



Univerzitet u Nišu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za hemiju



***Kinetički i termodinamički parametri ekstrakcije fenolnih jedinjenja
iz semena bundeve***

Master rad

Mentor

Prof. dr Milan Mitić

Kandidat

Jelena Stojiljković 110

Niš, 2018. god

	ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ	
	КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА	
Редни број, РБР:		
Идентификациони број, ИБР:		
Тип документације, ТД:	Монографска	
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички	
Врста рада, ВР:	Мастер рад	
Аутор, АУ:	Јелена Стојиљковић	
Ментор, МН:	др Милан Митић	
Наслов рада, НР:	Кинетички и термодинамички параметри екстракције фенолних једињења из семена бундеве	
Језик публикације, ЈП:	Српски	
Језик извода, ЈИ:	Српски	
Земља публиковања, ЗП:	Србија	
Уже географско подручје, УГП:	Србија	
Година, ГО:	2018	
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт	
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33	
Физички опис рада, ФО:	5 поглавља; 50 страна; 10 табела; 12 графичких приказа	
Научна област, НО:	Хемија	
Научна дисциплина, НД:	Аналитичка хемија	
Предметна одредница/ Кључне речи, ПО:	Кинетика; Термодинамика; Екстракција; Фенолна једињења	
УДК	547.56 : [631.53.01 + 635.62]	
Чува се, ЧУ:	Библиотека	
Важна напомена, ВН:		
Извод, ИЗ:	Кинетика екстракције ванилинске киселине из семена бундеве је моделована коришћењем три модела: модела заснованог на теорији нестационарне дифузије кроз биљни материјал, модела заснованог на теорији филма и емпиријског модела Пономарјева. Уз помоћ ова три модела, одређени су коефицијенти испирања (б) и коефицијенти споре екстракције (к) а потом и термодинамички параметри. Садржај ванилинске киселине у екстрактима одређен је HPLC-DAD методом.	
Датум прихватања теме, ДП:		
Датум одбране, ДО:		
Чланови комисије, КО:	Председник:	др Данијела Костић
	Члан:	др Ивана Рашић-Мишић
	Члан, ментор:	др Милан Митић

	ПРИРОДНО – МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ	
	KEY WORDS DOCUMENTATION	
Accession number, ANO :		
Identification number, INO :		
Document type, DT :	Monographic	
Type of record, TR :	textual / graphic	
Contents code, CC :	Master work	
Author, AU :	Jelena Stojiljković	
Mentor, MN :	dr Milan Mitić	
Title, TI :	Kinetics and thermodynamic parameters of the process extraction of phenolic compounds from pumpkin seeds	
Language of text, LT :	Serbian	
Language of abstract, LA :	English	
Country of publication, CP :	Serbia	
Locality of publication, LP :	Serbia	
Publication year, PY :	2018	
Publisher, PB :	author's reprint	
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33	
Physical description, PD :	5 chapters; 50 pages; 10 tables; 12 graphic representations	
Scientific field, SF :	Chemistry	
Scientific discipline, SD :	Analytical Chemistry	
Subject/Key words, S/KW :	Kinetics; Thermodynamic; Extraction; Phenolic compounds	
UC	547.56 : [631.53.01 + 635.62]	
Holding data, HD :	Library	
Note, N :		
Abstract, AB :	The extraction of vanillic acid from pumpkin seeds was modeled using three models: a model based on the theory of non-linear diffusion through plant material, a theory based on film theory and an empirical model of the Ponomarev. With the help of these three models, were determined the rinse coefficients (b) and coefficients of the slow extraction (k) and then the thermodynamic parameters. The content of vanillic acid in the extracts was determined by the HPLC-DAD methods.	
Accepted by the Scientific Board on, ASB :		
Defended on, DE :		
Defended Board, DB :	President:	dr Danijela Kostić
	Member:	dr Ivana Rašić-Mišić
	Member, Mentor:	dr Milan Mitić

*Eksperimentalni deo ovog master rada rađen je u Laboratoriji za analitičku i fizičku hemiju
(Departman za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu).*

*Zahvaljujem se svom mentoru, profesoru dr Milanu Mitiću, na pomoći u izradi ovog master
rada, ukazanom strpljenju i razumevanju.*

*Posebnu i veliku zahvalnost dugujem mojim roditeljima, sestri, zetu i prijateljima na
bezgraničnoj podršci, strpljenju i razumevanju koju su mi pružili tokom studiranja.*

Hvala Vam!

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO.....	4
2.1. BUNDEVA	5
2.1.1. Sistematika i poreklo uljane tikve	5
2.1.2. Cucurbita pepo L., obična tikva	6
2.2. FENOLNA JEDINJENJA.....	9
2.2.1. Fenolne kiseline	9
2.3. EKSTRAKCIJA	11
2.3.1. Ekstrakcija čvrsto-tečno.....	11
2.3.2. Matematičko modelovanje.....	14
2.3.2. Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji u biljnoj sirovini.....	14
2.3.3. Model zasnovan na teoriji filma.....	17
2.3.3. Empirijska jednačina Ponomarjeva	18
2.4. TEČNA HROMATOGRAFIJA VISOKIH PERFORMANSI (HPLC)	19
2.4.1. Kvalitativna i kvantitativna analiza	21
3. EKSPERIMENTALNI DEO	23
3.1. Biljna sirovina	24
3.2. Ekstrakcija iz biljne sirovine	24
3.3. Inicijalni sadržaj vanilinske kiseline u semenima tikve (q_0).....	24
3.4. Sadržaj vanilinske kiseline u zasićenom ekstraktu (C_s)	24
3.4. Aparati.....	25
3.5. HPLC analiza etanolnih ekstrakata semena tikve.....	26
3.7. Statistička obrada podataka	27
4. REZULTATI I DISKUSIJA	28
4.1. Modelovanje kinetika ekstrakcije vanilinske kiseline iz semena bundeve	29
4.1.1. Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal	31
4.1.2. Model Ponomarjeva	32
4.1.3. Model zasnovan na teoriji filma.....	33

4.2. Kinetički parametri	35
5. ZAKLJUČAK	38
LITERATURA	40

1. UVOD

Povezanost čoveka i biljaka datira još od davnina. Čovek je biljke prvenstveno koristio u ishrani, a kasnije i u lečenju. Kroz istoriju čovečanstva, biljke su dobijale sve veći značaj kao izvor biološki aktivnih supstanci i lekova.

Pored neospornog značaja za farmaceutsku industriju, prirodni proizvodi biljaka nalaze široku primenu u proizvodnji dijetetskih suplemenata i funkcionalne hrane, koja pored zadovoljavajućih nutritivnih svojstava ispoljava i određene farmakološke i fiziološke efekte na ljudsko zdravlje, što je od velikog značaja u prevenciji nastanka bolesti savremenog čoveka.

Bundeva ili tikva (lat. *Cucurbita pepo*) je jednogodišnja biljka puzavica iz familije bundeva (Cucurbitaceae), čiji se krupni plodovi koriste u ljudskoj ishrani a semena i u fitoterapiji.

Seme bundeve se odlikuje većom hranljivom vrednošću. Sadrži visok procenat ulja, 40 – 51%, u zavisnosti od sorte, visok procenat proteina, 30 – 40%, sadržaj ukupnih ugljenih hidrata se kreće od 10 do 20%, dok je voda zastupljena sa oko 5%. Ima oko 2% mineralnih materija i pektina. Bogato je vitaminima rastvorljivim u ulju (D, K i PP), vitaminima B1 i B2, celulozom, fosforom i salicilnom kiselinom i dr. Kukurbitin i L-triptofan su specifične aminokiseline koje ulaze u sastav proteina. Jedan gram proteina semena tikve sadrži triptofana koliko i puna čaša mleka. Seme je dobar izvor magnezijuma, mangana, fosfora i fitosterola.

Visok sadžaj vitamina A i C, kao i hidrokisi kiseline redukuje tragove starenja. Pečeno seme uljane tikve sa ljuskom nazvane "semenke" najčešće se koriste za direktno konzumiranje i takav način korišćenja semena tikve posebno je karakterističan za područje Balkana i Bliskoistočnih zemalja.

Ulje semena tikve zauzima posebno mesto među hladno presovanim uljima kod nas, s obzirom na to da proizvodnja ovog ulja ima veoma dugu tradiciju na našim prostorima. Naime, semenka bundeve je bila prva semenska uljarica odnosno prva sirovina za industriju ulja, koja je tek posle Prvog svetskog rata prepustila svoje mesto uljanjoj repici suncokretu.

Danas se ulje semena tikve dobija isključivo presovanjem i na našem tržištu se pojavljuje uglavnom kao hladno presovano ulje. Proizvodnja ove vrste ulja se obavlja jedino u pogonima mini uljara gde se koriste pužne prese manjih kapaciteta (6-40 kg/h), pri čemu se presuje sirovo osušeno seme, najčešće uljane tikve golice. Za proizvodnju 1 dm³ ovog specijalnog ulja, u proseku je potrebno oko 2,5 kg semena, što predstavlja oko 30-40 komada tikava. Da bi dobijeno ulje imalo sve nutritivno bitne komponente u nepromenjenom obliku, važno je voditi računa o režimu presovanja odnosno da temperatura izlaznog ulja ne bude

viša od 50°C. Povoljan sastav masnih kiselina i prisustvo raznih bioaktivnih komponenata, doprinose da ulje semena tikve pripada grupi ulja visoke nutritivne vrednosti, koje pokazuje određene pozitivne efekte u ljudskom organizmu delujući antinflamatorno, diuretski, antimikrobno, blokirajući slobodne radikale, ublažavajući negativne simptome pri benignoј hiperplaziji prostate, blagotvorno delujući na kardiovaskularni sistem i dr. Specifičan hemijski sastav veoma doprinosi i dobroј održivosti ulja semena tikve, kao i određenom antiradikalском potencijalu koje pokazuje ovo ulje.

Ekstrakcija čvrsto-tečno se uglavnom koristi za dobijanje rastvora željene supstance iz čvrstog materijala u određenom rastvaraču. Čvrsto-tečnu ekstrakciju definišu opšti zakoni prenosa mase, zatim fizičko-hemijska sličnost rastvarača i aktivnih supstanci, kao i osobine polaznog materijala. U opštem slučaju proces prenosa mase predstavlja prenos materije u smeru uspostavljanja ravnoteže. Proces difuzije je odgovoran proces prenosa mase, tj. molekulska difuzija se ostvaruje usled koncentracionog gradiјenta rastvorenih materija u fazama koje su u kontaktu. Uticaj pojedinačnih faktora na proces difuzije je definisan Fikovim zakonima difuzije.

Danas se koristi veliki broj ekstrakcionih tehnika i rastvarača za izolaciju različitih klasa biološki aktivnih jedinjenja iz biljnog materijala (terpeni, vitamini, karotenoidi, masne kiseline i dr.). Kod izbora odgovarajuće tehnike ekstrakcije treba voditi računa o toksičnosti rastvarača, selektivnosti procesa u odnosu na želјenu grupu jedinjenja, kao i na mogućnost razgradnje aktivnih komponenata u ekstraktu. Pri projektovanju procesa za izolaciju bioaktivnih ekstrakata odlučujući su sledeći faktori: (a) biljna sirovina, (b) totalni prinos koji se ostvaruje datim postupkom, (c) produktivnost, (d) selektivnost i (e) regeneracija iskorišćenog rastvarača. Prva tri faktora su direktno povezana sa ekonomskom održivošću datog procesa, četvrti sa kvalitetom i čistoćom finalnog proizvoda, dok je poslednji u vezi ne samo sa ekonomikom procesa već i sa očuvanjem životne sredine.

U ovom master radu je ispitavana kinetika i efikasnost ekstrakcije vanilinske kiseline iz semena bundeve postupkom maceracije pri različitim temperaturama i vremenima ekstrakcije korišćenjem 40% etanola kao ekstragenta.

Za modelovanje kinetike ekstrakcije čvrsto-tečno korišćeni su: model zasnovan na teoriji filma, model zasnovan na teoriji nestacionarne difuzije kroz čvrst materijal i model Ponomarjeva.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. BUNDEVA

2.1.1. Sistematika i poreklo uljane tikve

Tikve spadaju među najstarije gajene biljke. Ostaci semena tikve nađeni u dolini Oksaka u Meksiku datiraju od pre više od 1000 godina. Prema većini literaturnih podataka, kao zemlja porekla tikava navodi se Meksiko. Narodi u Evropi su imali priliku da je upoznaju tek posle otkrića Amerike.

