

7

Tehnološki postopki pridobivanja pripravkov iz laškega smilja

Katja Kramberger

*Fakulteta za vede o zdravju,
Univerza na Primorskem*



© 2025 Katja Kramberger
<https://doi.org/10.26493/978-961-293-525-2.7>

Uvod

Ekstrakcija in predelava zdravilnih rastlin se izvajata z namenom neposrednega uživanja le-teh kot tradicionalnih zdravil rastlinskega izvora ali priprave za raziskovalne namene. Ustrezna priprava zdravilnih rastlin za raziskovalne namene je ključna za doseganje kakovostnih rezultatov raziskav. Vključuje pravilno in časovno ustrezno nabiranje rastline, morfološko določanje in avtentikacijo rastline s strani ustreznega strokovnjaka, ustrezno sušenje ter mletje suhega materiala. Predpripravi rastlinskega materiala sledi postopek ekstrakcije, pridobljeni izvleček pa lahko nadalje frakcioniramo in iz njega izoliramo posamezne bioaktivne spojine. Pred nadaljnjimi biološkimi testiranjmi je treba določiti tudi kakovost in količino izvlečka oz. bioaktivnih spojin. Za pridobivanje kakovostnega pripravka je ključna izbira ustrezne ekstrakcijske metode, primerne topila, metode frakcioniranja izvlečka in načina identifikacije bioaktivnih spojin. Izbor ustreznih metod pa je odvisen tudi od želene aplikacije izvlečka (Abubakar in Haque 2020).

Ekstrakcija

Ekstrakcija zdravilnih rastlin je postopek ločevanja želenih bioaktivnih spojin ali sekundarnih presnovkov rastlin, kot so flavonoidi, terpeni in glikozidi od surovega neaktivnega materiala. Poznamo več različnih

načinov ekstrakcije; od destilacije, ekstrakcije s topili, ki jo lahko pospešimo s pomočjo ultrazvoka, mikrovalov, pulzirajočega električnega polja, povišanega tlaka ali uporabe encimov, do uporabe metod zelene tehnologije, kot je ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami. Pri konvencionalnih postopkih ekstrakcije, kot so maceracija, perkolacija in ekstrakcija pod refluksom, se večinoma uporabljajo organska topila v velikih količinah, postopek ekstrakcije pa je dolgotrajen. Novejši oz. bolj zeleni postopki, kot so ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami, tekočinska ekstrakcija pod pritiskom in ekstrakcija z mikrovalovi, nudijo določene prednosti, kot so manjše porabe organskih topil, krajši čas ekstrakcije in večja selektivnost (Zhang idr. 2018). V nadaljevanju bomo opisali le tiste postopke, ki so bili, glede na objavljene vire, uporabljeni za pripravo izvlečkov oz. izolacijo spojin iz laškega smilja.

Ekstrakcija bioaktivnih spojin s topili je najpogostejši način ekstrakcije in poteka po sledečih stopnjah: (1) topilo prodira v trdni rastlinski material; (2) topljenec se raztopi v topilu ali mešanici topil; (3) topljenec difundira iz rastlinskega materiala; (4) topilo z ekstrahiranimi bioaktivnimi spojinami (topljenici) se odstrani od rastlinskega materiala (Zhang idr. 2018).

Faktorji, ki vplivajo na učinkovitost ekstrakcije

Faktorji, ki lahko povečajo difuzivnost in topnost, v posameznih korakih ekstrakcije olajšajo sam proces in povečajo izkoristke ekstrakcije. To so fizikalno-kemijske lastnosti ekstrakcijskega topila, velikost trdnih delcev rastlinskega materiala, razmerje med topilom in rastlinskim materialom, temperatura ekstrakcije in čas trajanja ekstrakcije (Zhang idr. 2018).

Izbira topila

Izbira topila je najpomembnejši parameter učinkovitosti ekstrakcije. Glede na zakon o podobnosti in mešanju snovi oz. po načelu »podobno se topi v podobnem« bodo topila s podobno polarnostjo, kot jo imajo topljenici oz. bioaktivne spojine, ki jih želimo izolirati, učinkovitejša pri ekstrakciji teh spojin (Zhang idr. 2018). Topila, ki se običajno uporabljajo pri ekstrakciji zdravilnih rastlin, so bodisi polarna topila (npr. voda, etanol), srednje polarna topila (npr. aceton, diklorometan) ali nepolarna topila (npr. heksan, eter, kloroform). Alkohola, kot sta etanol in metanol, veljata za najuniverzalnejši topili in se ju posledično tudi najpogosteje uporablja. Pri izbiri topila pa imata poleg topnosti in selektivnosti vlogo tudi cena in toksičnost uporabljenega topila (Zhang idr. 2018; Abubakar

