia-Che, L. Kuo-Hsiung, W. Tian-Shung, Efficient <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Method for Improved Quality Control Analyses of Ginkgo Constituents, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3721-3725
29. L. Long-Ze, Pei Chen, M. Ozcan, and J. M. Harnly, Chromatographic Profiles and Identification of New Phenolic Components of Ginkgo biloba Leaves and Selected Products, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 6671-6679
30. T. A. van Beek, P. Montoro, Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 2002-2032

31. T.A.van Beek, Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts, J. Cromatogr. A, 967 (2002) 21-55
32. T. A. van Beek, L. T. Taylor, Sample Preparation of Standardized Extracts of *Ginkgo biloba* by Supercritical Fluid Extraction, Phytochemical analysis, 7 (1996) 185-191
33. D. Lichtblau, J. M. Berger, K. Nakanishi, Efficient Extraction of Ginkgolides and Bilobalide from Leaves, J. Nat. Prod. 65 (2002) 1501-1504
34. C.A. Rimmer, et al., Characterization of a suite of ginkgo-containing standard reference materials, Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 179-196
35. T.A. van Beek, H.A.Scheeren, T. Rantio, Ch. Melger, G.P. Lelyveld, Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves and phytopharmaceuticals, Journal of chromatography 543 (2) (1991) 375-387A
36. B. M. Suarez, Z. Ramazanov, Method for obtaining an extract from ginkgo biloba leaves, Pharmaline INC (US), US6117431, 2000.
37. P.M. Dewick, Medicinal Natural Product A Biosintetic Approach - Second Edition, John Wiler & Sons, LTD., 2001, pp. 211
38. B. D. Sloley, R. Soheir, K. A. Scherban, Y. K. Tam, Quality Control Analyses for Ginkgo Extracts Require Analysis of Intact Flavonol Glycosides, Analytical Department, Kinetana Inc., 108 Advanced Tehnology Centre, 9650- 20th Avenue N.W., Edmonton, Alberta, Canada, 6N 1G1, 2002 .
39. C. Lin, Y.R. Lin, C.Y. Huang, K.C. Wen, Evaluation of Quantitative Analysis of Flavonoids Aglicones in *Ginkgo biloba* Extract and Its Products, National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan, 161-2, Kuen Yang Street, Nankang 115, Taipei, Taiwan, R.O.C., 2000.
40. M. J. Dubber, I. Kanfer, High-performance liquid chromatographic determination of selected flavonols in *Ginkgo biloba* solid oral dosage forms, Division of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Rhodes University, Grahamstown, South Africa, 2004.
41. P.G.Pietta, P.L.Mauri, E Manera, P.L.Ceva, A. Rava, An Improved HPLC Determination of Flavonoids in Medicinal Plant Extracts, Dipartimento di Scienze e Tehnologie Biomedicine- Sez. Chimica Organica, Cromatographia Vol.27 No.9/10, Italy, 1989.
42. C. Ramassamy, F. Longpre, Y. Christen, Ginkgo biloba extract (EGb 761) in Alzheimer's disease: is there any evidence?, Curr Alzheimer Res 4 (2007) 253-62.
43. S.O. Bachurin, Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease, Medicinal Research Reviews 23 (1) (2003) 48-88.

44. D. Wheatley, Ginkgo biloba in the treatment of sexual dysfunction due to Antidepressant drugs, *Human Psychopharmacology, Clinical and Experimental* 14 (7) (1999) 512-513
45. B.G. Mahady, Ginkgo Biloba, A Review of Quality, Safety, and Efficacy, *Nutrition in Clinical Care* 4 (3) 2001 140-147
46. S. Mahadevan and Y.Park, Multifaceted Therapeutic Benefits of Ginkgo biloba L., Chemistry, Efficacy, Safety, and Uses, *J Food Sci.* 73 (1) (2008) 14-19
47. W. Zheng, S. Wang, Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs, *J. Agric. Food Chem.* 49(5) (2001) 165-170
48. Francis V. De Feudis: Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on gene expression, Possible relevance to neurological disorders and age-associated cognitive impairment, *Drug Develop. Res.* 57, Issue 4 (2002) 214-235
49. J. Pradeep Nathan, Emily Ricketts, Keith Wesnes, Ludek Mrazek, Warick Greville, Con Stough, The acute nootropic effects of Ginkgo biloba in healthy older human subjects: a preliminary investigation, *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 17 (1) (2002) 45-49
50. B. Ahlemezer, J. Krieglstein, Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract, *Cell Mol Life Sci.* 60 (2003) 1779-1792
51. L. Hoi-Seon, K. Min-J, Selective Responses of three Ginkgo biloba leaf-derived constituents on human intestinal bacteria, *J. Agric. Food Chem* 50 (2002) 1840-1844
52. A. R. Bilia, Ginkgo biloba L., *Fitoterapia* 73 (3) (2002) 276-279
53. G. Kudolo, The effect of 3-month ingestion of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on pancreatic  $\beta$ -cell function in response to Glucose loading in individuals with non-insulin-dependent diabetes mellitus, *J. Clin. Pharmacol.* 41 (2001) 600-611
54. K. Schotz, Quantification of allergenic urushiols in extracts of Ginkgo biloba leaves, in simple one-step extracts and refined manufactured material (EGb 761), *Phytochem. Analysis* 15 (1) (2004) 1-8
55. H. Nenokichi, Shogaki, Takeshi, The Essential oil of *Ginkgo biloba* L. (Icho), *Kinki Daigaku Rikogakubu Kenkyu Hokoku* 16 (1981) 47-75 (Journal written in Japanese)
56. B. Pekić, Ž. Lepojević, Industrijska prerada lekovitog i aromatičnog bilja, *Medicinal Plant Report* 1 (1994) 8-15
57. O. Sticher, Quality of Ginkgo preparations, [Planta Med.](#) 59(1) (1993) 2-11
58. Y.R. Chin Lin, C.Y. Lin, K.C. Huang, Wen, Evaluation of Quantitative Analysis of Flavonoids Aglicones in *Ginkgo biloba* Extract and Its Products, National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan, 161-2, Kuen Yang Street, Nankang 115, Taipei, Taiwan, R.O.C., 2000