Nije izvesno kada i kojim putevima su tikve dospele na Balkan i u naše krajeve. Naziv „tikva“ koji se, inače, sreće u svim slovenskim jezicima, potiče od starogrčke reči „sikna“, sa istim značenjem. To upućuje na pretpostavku da su tikve prenesene u naše krajeve preko Grčke, po svoj prilici iz Male Azije, gde su ruske istraživačke ekspedicije našle izvanredno bogatstvo formi, naročito u okviru vrste *Cucurbita pepo* L. (Teppner, 2000; Popović, 2000).

Tikva, *Cucurbita pepo*, u filogenetskom sistemu biljaka spada u razdeo Magnoliophyta, klasu Magnoliopsida (podklasu Rosidae), u red Cucurbitales i familiju Cucurbitaceae. Familija tikava Cucurbitaceae obuhvata oko 20 vrsta, a od toga je gajeno 5 vrsta (Karlović i Andrić, 1996; Lelley i sar., 2009):

1. *C. pepo* L. – obična ili jednostavna tikva;
2. *C. maxima* Duch ex Lam – bundeva;
3. *C. moschata* Duch ex Lam, Duch ex Poir – muskatna tikva;
4. *C. ficifolia* Bouche – smokvolisna tikva;
5. *C. mixeta* Pang – (u Evropi je nema).

Sve vrste sadrže u semenu ulje i proteine, ali je za dobijanje ulja najpogodnije seme vrste *Cucurbita pepo* L. (Karlović i Andrić, 1996).



a)



c)



b)



d)

Slika 1. a) *Cucurbita pepo* L., b) Muskatna tikva, c) Bundeve i d) Smokvolisna tikva.

2.1.2. *Cucurbita pepo* L, obična tikva

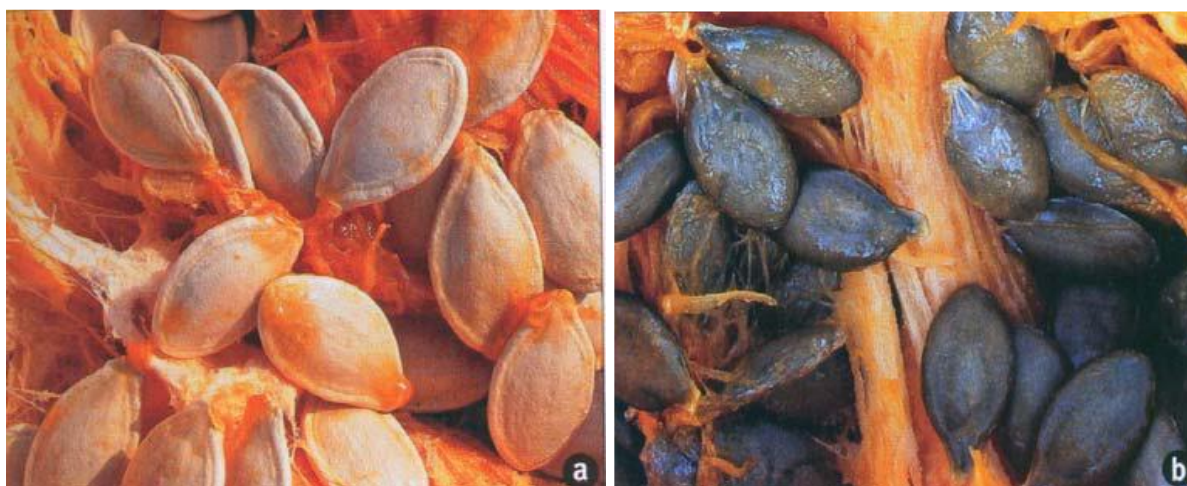
Obična tikva (*Cucurbita pepo* L.) je najrasprostranjenija vrsta tikava i odlikuje se brojnim varijetetima i formama, među kojima su najpoznatiji: uljana tikva, stočna tikva, tikvica za jelo, cukini, patison, ukrasne tikve, krivošije, strejtnek itd. (Berenji, 2010).

Za razliku od stočne, uljana tikva se prvenstveno gaji radi semena koje je bogato uljem, a meso ploda je sporedni proizvod.

Naziv „uljana bundeva“ je pogrešan jer se ne radi o bundevi (*Cucurbita maxima*) već o običnoj tikvi (*Cucurbita pepo*). U tom slučaju se i obična, stočna tikva, u užem smislu može ubrajati među uljane tikve, s obzirom da se i seme stočne tikve može iskoristiti za

dobijanje ulja. Uljana tikva je dobila naziv po semenu koje je bogato uljem. Na osnovu izgleda semena razlikuju se dve forme uljane tikve:

1. *Uljana tikva sa ljuskom*, čije je seme obloženo čvrstom semenjačom (ljuskom) bele ili žućkaste boje (slika 2a). Seme se najčešće peče i koristi za grickanje ili se oljušteno seme upotrebljava za dobijanje ulja.
2. *Uljana tikva golica* se prepoznaje po „golom“ semenu, bez čvrste semenjače (slika 2b). Prvi put se pojavila na prostorima današnje Austrije, u Štajerskoj, osamdesetih godina XIX veka, kao prirodna mutacija. I danas se tradicionalno najviše gaji u Austriji i zemljama u okruženju, Sloveniji, Mađarskoj, Nemačkoj i Hrvatskoj. Zbog popularnosti tikvinog semena i posebno ulja u ovom regionu, pojava golosemene forme je odmah prepoznata kao prednost koja je omogućavala lakše i efikasnije izdvajanje ulja.



Slika 2. Seme uljane tikve sa ljuskom (a) i uljane tikve golice (b)

Plod uljane tikve je sočan plod, bobica. Oblik ploda je u zavisnosti od sorte loptast ili spljošten, ređe valjkast. Prosečna masa iznosi 2 - 4 kg. Unutrašnjost ploda ispunjava tkivo, placenta, na kome se nalaze semena, koja su najčešće bela, po obliku jajoliko-pljosnata, na rubu delimično zadebljala i na vrhu malo zašiljena.

Prema Racu (1964) seme tikve sa ljuskom se sastoji od 24% ljuske i 76% jezgra, a osnovni hemijski sastav semena golice je sledeći, Tabela 1.

Tabela 1. Sastav semena tikve golice (Rac, 1964)

Komponenta	Udeo (%)
Ulje	42,2 – 48,8
Proteini	32,45
Voda	5,7 – 7,4
Pepeo	3,58

Seme uljane tikve je bogato uljem, proteinima, biljnim vlaknima, vitaminima i mineralima. Prema literaturnim podacima sadržaj ulja u semenu tikve golice se kreće oko 40 do 50%, a sirovih proteina oko 35 do 45% (Dimić i sar., 2003; El-Adawy i Taha, 2001). Prema podacima objavljenim od Lelleya i sar. (2009) u sastavu sirovih proteina semena tikve udeo albumina i globulina, najznačajnijih proteinskih frakcija, iznosi 59 %. Za sadržaj ulja različitih linija u oplemenjivanju, koje se obično koriste za komercijalnu proizvodnju semena, isti autori navode podatak od $46,9 \pm 2,4$ % (n=184).

Od mineralnih materija tikvino seme je posebno bogato fosforom, 1020-1090 mg/kg, kalijumom, 896-982 mg/kg i magnezijumom, 483-510 mg/kg. Iako su prisutni u malim količinama, značajni su i kalcijum, gvožđe i bakar (El-Adawy i Taha, 2001). Po rezultatima Krefta i sar. (2002) seme tikve sadrži i selen u količini od 0,023-0,037 mg/kg i jod od 0,005-0,013 mg/kg. Osim navedenih, seme tikve je bogat izvor i vitamina grupe B: 6,9 mg/kg- B1; 2,5 mg/kg- B2; 4,6 mg/kg- B6, kao i niacina 61,4 mg/kg (računato na suhu materiju) (Mansour i sar., 1993).

Prema rezultatima Younisa i sar. (2000) sadržaj ulja u semenu tikve (*Cucurbita pepo* L.) gajene u Africi se kretao od 22 do 35%, pri čemu su autori ustanovili i značajan uticaj lokaliteta uzgoja na sadržaj ulja.

Sadržaj proteina u semenu tikve se, najčešće, kreće oko 35%, sa albuminom i globulinom kao dominantnim proteinima koji čine oko 59% ukupnih proteina (Idouraine i sar., 1996). Iz semena mnogih bliskih rođaka *Cucurbita pepo* spp. izolovani su niskomolekularni tripsin inhibitori sa tri disulfidna mosta. Iako ne postoje raspoloživi podaci o prisustvu tripsin inhibitora u semenkama bez ljuske, smatra se donekle očekivanim prisustvo sličnih polipeptida, s obzirom na blisku vezu unutar familije *Cucurbita pepo*. Što se tiče aminokiselinskog sastava, nedostatak aminokiselina sa sumporom (cistein i metionin) je opisan kod bliskog rođaka uljane tikve (Mansour i sar., 1993).

Pored toga, potvrđeno je i prisustvo retkih aminokiselina, kao što su citrulin, m-karboksifenilalanin, β -pirazoalanin, γ -aminobutirik kiselina i etilasparagin. Minorne količine ugljenih hidrata, vlakana i pepela su takođe pronađene u semenu (Schicher, 1983). Limitirajuće aminokiseline proteina pogače semena tikve golice su lizin, valin, treonin i

izoleucin (Štrucelj, 1981; Mansour i sar., 1993). Prehrambena vrednost proteina (protein score) je veoma dobra, čak bolja od proteina soje, arašida, susama, pirinča, pšenice i kukuruza (Štrucelj, 1981), a svarljivost in vitro i biološka vrednost se kreću u granicama 88-97% i 73-86%, respektivno (Mansour i sar., 1993).

Semenke bundeve sadrže i fenolna jedinjenja od kojih dominiraju fenolne kiseline (vanilinska, kafena, ferulna, p-kumarna i sinapinska kiselina) i flavonoli kemferol, kvercetin i miricetin. Akomolafe i sar. (2016) su našli da je najzastupljenije fenolno jedinjenje u semenkama bundeve vanilinska kiselina.

2.2. FENOLNA JEDINJENJA

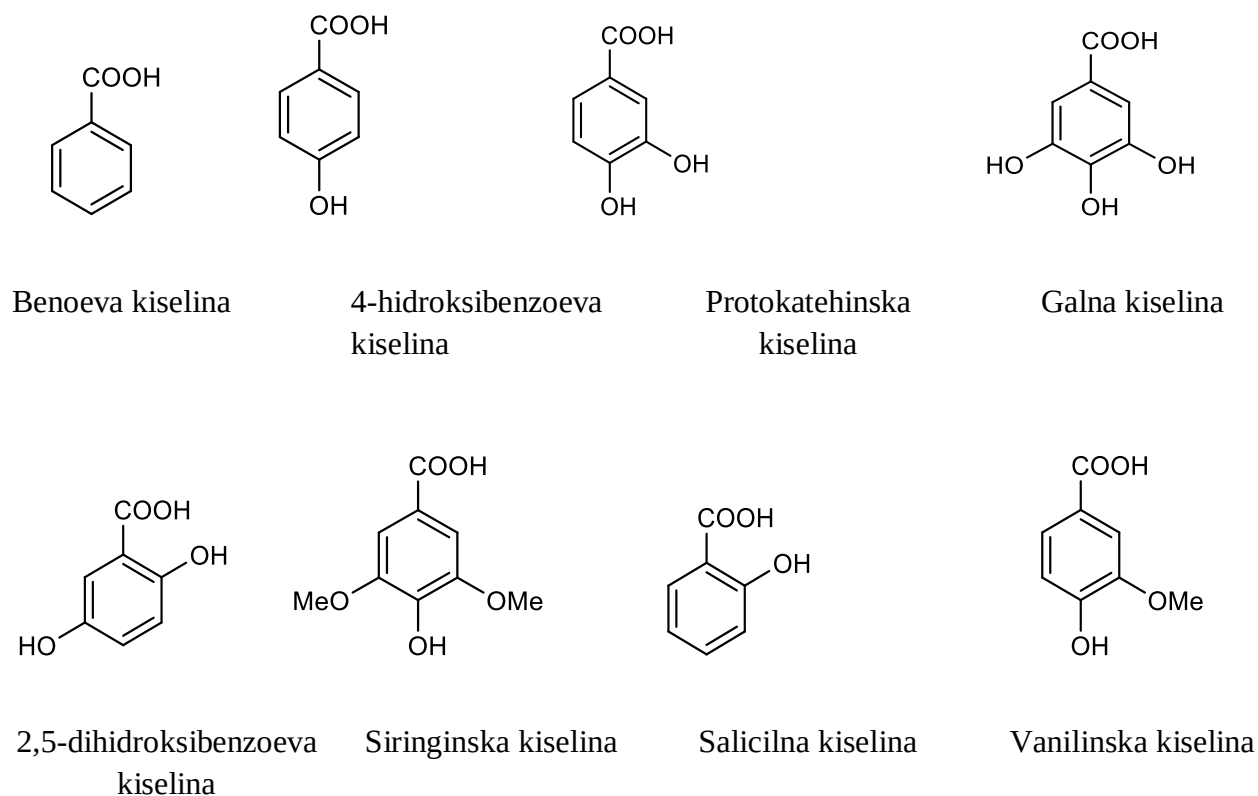
Fenolna jedinjenja predstavljaju široko rasprostranjenu grupu heterogenih jedinjenja i jednu od najvažnijih klasa prirodnih antioksidanata. To su supstance koje se sastoje od jednog ili više aromatičnih prstenova sa jednom ili više hidroksilnih grupa, pa se mogu svrstati u sledeće klase jedinjenja: fenolne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

U biljnim organizmima polifenolna jedinjenja obavljaju niz funkcija: deluju kao antimikrobni agensi i antioksidanti (Heim i sar., 2002). Kao prirodni izvori polifenolnih jedinjenja najznačajniji su začinsko i lekovito bilje, međutim, izvori mogu biti i žitarice, seme uljarica, voće, povrće i mikrobiološki produkti (Naczki i Shahidi, 2006). Polifenolna jedinjenja se smatraju vodećim jedinjenjima sa antioksidativnim delovanjem. Deluju kao redukujući agensi, skevdžeri singletnog kiseonika, antioksidanti donori vodonika, i imaju sposobnost heliranja metala.