Preglednica 1 Lastnosti nekaterih pogosto uporabljenih topil (prirejeno po Abubakar in Haque 2020)

Topilo	Lastnosti	Prednosti	Slabosti
Voda	Najpolarnejše topilo.	• Raztaplja širok nabor (polarnih) spojin. • Poceni, netoksično, nevnetljivo topilo.	• Spodbuja rast bakterij in plesni. • Lahko povzroči hidrolizo. • Za koncentriranje izvlečka potrebno veliko energije.
Alkohol	Polarno topilo, mešljivo z vodo.	• Deluje kot konzervans pri konc., večjih od 20 %. • Netoksično pri nizkih konc. • Za koncentriranje izvlečka potrebno malo energije.	• Ne raztaplja maščob in voskov. • Vnetljivo in hlapno topilo.
Aceton	Srednje polarno topilo, mešljivo z vodo kot tudi z nepolarnim heksanom.	• Raztaplja tako polarne kot nepolarne snovi. • Hitro se upari.	• Vnetljiv.
Kloroform	Nepolarno topilo, primerno za izolacijo terpenov, maščob in olj.	• Brezbarven, topen v alkoholu.	• Sedativni in karcinogeni učinek.

in Haque 2020). V preglednici 1 so predstavljene prednosti in slabosti nekaterih pogosto uporabljenih topil.

Velikost delcev rastlinskega materiala

V splošnem velja, da manjša kot je velikost delcev, učinkovitejša bo ekstrakcija, saj lahko topilo bolje prodre v rastlinski material in difundira topljence. Če bodo delci predrobni, se bo preveč topila absorbiralo v trdni material, kar lahko oteži nadaljnji postopek filtracije.

Temperatura

Visoka temperatura poveča topnost in difuzijo ter s tem učinkovitost ekstrakcije. Vendar pa lahko previsoka temperatura poveča ekstrakcijo neželenih snovi oz. nečistoč ter povzroči razgradnjo termolabilnih spojin.

Čas ekstrakcije

Učinkovitost ekstrakcije se bo s podaljševanjem trajanja ekstrakcije večala, vendar ko se doseže ravnovesje med topljencem znotraj in zunaj rastlinskega materiala, daljšanje časa ekstrakcije ne bo več vplivalo na večji izkoristek.

Razmerje topilo : rastlinski material

Večje kot bo razmerje med topilom in rastlinskim materialom, večji bo izkoristek ekstrakcije, s tem da večje kot je razmerje, daljši bo proces koncentriranja izvlečka (Zhang idr. 2018).

Ekstrakcijske metode

Destilacija

Parna destilacija in hidrodestilacija sta dva najpogostejša načina za pridobivanje eteričnih olj, saj sta cenovno najugodnejša. Pri parni destilaciji para prodira v rastlinski material, kar omogoči uparitev hlapnih spojin. Hlapne spojine se v kondenzatorju, kamor doteka hladna voda, utekočinijo in zberejo v zbirni posodi, kjer imamo na vrhu plast eteričnega olja, pod njo pa plast vode (Kumar in Tripathi 2011). Ta vodna faza, ki je stranski produkt destilacije, se imenuje hidrolat ali aromatična voda in vsebuje sledove eteričnega olja ter druge vodotopne spojine (Almeida idr. 2024). V primeru hidrodestilacije se material za nekaj časa namoči v vodi, potem se namočen material segreva, hlapne spojine pa se skupaj z vodno paro uparijo in pod refluksom kondenzirajo. Ker destilacija poteka pri visoki temperaturi, je možen razpad nekaterih bioaktivnih spojin. Prisotnost vode lahko privede tudi do hidrolize estrov, polimerizacije aldehydov in razgradnje drugih spojin. S tega vidika je parna destilacija primernejša izbira za izolacijo eteričnih olj iz toplotno občutljivih rastlin. Slabosti omenjenih metod so slabi izkoristki eteričnega olja, izguba nekaterih hlapnih spojin in dolg čas izolacije (Pheko-Ofitlhile in Makhzoum 2024).

Za destilacijo nadzemnih delov laškega smilja se največkrat uporablja hidrodestilacija v Clavengerjevi aparaturi, s katero lahko določimo tudi količino pridobljenega eteričnega olja, nekateri avtorji pa so uporabili tudi parno destilacijo v aparatu tipa spring (Maksimovic idr. 2017).

Maceracija

Maceracija je najpreprostejši način ekstrakcije, katere slabosti sta dolg čas ekstrakcije in slaba učinkovitost, saj poteka pri sobni temperaturi.