59. M. J. Dubber, I. Kanfer, High- performance liquid chromatographic determination of selected flavonols in *Ginkgo biloba* solid oral dosage forms, Division of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Rhodes University, Grahamstown, South Africa, 2004
60. L. Ekman, D. Fransson, P. Cleason, M. Johansson, Development of an alternative method for determination of terpene lactones in ginkgo dry extract, Pharmeur Bio Sci Notes 1 (2009) 67-71
61. L. Wenkui, J. Fitzloff, Simultaneous determination of terpene lactones and flavonoid aglycones in *Ginkgo biloba* by HPLC with evaporative light scattering detection, Journal of Pharm.Biomed. Anal. 30 (1) (2002) 67-75
62. H. Huh, E.J.Staba, The botany and chemistry of *Ginkgo biloba* L, Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants 1 (1/2) 1992
63. Chun Yang, Yan-Rong Xu, and Wei-Xi Yao, Extraction of Pharmaceutical Components from *Ginkgo biloba* Leaves Using Supercritical Carbon Dioxide, J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 846-849
64. H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski, Plant Drug Analysis, Institut fur Pharmazeutische Biologie der Universitat Munchen, Springer- Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984.
65. Y.H.Choi, J. Kim, K.P.Yoo , Supercritical-fluid extraction of bilobalide and ginkgolides from *ginkgo biloba* leaves by use of a mixture of carbon dioxide, methanol, and water, Chromatographia 56 (11/12) (2002)753-757
66. S. F. Miao, J.P. Yu, Z. Du, Y.X. Guan, S. Jing and Z.Q. Zhu, Supercritical Fluid Extraction and Micronization of *Ginkgo* Flavonoids from *Ginkgo Biloba* Leaves, Ind. Eng. Chem. Res. **49** (2010) 5461-5466.
67. K.L. Chiu, Y.C. Cheng , J.H. Chen, C. J. Chang, P.W. Yang, Supercritical fluids extraction of *Ginkgo* ginkgolides and Flavonoids, J. Supercrit. Fluid 24 (2002) 77-87.
68. C. Yang, Y.R. Xu, W.X.Yao, Extraction of pharmaceutical components from *Ginkgo biloba* leaves using supercritical carbon dioxide, J. Agric. Food Chem. 50 (4) (2002) 846-849
69. M. Kandiah, M. Spiro, Extraction of ginger rhizomes: studies with supercritical carbon dioxide, International J Food Sci.Techn. 25 (1990) 328-338
70. N. Naik, H. Lentz, C. Maheswari, Extraction of perfumes and flavours from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapor equilibrium conditions, Fluid Phase Equilibra 49 (1989) 115-126
71. K.D. Bartle, A.A. Cliford, S.B. Hawthorne, J.J. Langenfeld, D.J.Miller, R.A.Robinson, A model for dynamic extraction using a supercritical fluid, J. Supercrit. Fluids 3 (3) )1990) 143-149