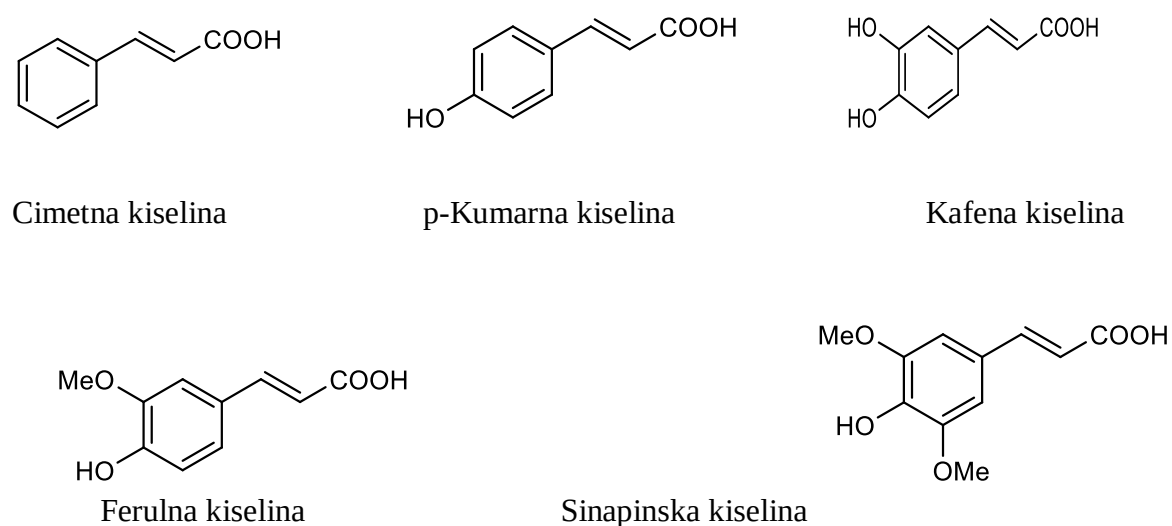
2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline obuhvataju hidroksi i druge funkcionalne derivate benzojeve kiseline (C₆-C₁) (slika 3) i cimetine kiseline (C₆-C₃) (slika 4) (Rice-Evans i Packer, 2003). Ova jedinjenja učestvuju u reakciji otpuštanja vodonikovog atoma i reakcijama „hvatanja“ slobodnih radikala. Cuvelier i saradnici (1992) su potvrdili da su polifenolne kiseline efikasniji antioksidanti od monofenolnih. Antioksidativnost raste sa povećanjem broja hidroksilnih grupa, pa derivati dihidroksibenzojeve kiseline imaju veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na derivate hidroksibenzojeve kiseline. Monohidroksibenzojeve kiseline sa hidroksilnom grupom u *orto* i *para* položaju imaju značajnije manju antioksidativnu aktivnost u odnosu na hidroksilnu grupu u *meta* položaju. Utvrđeno je da je za antioksidativno dejstvo fenolnih kiselina značajno prisustvo kateholne jedinice. Galna

kiselina kao 3,4,5-trihidroksibenzoeva kiselina, ima jače antioksidativno delovanje od derivata dihidroksibenzoeve kiseline, što je u skladu sa prethodnom tvrdnjom.



Slika 3. Benzoeva kiselina i njeni derivati



Slika 4. Cimetna kiselina i njeni derivati

2.3. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je metoda odvajanja i koncentrovanja koja se zasniva na raspodeli supstanci između dveju faza koje se međusobno ne mešaju. Ekstrakcija je vrlo efikasna, brza i popularna tehnika razdvajanja supstanci. Moguće metode ekstrakcije su:

- Ekstrakcija rastvaračem;
- Ekstrakcija tečno-tečno;
- Ekstrakcija čvrsto-tečno;
- Superkritična ekstrakcija;
- Ekstrakcija mikrotalasima;
- Soxlet ekstrakcija i
- Ekstrakcija ultrazvukom.

2.3.1. Ekstrakcija čvrsto-tečno

Ekstrakcija čvrsto-tečno je operacija prenosa mase kojom se jedan ili više sastojaka izdvaja iz čvrstog materijala pomoću pogodnog rastvarača. Jedan deo čvrstog materijala, koji, po pravilu, sadrži željenu supstancu, rastvara se u rastvaraču, a zatim se rastvor odvaja od iscrpljenog, nerastvornog dela čvrstog materijala. Čvrst materijal je najčešće biljna ili mineralna sirovina, dok se kao rastvarač koristi: voda, organski rastvarači i rastvori kiselina, baza ili soli. Deo čvrstog materijala koji se rastvara predstavlja ekstraktivne supstance, dok se dobijeni rastvor naziva ekstrakt.

Ekstrakcija čvrsto-tečno se najčešće izvodi kao maceracija ili perkolacija. Maceracija se izvodi u suspenziji, kao šartna operacija, tako što se čvrst materijal potapa u rastvarač, a perkolacija polušartno, tako što kroz nepokretan sloj čvrstog materijala kontinualno protiče rastvarač.

Proces ekstrakcije sa organskim rastvaračima odvija se u više faza: (a) kvašenje biljnog materijala, spiranje i rastvaranje ekstraktivnih materija sa površine razorenih ćelija i sudova, (b) prodiranje rastvarača u nerazorene ćelije i sekretorne sudove uz istovremeno rastvaranje materija, (c) prenošenje ekstraktivnih materija kroz membranu ćelija iz unutrašnjosti nerazorenih ćelija i sekrecionih sudova do površine čestica biljnog materijala i (d) prenošenje ekstraktivnih materija sa površine čestica biljne sirovine u masu rastvarača. Materijal ćelijskih zidova odlikuje se difilnim svojstvima, pri čemu je hidrofilnost izražena u mnogo višem stepenu nego hidrofobnost. Rastvarač prodire u kapilare biljnog tkiva i popunjava ćelije i druge šupljine. Usled prisustva vazduha u kapilarama i ćelijama biljnog

materijala, vreme prodiranja može biti veoma veliko. Istovremeno se prodiranjem rastvarača u biljna tkiva, odigrava i proces kvašenja, koji zavisi od hemijske sličnosti ekstraktivnih materija i rastvarača. Površinski aktivne supstance poboljšavaju proces kvašenja i prodiranja rastvarača u biljnim tkivima (Ponomarev, 1976).

Prenos mase unutar biljne matrice uključuje difuziju ekstraktivnih materija kroz ćelijski rastvor i omotač, a brzina prenosa mase zavisi od broja i veličina pora u ćelijskom omotaču (sastoji se od membrane ćelije i ćelijskog zida). Debljina ćelijskog omotača zavisi, pre svega, od vrste biljke i biljnog organa. Pore, po pravilu, razdvajaju ćeliju jednu od druge ili ih odvajaju od okoline. Proces difuzije kroz pore zida je određen debljinom i brojem pora u zidu. Uzimajući u obzir malu veličinu mikropora i kapilara u ćelijskom zidu, prenos mase može se porediti sa prenosom mase kroz polupropustljive membrane. Brzina ekstrakcije čvrsto-tečno je obično limitirana difuzijom ekstraktivnih materija kroz unutrašnjost čestica biljnog materijala (čvrsta faza), dok je rastvaranje ekstraktivnih materija u rastvaraču brz proces, koji ne utiče na brzinu ukupnog procesa. Na povećanje difuzije u čvrstoj fazi može se uticati usitnjavanjem biljne sirovine u cilju povećanja stepena razaranja biljnih ćelija i skraćivanja puta ekstraktivnih materija kroz čestice. Ako je pak, difuzija ekstraktivnih materija sa površine čestice ka masi rastvora limitirajući faktor, onda je potrebno obezbediti dovoljno intenzivno mešanje suspenzije.

Efikasnost ekstrakcije čvrsto-tečno zavisi od brojnih faktora, koji uključuju: tehniku ekstrakcije, prirodu čvrstog materijala, polarnost rastvarača, odnos čvrstog materijala i rastvarača (tzv. hidromodul), stepen usitnjenosti, temperaturu i vreme. Za određen čvrst materijal i izabranu tehniku ekstrakcije, efekti ostalih faktora mogu biti nezavisni ili interaktivni. Kao kriterijum efikasnosti uzima se prinos ukupnog suvog ekstrakta ili prinos željene supstance. Uticaj relevantnih faktora na rezultat ekstrakcije čvrsto-tečno najbolje se procenjuje statističkim metodama (Ponomarev, 1976).

Rastvarači kao što su metanol, etanol, aceton, etil-acetat i njihovi vodeni rastvori su najefikasniji za izolovanje fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala.

Prema stepenu hidrofilnosti, supstance koje se ekstrahuju iz biljne sirovine mogu se podeliti na:

- rastvorne u polarnim rastvaračima (hidrofilne supstance),
- rastvorne u slabo polarnim rastvaračima i
- rastvorne u nepolarnim rastvaračima (hidrofobne supstance).

Izbor rastvarača za ekstrakciju zavisi od stepena hidrofilnosti supstanci. Koristi se poznato pravilo: slično se rastvara u sličnom. Polarne supstance, sa visokim vrednostima dielektrične konstante, dobro se rastvaraju u polarnim rastvaračima i obratno.

Prisustvo i udeo vode u organskom rastvaraču ima važnu ulogu, jer voda pojačava proces difuzije i olakšava ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala. Mešanjem alkohola i vode u različitim kvantitativnim odnosima dielektrična konstanta smeše se menja u širokim granicama, što omogućava primenu ovakvih smeša za ekstrakciju velikog broja supstanci iz biljnog materijala. Neophodno je istaći da rastvarač ne utiče samo na ekstrakciju neke određene grupe jedinjenja, već i ukupna količina ekstrahovanih materija zavisi od polarnosti rastvarača (Lepojević, 2000). Prednost ovog rastvarača, pored toga što se može koristiti za ekstrakciju čitavog niza različitih supstanci, je njegova netoksičnost u odnosu na ljudski organizam.

Primenom smeše etanola i vode, kao relativno polarnog rastvarača, mogu se iz polaznog materijala ekstrahovati polarne komponente kao što su fenoli, flavonoidi, tanini, šederi, glikozidi, soli, neki vitamini i druga jedinjenja. (Vidović, 2011). Kako izbor rastvarača za ekstrakciju u velikoj meri određuju komponente koje se žele izdvojiti, nije najjednostavnije odrediti koji je rastvarač najpogodniji (čak i procenat etanola u ekstragensu kod ekstrahovanja polarnih supstanci), pa se zato za određivanje najpogodnijeg rastvarača pri ekstrakciji lekovitog bilja sve više primenjuje optimizacija procesa ekstrakcije. Na taj način se sa sigurnošću može tvrditi da se primenjenim ekstragensom dobija ekstrakt najboljih osobina u odnosu na željene karakteristike (Xu i Diosady, 2010).

Najvažnije tehnološke karakteristike biljne sirovine su: stepen usitnjenosti, površina čestica, sadržaj vlage, sadržaj aktivnih i ekstraktivnih supstanci, brzina i stepen bubrenja biljne sirovine, količina rastvarača adsorbovana u biljnoj sirovini, gustina, zapreminska i nasipna masa sirovine, koeficijent unutrašnjeg i spoljašnjeg trenja, modul elastičnosti i drugo (Ponomarev, 1976).

Kako se za ekstrakciju najčešće koriste droge, a ređe sveži biljni delovi, izdvajanje aktivnih materija iz droga uslovljeno je anatomskom građom samih droga. Za ekstrakciju kore, korena, plodova i semenki glavni uslov je odgovarajuća usitnjenost polaznog materijala. Usitnjavanjem se povećava specifična površina materijala, a time i mogućnost kontakta pojedinih čestica sa rastvaračem za ekstrakciju. U slučaju prevelike usitnjenosti ekstrakcija je otežana, jer se zasićenija ekstrakciona tečnost teško probija i kroz malo deblji sloj droge, pogotovo u prisustvu supstanci koje jako bubre. Osim toga, od jako usitnjene droge ekstrakt se teško odvaja, a jako usitnjena droga može naknadno adsorbovati već ekstrahovanu aktivnu materiju.

Stepen usitnjenosti biljnog materijala i čvrstih supstanci propisan je farmakopejama (*Ph. Jug. IV*) i označen je arapskim brojevima u zagradi iza naziva droge ili preparata. Pri kontaktu rastvarača sa usitnjenim biljnim materijalom u oštećenim biljnim ćelijama dolazi do ispiranja, tj. rastvaranja njihovog sadržaja. U neoštećene ćelije rastvarač najpre mora da proдре. Bubrenjem membrana postaje manje čvrsta, pojavljuju se intermicelarni prostori i rastvarač ulazi u ćeliju. Zatim bubri protoplazma, a sadržaj ćelija se rastvara i ukoliko se nalazi u molekularnom rastvoru, izlazi difuzijom kroz intracelularne prostore u okolnu tečnost dok se ne uspostavi ravnoteža

koncentracija unutar i izvan ćelija (Jovanović, 2003). Droga koja se ekstrahuje mora biti usitnjena do određenog stepena koji varira u relativno uskim granicama (1-5 mm). Najčešće se postavlja ograničenje da udeo sitnih čestica, čiji je prečnik manji od 0,5 mm, ne bude veći od 10% (Radojković, 2012).

2.3.2. Matematičko modelovanje

Matematičko modelovanje u procesima ekstrakcije ima važnu ulogu s obzirom na to da omogućava relativno brzo procenjivanje uticaja različitih procesnih vrednosti na izlazne parametre procesa uz smanjenje broja potrebnih eksperimentalnih podataka (Diaz i Brignole, 2009). Ukoliko se želi optimizovati proces, odnosno obezbediti najveći mogući prinos za najkraće vreme uz najmanji utrošak rastvarača i energije, tada je potrebno matematički opisati proces prenosa mase odgovarajućim modelom. Matematički modeli se primenjuju u cilju kvantitativnog opisa kinetike različitih ekstrakcionih procesa.

Ni jedan od matematičkih modela koji postoji u literaturi u potpunosti ne zadovoljava krajnje zahtevne potrebe jednog univerzalnog matematičkog modela kojim bi se opisao proces ekstrakcije. Razlog za to je izuzetno velika šarolikost ekstrakcionih procesa koji obuhvataju mnogo različitih prirodnih sirovina i hemijskih jedinjenja koja se tom prilikom izdvajaju. Zato su raspoloživi matematički modeli najčešće primenjivi samo za određene sisteme, ili imaju neko drugo ograničenje u primeni (Nikolovski, 2009, Hortaçsu, 2000).

U većini slučajeva, pri ekstrakciji prirodnih materijala, gotovo se nikad ne ekstrahuje samo jedno jedinjenje u toku procesa, već se dobijaju višekomponentni ekstrakti.

Matematički modeli koji se najčešće koriste za opisivanje procesa ekstrakcije ekstraktinih, među njima i fenolnih, jedinjenja su:

- model zasnovan na nestacionarnoj difuziji u biljnom materijalu i
- model zasnovan na teoriji filma.

U inženjerskoj praksi se, takodje, upotrebljava empirijska jednačina Ponomarjeva (Pekić i sar., 1988; Ponomarev, 1976).

2.3.2. Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji u biljnoj sirovini

Prenos mase kroz čvrst materijal pri ekstrakciji čvrsto-tečno odigrava se difuzijom. Iako mehanizam difuzije nije tako jednostavan kao u slučaju gasova i tečnosti, obično se brzina prenosa mase ekstraktivnih supstanci (rastvorak) kroz čvrsti materijal može opisati Fikovim zakonima.

Uslovi difuzije pri ekstrakciji čvrsto-tečno su, po pravilu, nestacionarni. Promene koncentracije ekstraktivnih supstanci pri nestacionarnoj difuziji, pod uslovom da se ne odigrava hemijska reakcija, opisuju se jednačinom II Fikovog zakona. Kada se prenos mase odigrava u jednom pravcu, diferencijalni oblik ove jednačine je (Treybal, 1985):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (1)$$

Analitičko rešavanje jednačine (1) zahteva složen matematički aparat, pa se ona može koristiti za rešavanje problema nestacionarne difuzije pri ekstrakciji čvrsto-tečno u slučaju prostijih geometrijskih oblika čvrstih čestica (ravna ploča, cilindar i sfera), integrisanjem uz primenu odgovarajućih početnih i graničnih uslova (Veljković i Milenović, 2002).

U cilju analitičkog rešavanja jednačine (1) uvode se sledeće pretpostavke:

- čestice bilnog materijala su izotropne i jednake po veličini,
- koeficijent difuzije ekstraktivnih supstanci kroz česticu je konstantan,
- na početku (za $t = 0$), koncentracija ekstraktivnih supstanci u čestici je ravnomerna i iznosi c_0 ,
- koncentracija ekstraktivnih supstanci na spoljašnjoj površini čestice je stalna i iznosi c_∞ ,
- u svakom trenutku unutar čestice postoji raspodela koncentracije ekstraktivnih supstanci $c = c(x)_t$, tako da je srednja koncentracija u čestici $c = \frac{1}{V_p} \int_0^{V_p} c dV$, gde je V_p - zapremina čestice,
- u svakom trenutku u osi čestice je $\left(\frac{\partial c}{\partial x} \right)_{x=0} = 0$,
- difuzija se odigrava samo u jednom pravcu i
- mešanje je intenzivno, tako da se isključuje uticaj prenosa mase od spoljašnje površine čestica u glavninu rastvora i prenosa mase u rastvoru.

Kao rezultat rešavanja jednačine (1) pri graničnim uslovima, dobija se jednačina koja opisuje primenu sadržaja ekstraktivnih supstanci u bilnoj sirovini sa vremenom:

$$\frac{q}{q_0} = (1 - b) \cdot e^{-kt} \quad (2)$$

gde je:

$-q_0$ sadržaj ekstraktivnih supstanci u bilnoj sirovini na početku ekstrakcije

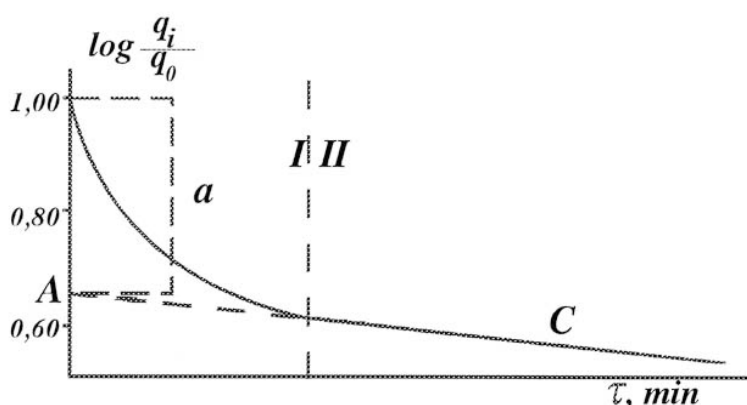
- q sadržaj ekstraktivnih supstanci u biljnoj sirovini posle određenog vremena ekstrakcije.

Za izračunavanje parametara jednačine (2) koristi se njen linearizovan oblik:

$$\ln \frac{q}{q_0} = \ln(1 - b) - kt \quad (3)$$

gde je b koeficijent ispiranja, a k koeficijent spore ekstrakcije (Ponomarev, 1976).

Kinetički parametri jednačine (3) mogu se izračunati grafoanalitički (Ponomarev, 1976) ili analitički. Grafoanalitički postupak je ilustrovan na slici 5. Na grafiku su naznačena dva perioda ekstrakcije: ispiranje (I) i spora ekstrakcija (II) (Veljković i Milenović, 2002). U periodu spore ekstrakcije zavisnost $\log \frac{q_i}{q_0}$ od vremena je linearna. Koeficijent ispiranja se izračunava iz odsečka pravolinijskog dela zavisnosti na ordinati za $t = 0$, dok se koeficijent spore ekstrakcije izračunava iz nagiba zavisnosti. Po analitičkom postupku, odsečak i nagib pravolinijske zavisnosti se izračunavaju metodom najmanjih kvadrata.



Slika 5. Grafoanalitički proračun koeficijenta ispiranja i koeficijenta spore ekstrakcije

Parametri jednačine mogu se izračunati i analitički, pri čemu se odsečak i nagib pravolinijske zavisnosti izračunavaju metodom najmanjeg kvadrata. Ovaj model korišćen je za određivanje i koeficijenta ispiranja i koeficijenta spore ekstrakcije (Veljković i sar., 2006; Veljković i sar., 2008)

2.3.3. Model zasnovan na teoriji filma

Definisanje brzine prenosa mase ekstraktivnih supstanci iz biljnog materijala u rastvor, prema modelu koji se zasniva na teoriji filma, predviđa da se oko čestice obrazuje tanak difuzioni sloj (Ivana Karabegović, 2011).

Pored toga, ovaj model ekstrakcije čvrsto-tečno pretpostavlja sledeće (Coulson i Richardson, 1991; Stanković i sar., 1994):

- otpor prenosa mase je skoncentrisan u tankom sloju oko čestice, čija se debljina ne menja u toku ekstrakcije,

- brzina ukupnog procesa (unutrašnja difuzija i difuzija od spoljašnje površine čestice prema glavnini rastvora) proporcionalna je tzv. efektivnom koeficijentu difuzije (približno jednak koeficijentu difuzije rastvorka u rastvaraču), koji se ne menja u toku ekstrakcije,

- suspenzija biljne sirovine je homogena, a rastvor idealno izmešan,

- rastvorljivost rastvorka u rastvaraču na temperaturi na kojoj se izvodi ekstrakcija je poznata;

- zapremina i spoljašnja površina čestice se ne menja u toku ekstrakcije i

- ispiranje rastvorka iz razorenih biljnih ćelija na spoljašnjoj površini čestica odigrava se trenutno.

Bilans mase ekstraktivnih supstanci u tečnoj fazi, uz uvođenje gore navedenih pretpostavki svodi se na diferencijalnu jednačinu:

$$V \frac{dc}{dt} = \frac{D_{ef}}{\delta} (c_s - c) A \quad (4)$$

gde je:

- c aktivna koncentracija ekstraktivnih supstanci u rastvoru,

- c_s koncentracija zasićenog rastvora,

- A spoljašnja površina čestice,

- δ debljina tečnog difuzionog filma,

- D_{ef} efektivni koeficijent difuzije i

- t vreme

Na početku ($t = 0$), u skladu sa pretpostavkom da se ispiranje ekstraktivnih supstanci iz razorenih biljnih ćelija na spoljašnjoj površini čestica odigrava trenutno, koncentracija rastvora je c_w i ako se uvedu smene:

$$b = \frac{c_w}{c_s} \quad i \quad k = \frac{D_{ef} A}{\delta V}$$

gde je:

- b koeficijent ispiranja a

- k koeficijent spore ekstrakcije

onda je:

$$\left(1 - \frac{c}{c_s}\right) = (1 - b)e^{-kt} \quad (5)$$

Saglasno jednačini (5), koncentracija rastvora u toku ekstrakcije se eksponencijalno približava koncentraciji zasićenog rastvora. Ako je $b = 0$, onda nema ispiranja, a ako je $b = 1$, onda je ispiranje potpuno; stvarno je $0 < b < 1$.

Vrednosti koeficijenta ispiranja i koeficijenta spore ekstrakcije mogu se izračunati iz odsečka i koeficijenta pravca linearizovanog oblika jednačine (6), tj.

$$\ln\left(1 - \frac{c}{c_s}\right) = \ln(1 - b) - kt \quad (6)$$

2.3.2. Empirijska jednačina Ponomarjeva

U ovom slučaju, pretpostavlja se da u periodu spore ekstrakcije važi linearna zavisnost između $\frac{q_o - q}{q_o}$ i vremena (Ponomarev, 1976), tako da je:

$$\frac{q_o - q}{q_o} = b + kt \quad (7)$$

gde je: b - koeficijent ispiranja, a k - koeficijent pravca linerne zavisnosti. Koeficijent ispiranja je mera mase ekstraktivnih supstanci koja se rastvori pošto se biljni materijal potopi u rastvarač, tj.

$$b = \left(1 - \frac{q}{q_o}\right)_{t=0}$$

Parametar k je, u stvari, brzina rastvaranja ekstraktivnih supstanci u odnosu na njihovu početnu masu u periodu spore ekstrakcije, pa se može smatrati specifičnom brzinom spore ekstrakcije, tj.