72. Reverchon E., Russo P., Stassi A, solubilities of solid octacosane C<sub>28</sub> and Triacotane C<sub>30</sub> in supercritical CO<sub>2</sub>, J. Chem. Eng. Data, 38 (1993) 458-460
73. E.Reverchon, Mathematical modeling of supercritical extraction of sage oil, AIChE Journal, 42, 6 (1996) 1765-1771
74. B.C. Roy, M. Goto, T. Hirose, The extraction of ginger oil with supercritical carbodioxide; experiments and modeling, Ind. Eng. Chem. Res. 35 (1996) 607
75. H. Sovová, Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub> – I. Modeling of extraction curves, Chem. Eng. Sci. **49** (1994) 409-414
76. Sovova, H., Kučera, J., Jež, J., Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>-II. Extraction of grape oil, Chem. Eng. Sci. 49 (3) (1994) 415-420
77. E. Reverchon , O.Sesti, D. Gorgoglione, Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of basil oil; Caracterization of products and process modeling, J. Supercrit, Fluids 7 (1994) 185-190
78. B. Pekić, A. Tolić, Ž. Lepojević, Z. Zeković, Application of our modification of the reverchon-sesti osseo equation to the supercritical extraction of camomile flower by carbon dioxide, 1<sup>st</sup> International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Chemical Sciences and Industry, 1-4 June 1998, Halkidiki, Greece, Book of Abstracts, Vol. 1, PO 42026
79. Z. Zeković, Ž. Lepojević, A. Tolić, Modeling of Thyme-Supercritical Carbon Dioxide Extraction System. I The Influence of Carbon Dioxide Flow Rate and Grinding Degree of Thyme, Sep. Sci. Technol. 36 (2001) 3459-3472
80. Z. Zeković, Ž. Lepojević, A. Tolić, Modeling of Thyme-Supercritical Carbon Dioxide Extraction System. II The influence of Extraction Time and Carbon Dioxide Pressure, Sep. Sci. Technol. 38 (2003) 541-552.
81. E. Reverchon, G. Della Porta, F. Senatore, Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Fractionation of Lavander Essential Oil and Waxes, J. Agric. Food Chem., Vol. 43 (1995), 1654-1658.
82. Luanda M.A.S. Campos<sup>a</sup>, Eliane M.Z. Michielin<sup>a</sup>, Leandro Danielski<sup>b</sup>, Sandra R.S. Ferreira<sup>a,\*</sup>, Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold ( *Calendula Officinalis*) oleoresin, J. of Supercrit. Fluids 34 (2005) 163-170
83. B. Nikolovski, M.Sovilj, M.Đokić, S. Vidović, Kinetika I modelovanje ekstrakcije ulja iz semena lana (*Linum usitatissimum* L.) natkritičnim ugljendioksidom, Hem. Ind. 62 (5) (2008) 283-292
84. O. Bensebia, D. Barth, B.bensebi, A. Dahmani, Supercritical Co2 extraction of rosemary: Effect of extraction parameters and modeling, J. Supercrit. fluids 49 (2009) 161-166

85. H. Sovova, Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation, *J. Supercrit. Fluids* 33 (2005) 35-52
86. M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibanez, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae, *Food Chem.* **98** (2006) 136-148
87. E. Langa, G. Della Porta, A.M.F Palavra, J.S.Urieta, A.M.Mainar, Supercritical fluid extraction of Spanish sage essential oil: Optimization of the process parameters and modeling, *J. Supercrit. Fluids* 49 (2009) 174-181
88. E. Reverchon, L. Sesti Osseo, Modelling the supercritical extraction of basil oil, *Proc. 3 rd Int. Symp. Supercritical Fluids*, Vol. 2 (1994) 189
89. J. M. del Valle M. Jimenez J.C. de la Fuente, Extraction kinetics of pre-pelletized Jalapeno peppers with supercritical CO<sub>2</sub>, *J. Supercrit. Fluids* 25 (2003) 33-44
90. T. Lu, F. Gaspar, R. Marriott, S. Mellor, C. Watkinson, B.Al-Duri<sup>a</sup>, J. Seville, R. Santos, Extraction of borage seed oil by compressed CO<sub>2</sub>: Effect of extraction parameters and modelling, *J. Supercrit. Fluids* 41 (2007) 68-73
91. Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E.M.,: „ Plant Drug Analysis“, Institut fur Pharmazeutische Biologie der Universitat Munchen, Sringer- Verlag Berlin Heidelberg New York, Tokyo, 1984
92. D. Bas, I.H. Boyaci, Modeling and optimization. I. Usability of response surface methodology, *J. Food Eng.* **78** (2007) 836-845
93. H. Z. Zhang Wang, S.Y. Xu: Optimization of processing parameters for cloudy ginkgo (*Ginkgo biloba* Linn.) juice, *J. Food Eng.* **80** (2007) 1226-1232
94. A. Bezerra, R.E.Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escalera, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* **76** (2008) 965-977
95. H. Shekarchizadeh, M. Kadivar, H.S. Ghaziaskar, M. Rezayat, Optimization of enzymatic synthesis of cocoa butter analog from camel hump fat in supercritical carbon dioxide by response surface method (RSM), *J. Supercrit. Fluid* **49** (2009) 209-215.
96. Z. Wei, A.M. Liao, H.X. Zhang, J. Liu, S.T. Jiang, Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of silkworm pupal oil applying the response surface methodology *Bioresour. Technol.* **100** (2009) 4214-4219
97. S. Liu, F. Yang, C. Zhanga, H. Ji, P. Hong, C. Deng, Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of Passiflora seed oil by response surface methodology, *J. Supercrit. Fluid* **48** (2009) 9-14.

98. Pharmacopoea Jugoslavica, Editio quarta (Ph. Jug. IV), Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, Beograd (1984)
99. Deutsches Arzneibuch, 8 (DAB 8), Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Govi verlag, Frankfurt/Main (1978)