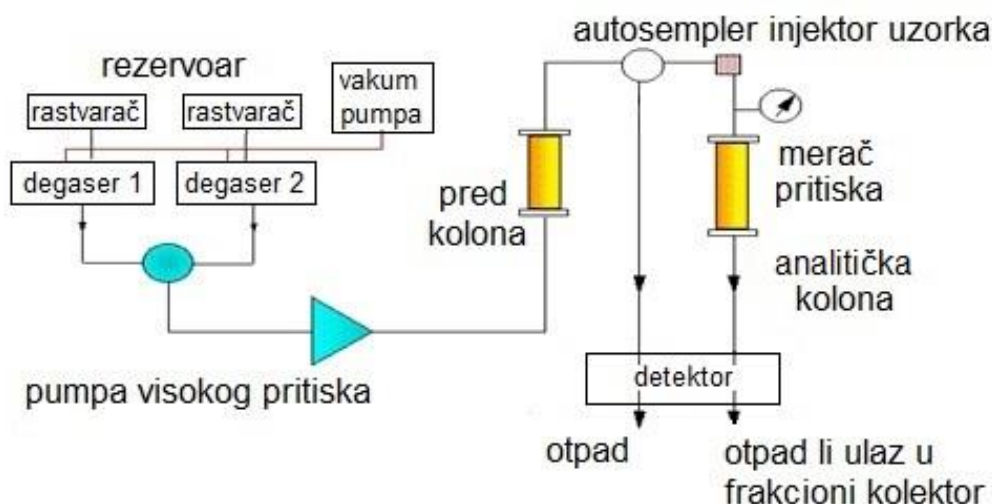
$$k = \left(\frac{1}{q_o} \frac{q_o - q}{t} \right)_{II}$$

indeks II označava da se radi o periodu spore ekstrakcije. Izračunavanje parametara b'' i k'' postiže se grafoanalitičkim postupkom (Ponomarev, 1976), a može se primeniti i metoda najmanjih kvadrata (Pekić i sar., 1988).

2.4. TEČNA HROMATOGRAFIJA VISOKIH PERFORMANSI (HPLC)

Tečna hromatografija visokih performansi je danas jedna od najmoćnijih tehnika u analitičkoj hemiji. Ona pruža mogućnosti razdvajanja, identifikacije i kvantitativnog određivanja jedinjenja koja su prisutna u bilo kom uzorku koji se može rastvoriti u tečnosti. Danas, jedinjenja u tragovima, čija je koncentracija reda veličine *parts per trillion* (ppt), mogu lako da se identifikuju uz pomoć tečne hromatografije visokih performansi. HPLC može da se primeni na skoro svaki uzorak, kao što su lekovi, prehrambeni proizvodi, kozmetika, uzorci iz životne sredine, forenzički uzorci i industrijske hemikalije.

Osnovni delovi HPLC sistema su prikazani na slici 6.



Slika 6. Šematski prikaz uređaja za HPLC

U rezervoaru se nalazi rastvarač, tj. mobilna faza. Mobilna faza za HPLC analizu treba da se bira tako da pre svega dobro rastvara sve komponente ispitivane smeše. Drugim

rečima, ako se analiziraju nepolarna jedinjenja, tada biramo nepolarne rastvarače, i obrnuto - pri analizi polarnih jedinjenja kao mobilna faza se biraju polarni rastvarači. Polarnost mobilne faze može da se varira od puferovanih vodenih rastvora do ugljovodonika. Rastvarači koji se koriste kao mobilna faza moraju biti odgovarajuće čistoće, bez stranih primesa organskog i neorganskog porekla. HPLC rastvarači su komercijalno dostupni i treba ih uvek koristiti. Takođe, mobilna faza mora biti oslobođena mehurića gasova. Zbog toga se pre upotrebe mobilna faza filtrira i degazira.

Pumpa za proizvodnju visokog pritiska se koristi za generisanje i održavanje specifičnog protoka mobilne faze, koji je obično reda veličine mililitar po minuti. Pumpe koje se koriste za HPLC sisteme moraju biti izrađene od materijala koji je otporan na rastvarače koji se koriste kao mobilna faza.

Injektor služi za uvođenje, tj. injektovanje (engl. inject) uzorka u kontinualni tok mobilne faze koja ga nosi u HPLC kolonu. Unosi se mala zapremina uzorka u tok mobilne faze i na osnovu specifičnih hemijskih i fizičkih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenata smeše na koloni. Vreme zadržavanja zavisi od prirode supstance koja se analizira, stacionarne faze i sastava mobilne faze. Korišćenje visokog pritiska povećava linearnu brzinu i daje jedinjenjima manje vremena za zadržavanje na koloni, što poboljšava rezoluciju hromatograma.

Kolona je smeštena u termostatu koji održava temperaturu kolone konstantnom u toku analize, što je veoma značajno jer promena temperature utiče na raspodelu ispitivanog jedinjenja između stacionarne i mobilne faze, kao i na njegovu rastvorljivost i viskoznost mobilne faze. Stacionarna faza tj. kolona predstavlja najvažniji deo HPLC sistema, mesto svih hromatografskih dešavanja. Stacionarne faze pakovane su u kolone od nerđajućeg čelika ili stakla i njihov izbor zavisi od prirode supstanci koje se ispituju. Kolone mogu biti različite dužine, najčešće od 2,5 do 25 cm (i više), sa različitim unutrašnjim prečnikom (najčešće 2,0-4,6 mm) i različitim dijametrom čestica (od 2 do 50 μm). Uobičajeni materijali za pakovanje HPLC kolona su sledeći: silika-gel, kopolimeri na bazi stirena i divinilbenzena, polisaharidi ili dijatomejske zemlje (Antić i Antić, 2014).

Detektor beleži i obrađuje električni signal potreban za generisanje hromatograma na ekranu. Hromatogram omogućava identifikaciju i kvantitativno određivanje koncentracije pojedinačnih jedinjenja u analiziranoj smeši. Mobilna faza zatim napušta detektor i može biti poslata u otpad, ili po želji prečišćavana. Detektor je uglavnom najsofisticiraniji i najskuplji deo HPLC opreme. Kako karakteristike jedinjenja prisutnih u uzorku mogu biti veoma različite, razvijeno je nekoliko tipova detektora. Postoje selektivni detektori, koji daju različite odgovore u zavisnosti od strukture analiziranog uzorka, i tzv. univerzalniji detektori, kod kojih je odgovor sličan za većinu jedinjenja. Na primer, ako jedinjenje apsorbuje ultraljubičastu ili vidljivu svetlost, koristi se UV-Vis apsorbujući detektor (engl. ultraviolet-visible detector). Ako jedinjenje ima sposobnost fluorescencije, koristi se fluorescentni detektor. Oba tipa detektora su selektivni detektori. Ako analizirano jedinjenje nema ni jednu od pomenutih karakteristika, koristi se univerzalniji tip detektora,

kao što je RI detektor, tj. detektor koji radi na principu prelamanja svetlosti (engl. refractive index detector), ili ELSD detektor, tj. detektor koji radi na principu isparavanja i rasipanja svetlosti.

Cevi i ostali delovi opreme koja se koristi za povezivanje pumpe, injektora, kolone i detektora, da bi se omogućio nesmetani protok mobilne faze i uzorka, izrađeni su od materijala koji može da podnese visok pritisak (Mitić, 2017).

U HPLC-u se koriste dva osnovna načina eluiranja. Prvi je izokratsko eluiranje, kod koga sastav mobilne faze, bilo da se radi o čistom rastvaraču ili o smeši rastvarača, ostaje isti tokom hromatografisanja.

Drugi način eluiranja je gradijentno eluiranje, kada se, kao što samo ime ukazuje, sastav mobilne faze menja tokom HPLC razdvajanja. Ovaj način je koristan za uzorke koji sadrže jedinjenja u širokom opsegu polarnosti, kada izokratsko eluiranje ne dovodi do zadovoljavajućeg razdvajanja komponenti ispitivane smeše. Naime, na početku eksperimenta mobilna faza može eluirati neke komponente smeše ali je previše “slaba” da bi eluirala ostale komponente. Dakle “snaga”, odnosno sposobnost eluiranja mobilne faze će se tokom eksperimenta povećavati, da bi se eluirala jedinjenja koja su jače vezana za stacionarnu fazu. U najjednostavnijem slučaju, u okviru HPLC sistema, kada se koristi gradijentno eluiranje, postoje dve boce sa rastvaračem i dve pumpe. Brzina svake pumpe se kontroliše, da bi se isporučilo manje ili više rastvarača tokom razdvajanja. Dve struje rastvarača se mešaju u mešaču (mikseru) da bi se dobio stvarni sastav mobilne faze koja se isporučuje koloni tokom vremena. Na početku eksperimenta, mobilna faza sadrži veći udeo rastvarača koji eluira jedinjenja slabije vezana za stacionarnu fazu. Tokom vremena, udeo rastvarača koji eluira jedinjenja jače vezana za stacionarnu fazu se povećava, prema određenom režimu (Mitić, 2017)

2.4.1. Kvalitativna i kvantitativna analiza

Identifikacija hromatografskim metodama vrši se na osnovu retencionih parametara (t_R i V_R), veličine koje pokazuju dobru reproduktivnost i čija standardna devijacija ne prelazi 2%. Slaganje retencionih veličina nepoznatog i standardnog jedinjenja, govori o tome da su data jedinjenja identična.

Kada je jedinjenje identifikovano, sledeći važan korak je ustanoviti količinu, tj. koncentraciju jedinjenja u ispitivanom uzorku. Hromatogram i odgovarajući podaci sa detektora omogućavaju da se koncentracija prisutnog jedinjenja izračuna. Kako detektor reaguje na koncentraciju jedinjenja, veća koncentracija će davati veći signal, što će se u hromatogramu videti kao viši pik iznad bazne linije.

Korišćenjem podataka za visinu ili površinu pika, kvantitativni sastav komponenata u probi možemo izračunati metodom kalibracionog grafika, metodom normiranja, kao i metodama sa spoljašnjim ili unutrašnjim standardom (Mitić, 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Biljna sirovina

Za analizu su korišćene semenke tikve kupljene u prodavnicama zdrave hrane u Nišu, koje su sušene na sobnoj temperaturi i neposredno pre eksperimenta samlevene električnim blenderom.

3.2. Ekstrakcija iz biljne sirovine

Ekstrakcija je vršena vodenim rastvorima etanola koncentracije 40 % (v/v), pri hidromodulu 20 (V/g), na temperaturama 25, 35 i 45°C. Biljna sirovina (2 g) se prelije određenom zapreminom rastvarača i ostavi na konstantnoj temperaturi. Posle određenog vremena, ekstrakt se odvaja od ostatka biljne sirovine vakuum filtracijom.

3.3. Inicijalni sadržaj vanilinske kiseline u semenima tikve (q_0)

Biljni materijal (2 g) se u erlenmajeru od 250 ml prelije sa 100 ml ekstrakcionog rastvarača (40 % etanol). Ekstrakcija je vršena postupkom maceracije u toku 120 minuta. Ekstrakti su odvojeni od ostatka filtriranjem kroz Whatman No. 1 filter papir. Nakon filtriranja, iscrpljena biljna sirovina se prelije sa istom zapreminom istog rastvarača, i macerira još 30 minuta, a zatim se filtrira i ispire sa 20 ml rastvarača. Ekstrakti se spoje i uparavaju, a zatim i suše pod vakumom na 45 °C do konstantne mase. Osušeni, suvi i koncentrovani ekstrakti su rastvoreni u ekstrakcionom rastvaraču neposredno pre analize. Osušeni ekstrakti su pripremljeni tri puta, a rezultat je izražen kao srednja vrednost.

3.4. Sadržaj vanilinske kiseline u zasićenom ekstraktu (C_s)

Biljni materijal (1 g) je u erlenmajeru od 250 ml preliven sa 100 ml ekstrakcionog rastvarača. Ekstrakcija je vršena postupkom maceracije u toku 120 minuta. Tečni ekstrakt je odvojen kao ranije i korišćen za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz nove količine (1 g) biljnog materijala. Postupak se ponavlja dok se ne dobije zasićen rastvor, tj. kada nema više izvlačenja fenolnih jedinjenja iz biljne sirovine. Rastvarač je uklonjen na rotacionom uparivaču na 45°C. Osušeni, suvi i koncentrovani ekstrakti su rastvoreni u ekstrakcionom rastvaraču neposredno pre analize. Osušeni ekstrakti su pripremljeni tri puta, a rezultat je izražen kao srednja vrednost.

3.4. Aparati

Za ispitivanje sadržaja fenolnih komponenti u uzorcima korišćena je sledeća aparatura:

1. HPLC sistem Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies, USA) koji se sastoji od kvaternarne pumpe G1354A, automatskog injektora G1329A, termostiranog kolonskog dela G1316A, UV/Vis detektora G1315D, fluorescentnog detektora G1321A kontrolisanog sa HP Chemstation softverom, za određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja (slika 7);
2. Termostat Julabo MP 5A Open Bath Circulations (JULABO, USA) za termostatiranje rastvora;
3. Analitička vaga AB-204-S (Mettler Toledo, Švajcarska) za odmeravanje čvrstih supstanci;
4. Varijabilne automatske pipete Lab Mate⁺ za pipetiranje rastvora;
5. Električni blender za homogenizovanje uzoraka.



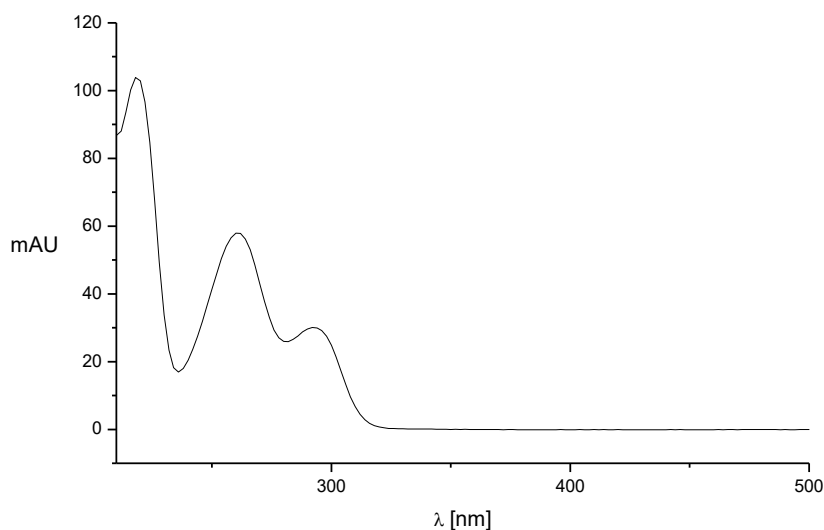
Slika 7. Tečni hromatograf visokih performansi (HPLC) (laboratorija Katedre za analitičku i fizičku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu).

Sudovi koji su korišćeni prani su etanolnim rastvorom KOH, zatim rastvorom HCl (1:1), isprani česmenskom, destilovanom i dejonizovanom vodom. Rastvori su pripremani sa dejonizovanom vodom specifične provodljivosti $0,05 \mu\text{Scm}^{-1}$.

3.5. HPLC analiza etanolnih ekstrakata semena tikve

Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača: A – ($\text{H}_2\text{O} + 5\% \text{HCOOH}$) i B – ($80\% \text{HCN} + 5\% \text{HCOOH} + \text{H}_2\text{O}$). Razdvajanje komponenti je izvedeno primenom sledećeg linearnog gradijenta: 0-28 min, 0% B; 28-35 min, 25% B; 35-40 min, 50% B; 40-45 min, 80% B, i na kraju poslednjih 10 min ponovo 0% B. Protok mobilne faze je iznosio 0,8 ml/min. Injektovano je 5 μL rastvora uzorka, automatski, korišćenjem autosampler-a. Kolona je termostatisana na temperaturi od 30 °C. Vanilinska kiselina prisutna u ekstraktima je identifikovana poređenjem retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda (slika 8) za vanilinsku kiselinu

Kvantifikacija vanilinske kiseline je izvršena metodom spoljašnjeg standarda. Pripremljen je osnovni rastvor standarda masene koncentracije 1,0 mg/ml, rastvaranjem u metanolu. Od ovog rastvora je pripremljena serija razblaženih rastvora standarda odgovarajućih masenih koncentracija. Konstruisana je kalibraciona krivana osnovu dobijenih površina pikova u zavisnosti od masene koncentracije standarda. Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti izračunate su masene koncentracije komponenti u ekstraktima.



Slika 8. UV-VIS spektar vanilinske kiseline

U cilju određivanja optimalnih parametara ekstrakcije mineralnih materija iz matičnjaka primenjena je Metoda odzivne površine (RSM). Ispitan je uticaj tri faktora (hidromodula, temperature i vremena ekstrakcije), pri čemu je svaki faktor variran na dva nivoa.

3.7. Statistička obrada podataka

Prihvatljivost modela se može proceniti na osnovu korena srednjeg kvadrata (Root Mean Square (RMS) (Kitanović i sar., 2008), i standardne devijacije (SD) (Rahmanian i sar, 2011), koje se izračunavaju na osnovu jednačina:

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{\bar{q}_{exp} - \bar{q}_{cal}}{\bar{q}_{exp}} \right)^2} \quad (8)$$

$$SD = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \left(\left| \frac{\bar{q}_{exp(i)} - \bar{q}_{cal(i)}}{\bar{q}_{exp(i)}} \right| - AARE \right)^2} \quad (9)$$

Apsolutna srednja relativna greška (Absolute average relative error (AARE) se izračunava pomoću jednačine (10),

$$AARE = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \left(\left| \frac{\bar{q}_{exp(i)} - \bar{q}_{cal(i)}}{\bar{q}_{exp(i)}} \right| \right) \quad (10)$$

Što su manje vrednosti za RMS i SD to model bolje opisuje eksperimentalne podatke (Kitanović i sar., 2008).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Modelovanje kinetika ekstrakcije vanilinske kiseline iz semena bundeve

Za modelovanje kinetike ekstrakcije vanilinske kiseline iz semena bundeve 40 % (v/v) etanolom, primenjena su tri kinetička modela: model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal, empirijski model Ponomarjeva i model zasnovan na teoriji filma. U tabeli 2 dat je prikaz korišćenih kinetičkih modela ekstrakcije.

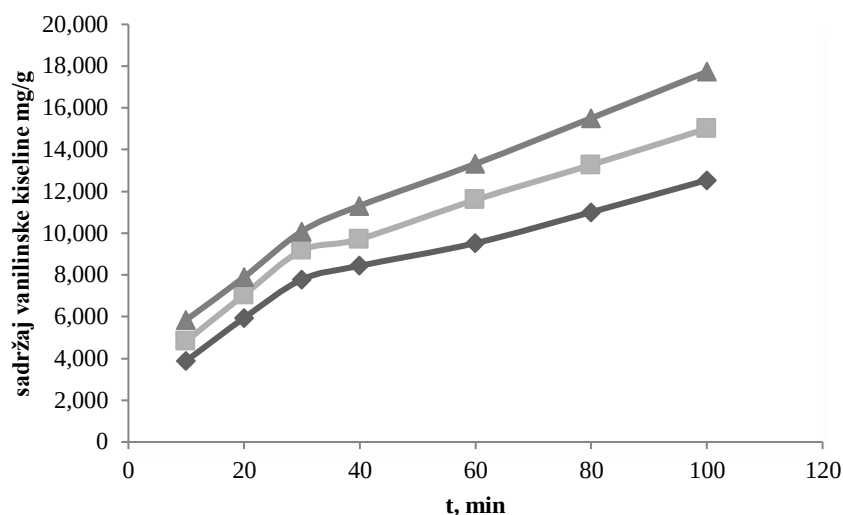
Tabela 2. Kinetički modeli ekstrakcije ekstraktivnih materija iz biljnog materijala

	Kinetička jednačina	Linearna transformacija
Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji	$\frac{q}{q_o} = (1 - b) \cdot e^{-kt}$	$\ln \frac{q}{q_o} = \ln(1 - b) - kt$
Model zasnovan na teoriji filma	$\left(1 - \frac{c}{c_s}\right) = (1 - b')e^{-k't}$	$\ln \left(1 - \frac{c}{c_s}\right) = \ln(1 - b') - k't$
Empirijski model Ponomarjeva		$\frac{q_o - q}{q_o} = b'' + k''t$

Promene sadržaja vanilinske kiseline izražene u mg/g suvih semenki bundeve u toku ekstrakcije 40% etanolom pri solvomodulu 20 ml/g na temperaturama od 25, 35 i 45°C sa vremenom ekstrakcije, prikazane su u Tabeli 3 i na slici 9.

Tabela 3. Promena sadržaja vanilinske kiseline sa vremenom ekstrakcije pri optimalnim uslovima ekstrakcije iz semena bundeve (koncentracija etanola: 40 %; solvmodul: V/m=20) na temperaturama: 25±0.1 °C; 35±0.1 °C i 45±0.1 °C

t (min)	mg/g (25°C)	mg/g (35°C)	mg/g (45°C)
10	3,886	4,833	5,847
20	5,941	7,050	7,898
30	7,780	9,171	10,090
40	8,440	9,722	11,316
60	9,525	11,599	13,320
80	11,009	13,273	15,512
100	12,542	15,008	17,729



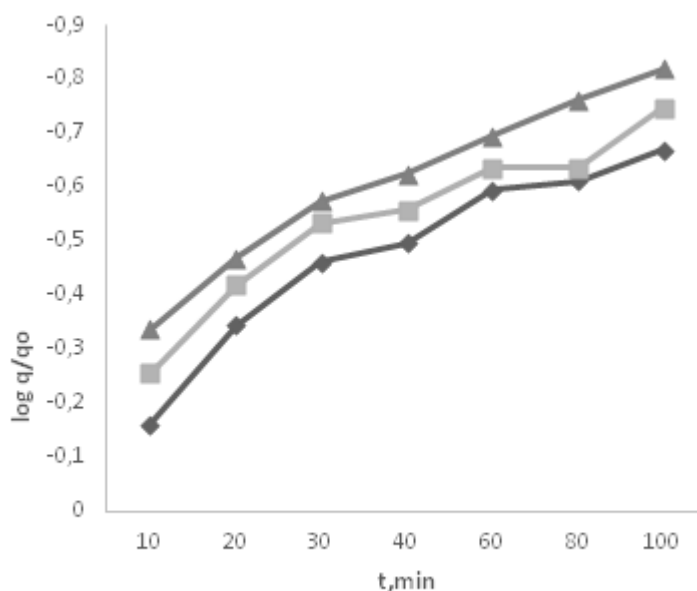
Slika 9. Promena sadržaja vanilinske kiseline sa vremenom ekstrakcije pri optimalnim uslovima ekstrakcije iz semena bundeve (koncentracija etanola: 40 %; solvmodul: V/m=20) na temperaturama: (♦) $25\pm0.1^{\circ}\text{C}$; (■) $35\pm0.1^{\circ}\text{C}$ i (▲) $45\pm0.1^{\circ}\text{C}$

Ekstrakcija vanilinske kiseline iz semena bundeve maceracijom odvija se u dve faze. Na početku, ekstraktivne supstance koje se nalaze na površini čestica biljne sirovine rastvaraju se u kratkom vremenskom periodu. U ovoj fazi, poznatoj kao ispiranje ili brza ekstrakcija, rastvara se veći deo ekstraktivnih supstanci. Trajanje ove faze zavisi od vrste biljnog materijala, vrste rastvarača kao i raspoložive količine rastvarača. Brza faza ekstrakcije (ispiranje) pri ekstrakciji vanilinske kiseline iz semena bundeve maceracijom traje 30-tak minuta.

Nakon završetka faze ispiranja, nastupa spora faza procesa ekstrakcije u kojoj prinos ekstraktivnih materija, odnosno vanilinske kiseline, više ili manje blago raste sa vremenom na račun difuzije ekstraktivnih materija iz unutrašnjosti nerazorenih ćelija biljnog materijala do i kroz njihovu spoljnu površinu u masu rastvora. Produžetkom ove faze postigao bi se veći stepen ekstrakcije ali na račun smanjenja ekonomičnosti celog procesa (Karabegović, 2011).

4.1.1. Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal

Za izračunavanje parametara modela zasnovanog na nestacionarnoj difuziji kroz čvrst materijal korišćeni su samo podaci iz perioda spore ekstrakcije od 30-tog minuta ekstrakcije, a izračunavanje je vršeno pomoću metode linearne regresije (slika 10).



Slika 10. Linearizovan oblik kinetičke jednačine modela zasnovanog na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal pri ekstrakciji vanilinske kiseline iz semena bundeve na temperaturama: (◻) $25\pm 0.1^{\circ}\text{C}$; (◼) $35\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ i (▲) $45\pm 0.1^{\circ}\text{C}$

Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal pokazuje dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima u periodu ekstrakcije od 30-tog minuta u slučaju ekstrakcije na ispitivanim temperaturama (Tabela 4).

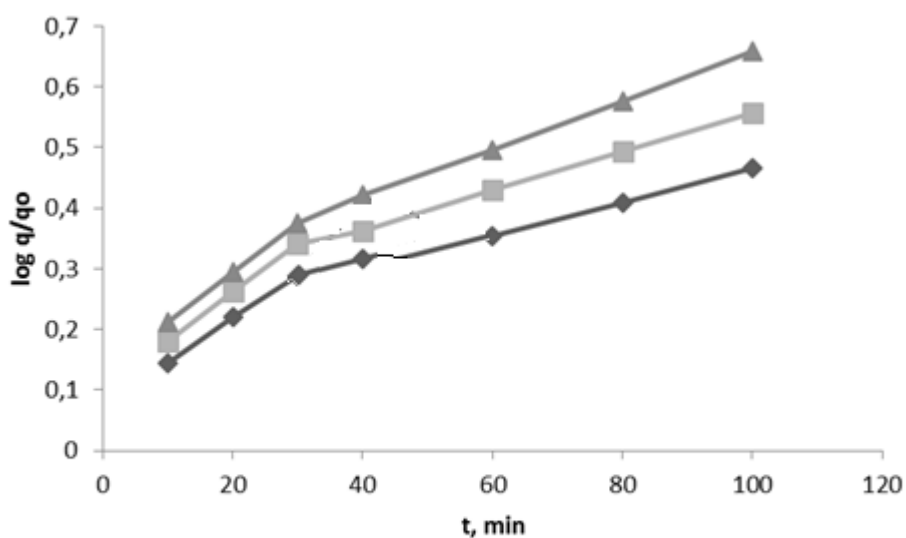
Tabela 4. Promena sadržaja vanilinske kiseline sa vremenom ekstrakcije pri optimalnim uslovima ekstrakcije iz semena bundeve izračunate na osnovu modela zasnovanog na nestacionarnoj difuziji (koncentracija etanola: 40 %; solvmodul: $V/m=20$) na temperaturama: $25\pm 0.1^{\circ}\text{C}$; $35\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ i $45\pm 0.1^{\circ}\text{C}$

t (min)	mg/g (25°C)	mg/g (35°C)	mg/g (45°C)
30	7,810	9,169	10,303
40	8,357	9,855	11,165
60	9,569	11,383	13,094
80	10,956	13,148	15,355
100	12,545	15,186	18,008

Vrednosti kinetičkih parametara su izračunate primenom metode najmanjih kvadrata i date u Tabeli 8. Pri datim uslovima ekstrakcije na temperature od 45°C postižu se najveće vrednosti koeficijenta ispiranja i koeficijenta spore ekstrakcije.

4.1.2. Model Ponomarjeva

Za izračunavanje parametara modela zasnovanog na Ponomarjevoj jednačini korišćeni su samo podaci iz perioda spore ekstrakcije od 30-tog minuta ekstrakcije, a izračunavanje je vršeno pomoću metode linearne regresije (slika 11)



Slika 11. Linearizovan oblik kinetičke jednačine modela zasnovanog na modelu Ponomarjeva pri ekstrakciji vanilinske kiseline iz semena bundeve na temperaturama: (◻) 25±0.1°C; (●) 35±0.1°C i (▲) 45±0.1 °C

Model zasnovan na Ponomarjevoj jednačini pokazuje dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima u periodu ekstrakcije od 30-tog minuta u slučaju ekstrakcije na ispitivanim temperaturama (Tabela 5)

Tabela 5. Promena sadržaja vanilinske kiseline sa vremenom ekstrakcije pri optimalnim uslovima ekstrakcije iz semena bundeve izračunate na osnovu Ponomarjevog modela (koncentracija etanola: 40 %; solvmodul: V/m=20) na temperaturama: 25±0.1 °C; 35±0.1 °C i 45±0.1 °C

t (min)	mg/g (25°C)	mg/g (35°C)	mg/g (45°C)
30	7,696	9,029	10,123
40	8,368	9,876	11,204
60	9,712	11,570	13,365
80	11,056	13,263	15,527
100	12,401	14,957	17,688

Vrednosti kinetičkih parametara su izračunate primenom metode najmanjih kvadrata i date u Tabeli 8. Pri datim uslovima ekstrakcije na temperature od 45°C postižu se najveće vrednosti koeficijenta ispiranja i koeficijenta spore ekstrakcije.

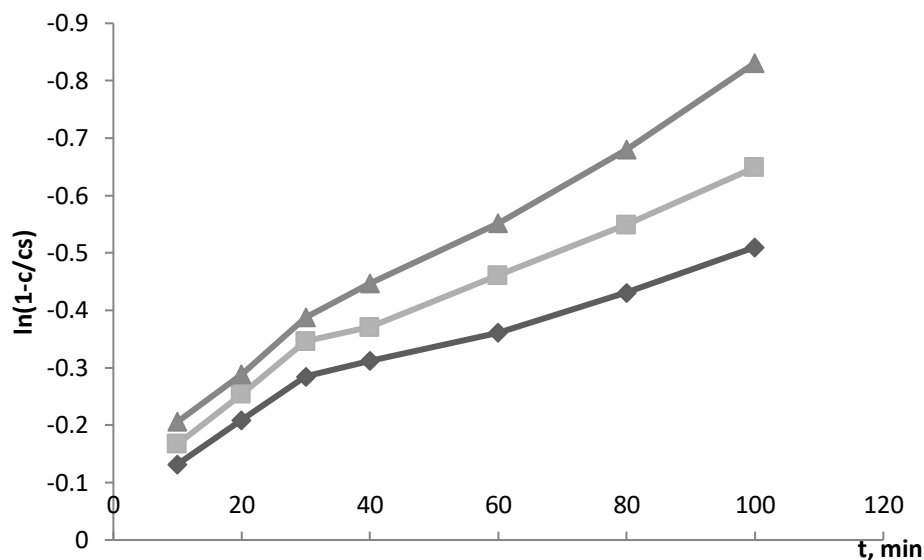
4.1.3. Model zasnovan na teoriji filma

Promene sadržaja vanilinske kiseline izražene u g/dm³ ekstrakta u toku ekstrakcije semena bundeve 40% etanolom pri solvomodulu 20 ml/g na temperaturama od 25, 35 i 45°C sa vremenom ekstrakcije, prikazane su u Tabeli 6.

Tabela 6. Promena koncentracije vanilinske kiseline sa vremenom ekstrakcije pri optimalnim uslovima ekstrakcije iz semena bundeve (koncentracija etanola: 40 %; solvmodul: V/m=20) na temperaturama: 25±0.1 °C; 35±0.1 °C i 45±0.1 °C

t (min)	g/dm ³ (25°C)	g/dm ³ (35°C)	g/dm ³ (45°C)
10	0,155	0,193	0,234
20	0,237	0,282	0,316
30	0,311	0,367	0,404
40	0,337	0,389	0,453
60	0,381	0,464	0,533
80	0,440	0,531	0,620
100	0,502	0,600	0,709

Za izračunavanje parametara modela zasnovanog na teoriji filma korišćeni su eksperimentalni podaci iz celokupnog perioda ekstrakcije, a izračunavanje je vršeno pomoću metode linearne regresije (slika 12).



Slika 12. Linearizovan oblik kinetičke jednačine modela zasnovanog na teoriji filma pri ekstrakciji vanilinske kiseline iz semena bundeve na temperaturama: (▪) $25\pm0.1^{\circ}\text{C}$; (■) $35\pm0.1^{\circ}\text{C}$ i (▲) $45\pm0.1^{\circ}\text{C}$

Model zasnovan na teoriji filma pokazuje dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima u celokupnom period ekstrakcije u slučaju ekstrakcije na ispitivanim temperaturama (Tabela 7).

Tabela 7. Promena koncentracije vanilinske kiseline sa vremenom ekstrakcije pri optimalnim uslovima ekstrakcije iz semena bundeve izračunate na osnovu modela teorije filma (koncentracija etanola: 40 %; solvmodul: $V/m=20$) na temperaturama: $25\pm0.1^{\circ}\text{C}$; $35\pm0.1^{\circ}\text{C}$ i $45\pm0.1^{\circ}\text{C}$

t (min)	g/dm ³ (25°C)	g/dm ³ (35°C)	g/dm ³ (45°C)
10	0,198	0,233	0,256
20	0,238	0,283	0,320
30	0,276	0,331	0,381
40	0,313	0,376	0,437
60	0,382	0,460	0,539
80	0,447	0,536	0,628
100	0,507	0,605	0,707

Vrednosti kinetičkih parametara su izračunate primenom metode najmanjih kvadrata i date u Tabeli 8. Pri datim uslovima ekstrakcije na temperature od 45°C postižu se najveće vrednosti koeficijenta ispiranja i koeficijenta spore ekstrakcije.

4.2. Kinetički parametri

U tabeli 8 su prikazane vrednosti koeficijenata ispiranja i koeficijenata spore ekstrakcije na različitim temperaturama, koje su određene korišćenjem različitih modela.

Tabela 8. Vrednosti koeficijenata ispiranja i koeficijenata spore ekstrakcije za process ekstrakcije vanilinske kiseline is semena bundeve

	Temperature, K	Koeficijent ispiranja (b)	Koeficijent spore ekstrakcije (k)
Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal	298	0,578	$2,94 \cdot 10^{-3}$
	308	0,636	$3,18 \cdot 10^{-3}$
	318	0,669	$3,46 \cdot 10^{-3}$
Model Ponomarjeva	298	0,211	$2,50 \cdot 10^{-3}$
	308	0,241	$3,15 \cdot 10^{-3}$
	318	0,256	$4,02 \cdot 10^{-3}$
Model zasnovan na teoriji filma	298	0,148	$3,82 \cdot 10^{-3}$
	308	0,144	$5,02 \cdot 10^{-3}$
	318	0,149	$6,66 \cdot 10^{-3}$

Kao što se može videti koeficijenti ispiranja prema modelu zasnovanom na teoriji filma (b) imaju, generalno, manju vrednost od koeficijenata ispiranja izračunatih prema modelu zasnovanom na teoriji nestacionarne difuzije kroz biljni material i empirijskom modelu Ponomarjeva, dok koeficijenti spore ekstrakcije izračunati prema modelu zasnovanom na teoriji filma (k) imaju veće vrednosti od koeficijenata spore ekstrakcije izračunatih prema modelu zasnovanom na teoriji nestacionarne difuzije kroz biljni material i empirijskom modelu Ponomarjeva.

Poređenje modela

Prihvatljivost kinetičkog modela je ocenjena na osnovu slaganja kinetičkih jednačina sa eksperimentalnim podacima, odnosno na osnovu vrednosti koeficijenata linearne korelacije (R^2), vrednosti standardne devijacije (SD) i na osnovu vrednosti korena kvadratnog srednjeg odstupanja (RMS) izračunatih od eksperimentalnih vrednosti koncentracija vanilinske kiseline. Usvojeno je da je model prihvatljiv ukoliko je srednja vrednost odstupanja izračunatih od eksperimentalnih vrednosti sadržaja ekstraktivnih supstanci manja od $\pm 10\%$. Izračunate vrednosti za R^2 , RMS i SD na tri temperature i za svaki primenjen model prikazane su u Tabeli 9.

Tabela 9. Vrednosti RMS, SD i R^2 za različite modele na temperaturama 25, 35 i 45°C

	Temperature, K	RMS (%)	SD (%)	R^2 (%)
Model zasnovan na nestacionarnoj difuziji kroz biljni materijal	298	0,56	0,63	99,92
	308	1,23	1,38	99,54
	318	1,59	1,77	99,46
Model Ponomarjeva	298	1,20	1,33	99,54
	308	1,10	1,12	99,81
	318	0,62	0,93	99,96
Model zasnovan na teoriji filma	298	9,45	9,63	95,59
	308	8,78	9,38	97,42
	318	4,44	4,75	99,18

Na osnovu podataka iz Tabele 9 očigledno je da bez obzira na primenjeni model i temperature ekstrakcije, vrednosti RMS bile su manje od 10%. Takođe, iz Tabele 9 vidi se da su i standardne devijacije manje od 10%. Dakle, na osnovu niskih vrednosti za RMS i SD, svaki od primenjenih modela može uspešno opisati kinetiku ekstrakcije vanilinske kiseline iz semena bundeve. Pri tome, vrednosti koeficijentata linearne korelacije (R^2) bile su jako visoke i kretale su se od 95,59% do 99,96%.

Termodinamički parametri

Vrednosti koeficijentara spore ekstrakcije na različitim temperaturama, dobijenih po modelu zasnovanog na nestacionarnu difuziju kroz biljni materijal, poslužili su nam da odredimo energiju aktivacije kao i ostale termodinamičke parametre aktivacije.

Uticaj temperature na konstantu brzine ekstrakcije definisan je Arrhenius-om jednačinom:

$$k = A \cdot e^{-E_a/R \cdot T}$$

Za izračunavanje energije aktivacije koristi se njen linearizovan oblik:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

gde k predstavlja konstantu brzine ekstrakcije, A je predeksponencijalni factor, R univerzalna gasna konstanta (8,314 J/mol K) i T (K) apsolutna temperatura. Energija aktivacije se može izračunati iz nagiba zavisnosti $\ln k$ u funkciji $1/T$.

Termodinamički parametri aktivacije izračunavaju se na osnovu jednačina:

$$\Delta H^* = E_a - R \cdot T$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*$$

gde je ΔH^* aktivaciona entalpija, ΔS^* aktivaciona entropija i ΔG^* aktivaciona slobodna energija (Gibbs-ova energija).

Na osnovu zavisnosti logaritma koeficijenta spore ekstrakcije vanilinske kiseline iz semena bundeve u funkciji recipročne vrednosti apsolutne temperature, dobijena je prava iz čijeg nagiba je izračunata energija aktivacije a potom i ostali termodinamički parametri prelaznog stanja. Izračunati termodinamički parametri dati su u Tabeli 10.

Tabela 10 .Termodinamički parametri aktivacionog stanja procesa ekstrakcije vanilinske kiseline iz semena bundeva

Temperatura (°C)	E_a (kJ/mol)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (J/mol K)	ΔG^* (kJ/mol)
25	10,64	8,16	-265,89	87,40
35				90,06
45				92,72

Aktivaciona energija procesa ekstrakcije vanilinske kiseline iznosi 10,64 kJ/mol. Dobijena vrednost je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora. Price i Spitzer (1994) su odredili da se energija aktivacije za process ekstrakcije flavanola iz zelenog čaja kreće od 30 do 50 kJ/mol. Za proces ekstrakcije ukupnih fenola iz semena grožđa aktivaciona energija iznosi 7,70 kJ/mol, 5,27 kJ/mol i 1,10 kJ/mol u zavisnosti od stepena usitnjenosti biljnog materijala (Bucić-Kojić i sar., 2007). Za process ekstrakcije ukupnih fenola iz hmelja aktivaciona energija iznosi 5,65 kJ/mol (Paunović i sar., 2015).

Pozitivan znak za entalpiju aktivacije podrazumeva endotermno stanje između aktiviranog kompleksa i polaznih reaktanata, što vodi povećanju brzine ekstrakcije sa povećanjem temperature, jer je u ovom slučaju potreban spoljašnji izvor energije da bi se sadržaj vanilinske kiseline povećao u ekstraktu.

Velika negativna vrednost entropije aktivacije karakteristična je za reakcije koje protiču kroz aktivirani kompleks koji uključuje istovremeno molekule oba reaktanata uz stvaranje novih i raskidanje veza u polaznim molekulima. Za ove reakcije kaže se da protiču po asocijativnom mehanizmu (Tušek i sar., 2016).

5. ZAKLJUČAK

Vanilinska kiselina je ekstrahovana iz semena tikve postupkom maceracije. Kao rastvarač korišćen je vodeni rastvori etanola koncentracije 40%(v/v), pri hidromodulu 20 ml/g. Ekstrakcija je izvedena na 25, 35 i 45°C.

Utvrđeno je da se proces ekstrakcije vanilinske kiseline iz semena bundeve postupkom maceracije odvija u dve faze: faza brze ekstrakcije (ispiranje) (prvih 30-tak minuta) i faza spore ekstrakcije (difuzija).

Za modelovanje kinetike ekstrakcije vanilinske kiseline iz semena bundeve 40% etanolom korišćena su tri modela: model zasnovan na teoriji nestacionarne difuzije kroz biljni materijal, empirijski model Ponomarjeva i model zasnovan na teoriji filma. Modeli zasnovani na teoriji nestacionarne difuzije kroz biljni materijal i teoriji filma su bazirani na uprošćenim opisima difuzije ekstraktivnih supstanci iz biljnog materijala u rastvor, s tim što drugi od njih uzima u obzir i ispiranje ekstraktivnih supstanci sa površine čestica biljnog materijala.

Svi korišćeni matematički modeli su dvoparametrijski. Vrednosti kinetičkih parametara, koeficijenti ispiranja (b) i koeficijenti spore ekstrakcije (k) zavise od primenjenog modela kinetike i od temperature. Koeficijenti ispiranja (b) prema modelu zasnovanom na teoriji nestacionarne difuzije kroz biljni materijal imaju veću vrednost od koeficijenata ispiranja prema modelu zasnovanom na teoriji filma i modelu Ponomarjeva. Koeficijenti spore ekstrakcije (k) prema modelu zasnovanom na teoriji filma imaju veću vrednost od koeficijenata spore ekstrakcije prema modelu zasnovanom na teoriji nestacionarne difuzije kroz biljni materijal i modelu Ponomarjeva, koji su međusobno bliski po vrednosti.

Model zasnovan na teoriji nestacionarne difuzije kroz biljni materijal i model Ponomarjeva pokazuju bolje slaganje sa eksperimentalnim podacima u odnosu na model zasnovan na teoriji filma.

LITERATURA

Akomolafe, S.F., Oboh, G., Oyeleye, S. I., Molehin, O. R., Ogunsuyi, O.B. (2016). Phenolic Composition and Inhibitory Ability of Methanolic Extract from Pumpkin (*Cucurbita pepo* L) Seeds on Fe-induced Thiobarbituric acid reactive species in Albino Rat's Testicular Tissue In-Vitro, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6: 115-120

Antić, V.V., Antić, M.P., *Hromatografija u analizi hrane*, Univeritet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 2014.

Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomos, S., Bilić, M., Velić, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds, *Journal of Food Engineering* 81(2007) 236-242

Berenji J., Sikora V. (2011). Sistematika, morfologija, poreklo, genetika o oplemenjivanje uljane tikve. In Berenji . (Ed.), *Uljana tikva – Cucurbita pepo* L. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, pp. 7-82.

Coulson J. M., Richardson J. F. (with Backhurst J.R and Harker J.H.) (1991), *Chemical engineering*, Vol. 2, 4thed: Particle technology and separation processes, Pergamon Press, Oxford, p. 385

Cuvelier, M.E, Richard, H, Berset, C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56:324-325.

Diaz, M.S., Brignole, E.A. (2009). Modeling and optimization of supercritical fluid processs. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47, 611-618.

Dimić, E., Vukša V., Dimić V. (2003). Savremeni pravci razvoja tehnologije jestivih ulja, *Zbornik radova*, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 38: 223-235.

El-Adawy T.A., Taha K.M. (2001). Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chemistry*. 74: 47-54.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R, Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry. Metabolism and structure-activity relationships. *Journal Nutrition Biochemistry*, 13, 572-584.

Hortaçsu, Ö. (2000). Modeling of natural materials extraction „Supercritical Fluids: Fundamentals and Application“. Kiran, E. Debenedetti, P.G., and Peters, C.J., Eds., Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 499-516.

Idouraine, A., Kohlhepp E.A., Weber C.W., Warid W.A., Martinez-Tellez J.J. (1996). Nutrient constituents from eight lines of naked squash (*Cucurbita pepo* L.). *J Agric Food Chem.* 44: 721-724.

Jovanović, M. (2003). Praktikum iz farmaceutske tehnologije sa biofarmacijom I deo. Prvo izdanje. Zemun.

Karabegović, I., Kinetika mikrotalasne ekstrakcije i karakterizacija bioaktivnih komponenti iz lovor višnje (*Prunus laurocerasus* L.), doktorska disertacija, 2011, Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu

Kreft, I., Stibilj V., Trkov Z. (2002). Iodine and selenium contents in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) oil and oil-cake. *Eur Food Res Technol.* 215: 279-281.

Karlović, Đ., Andrić N. (1996). Kontrola kvaliteta semena uljarica. Tehnološki fakultet, Novi Sad, Savezni zavod za standardizaciju, pp. 58-65, Beograd.

Lelley T., Loy B., Murkovic M. (2009). Hull-less oil seed pumpkin. In *Oil Crops, Handbook of plant breeding* 4, Eds. J. Vollmann and I. Rajcan. Springer Science + Business Media, LLC, pp. 469-492.

Lepojević, Ž. (2000). Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda. Novi Sad: Tehnološki fakultet.

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

Mansour, E.H., Dworshak E., Gasi A., Barna E., Gergely A. (1993). Nutritive value of pumpkin (*Cucurbita pepo* Kakai 35) seed products. *J Agric Food Chem.* 61: 73-78

Mitić, M. *Hromatografske metode*, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet u Nišu, 2017.

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

Nikolovski, B. (2009). Kinetika i modelovanje ekstrakcije ulja iz bobica kleke (*Juniperus communis*) i semenki tikve (*Cucurbita pepo*) natkritičnim ugljendioksidom. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad

Pharmacopoea Jugoslavica editio quarta, (*Ph. Jug.* IV). Savezni zavod za zaštitu zdravlja. Beograd. 1984.

Paunović, D.Đ., Mitić, S.S., Stojanović, G.S., Mitić, M.N., Stojanović, B.T., Stojković, M.B. Kinetics of the solid-liquid extraction process of phenolic antioxidants and antioxidant capacity from hop (*Humulus lupulus* L.), Separation Science and Technology, 50 (2015) 1-7

Price, W.E. Spiyzer, J.C., The kinetics of extraction of individual flavanols and caffeine from a Japanese green tea (Sen Cha Uji Tsuyu) as a function of temperature, Food Chemistry, 50 (1994) 19/23

Pekić B., Stojanović D., Lepojević Ž., Tolić A. (1988), Investigation of extraction kinetics of glycosides from leaves of *Digitalis lanata* Ehrh., Pharm. Ind. **50**(8), 984-6.

Ponomarev V. D. 1976. Ekstragirovanje lekarstvennogo syr'ya. Medicina. Moscow.

Popović, M. (2000). Lubenica, dinja, muskatna tikva. Mala poljoprivredna biblioteka, Nolit.

Rac M. (1964). Ulja i masti. Poslovno udruženje proizvođača biljnih ulja i masti, Beograd.

Radojković, M. (2012). Ekstrakti duda (*Morus* spp., *Morasceae*), sastav, delovanje i primena. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad

Rice-Evans, C.A., Packer, L. (2003) Flavonoids in Health and Disease. Boca Raton: CRC Press, 1-43.

Stanković M. Z., Cakić M. D., Cvetković D. M., Veljković V. B. (1994), Kinetics of extraction of resinoids from overground parts of sweet clover (*Melilotus officinalis* L.), J. Serb. Chem. Soc. **59**(10), 735-741.

Schuster, W., Zipse W., Marquard R. (1983). Der Einfluß von Genotyp und Anbauort auf verschiedene Inhaltstoffe von Samen der Ölkürbis (*Cucurbita pepo* L.). Fette Seifen Anstrichmittel. 85: 56-64.

Štrucelj, D. (1981). Prilog poznavanju lipidnih i proteinskih sastojaka bundevinih koštica i promjena nastalih pri preradi, Doktorska disertacija, Prehrambenobioteknološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Teppner H. (2000). *Cucurbita pepo* L. (Cucurbitaceae)—history, seed, coat types, thin coated seeds and their genetics. *Phyton* 40:1-42.

Treybal R. E. (1985), Mass transfer operations, 3th ed., McGraw-Hill, Singapore.

Tušek, A.J., Benković, M., Beščak Cvitanović, A., Valinger, D., Jurina, T., Gajdoš Kljusurić, J. Kinetics and thermodynamics of the solid-liquid extraction process of total polyphenols, antioxidants and extraction yield from *Asteraceae* plants, *Industrial Crops and Products*, 91 (2016) 205-214

Veljković, V.B., Milenović, D.M. Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hzpericum perforatum* L.) II. Poređenje modela kinetike ekstrakcije, *He. Ind.* 56 (2002), 60-67

Veličković, D.T., Milenović, D.M., Ristić, M.S., Veljković, V.B. Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage, *Ultrasonic Sonochemistry*, 13 (2006) 159-156

Veličković, D.T., Milenović, D.M., Ristić, M.S., Veljković, V.B. Ultrasonic extraction of waste solid residues from the *Salvia* sp. Essential oil hydrodistillation, *Biochemical Engineering Journal*, 42 (2008) 97-104

Vidović, S. (2011). Ekstrakcija, sastav, delovanje i moguće primene odabranih vrsta pečuraka. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.

Xu, L., Diosady, L.L. (2010). Fats and Oils from Plant Materials, U: Extraction Optimization in Food Engineering, Tzia, C., Liadakis, G. (Eds), Marcel Dekker Inc., USA.