Ravno zaradi slednjega pa je tak način primeren za izolacijo termolabilnih spojin. Učinkovitost maceracije lahko povečamo z dodatkom ultrazvoka, mikrovalov ali s segrevanjem (Zhang idr. 2018).

Pri postopku maceracije se grobo mlet material položi v posodo in prelije s topilom, tako da je popolnoma prekrit. Posodo se nato zapre in material pusti namakati vsaj tri dni pri sobni temperaturi, lahko tudi zaščitene pred svetlobo. Vmes vsebino občasno premešamo. Po koncu ekstrakcije se izvleček loči od namočenega rastlinskega materiala s filtracijo ali z odlivanjem. Topilo se lahko odstrani z izparevanjem (Abubakar in Haque 2020).

Najpogosteje uporabljana topila za pripravo izvlečkov in izolacijo učinkovin iz smilja so aceton, metanol ter etanol, v nekaterih raziskavah pa so uporabili tudi kloroform, petrol eter, diklorometan, dietil eter in heksan. Izkoristki ekstrakcije so bili glede na objavljene podatke med 2,2 in 12,5 % (Maksimovic idr. 2017).

Maceracija z lipidi (olji ali mastmi) je eden izmed postopkov pridobivanja aromatičnih maceratov, ki se pogosto uporabljajo za izdelavo domačih mazil in drugih kozmetičnih izdelkov. Na Korziki sveže cvetove smilja poberejo in položijo v steklenico z oljčnim oljem. Nato steklenice zaprejo in jih postavijo na sonce za vsaj tri tedne. Po koncu ekstrakcije rastlinski material dobro odcedijo, da iz njega iztisnejo čim več učinkovin. Takšen macerat je bogat z nepolarnimi spojinami, macerirano olje pa je zaradi solarizacije bolj tekoče in vpojnejše ob nanosu na kožo. Lahko je osnova za pripravo drugih kozmetičnih izdelkov ali se kot takšno uporablja za masažo pri brazgotinah, modricah (Production Farm Est. Palneca b. l.).

Priprava poparkov

Pri pripravi poparkov gre za podobno načelo kot pri maceraciji, s tem da gre tukaj za bistveno krajše namakanje v topilu, ki je v večini primerov vroča voda. Poparke pripravimo tako, da fino mlet rastlinski material prelijemo z vročo ali vrelo vodo in ga pustimo namakati v vodi od pet do 15 minut. Po tem času poparek precedimo, da odstranimo rastlinski material. Ta metoda je primerna za izolacijo dobro (vodo)topnih spojin (Abubakar in Haque 2020). Priprava poparkov je zaradi visoke temperature učinkovitejša od maceracije, lahko pa na tak način izgubimo nekaj toplotno občutljivih biokativnih spojin.

Poparki se največkrat pripravljajo sveži, tik pred uporabo. Na tak način pripravljamo vse čaje, zelo priljubljene osvežilne napitke, ki so lahko pravi

čaji, pripravljeni iz listov čajevca, ali sadni ter zeliščni poparki, kot tudi zdravilne čaje, ki morajo biti ustrezne kakovosti in imeti točno predpisan način priprave (Rocha idr. 2020).

Poparki iz smilja so najpogostejše pripravljene izvlečki v ljudski medicini, njihovo kemijsko sestavo in učinke pa so preučevali tudi Catarina G. Pereira idr. (2017) ter Katja Kramberger idr. (2021). Catarina G. Pereira idr. (2017) so 1 g suhe rastline (ločene na korenine, vegetativne dele in cvetove) prelili z 200 ml vrele vode in poparek po petih minutah precedili (Pereira idr. 2017). V naših raziskavah na Univerzi na Primorskem, Fakulteti za vede o zdravju (UP FVZ) smo za pripravo poparka uporabili samo nadzemne dele rastline (liste, stebila in cvetove), poparek pa smo precedili po desetih minutah (Kramberger idr. 2021).

Priprava prevretkov

Pri tej metodi gre za kontinuirano ekstrakcijo z vročo vodo. Prevretek pripravimo tako, da dobro mlet rastlinski material prelijemo z vrelo vodo in ga še nekaj časa kuhamo na ognju, navadno ne dlje kot 15 minut (Abubakar in Haque 2020). Tovrstna ekstrakcija je sicer učinkovitejša od maceracije in priprave poparka, vendar pa ni primerna izbira za termolabilne in hlapne spojine. V prevretkih so navadno prisotne tudi večje količine vodotopnih nečistoč (Zhang idr. 2018).

Podobno kot poparki so tudi prevretki pogosto pripravljene izvlečki v ljudski medicini. Catarina G. Pereira idr. (2017) so prevretke iz *H. italicum* subsp. *picardii* pripravili s petminutnim vretjem 1 g suhega materiala v vreli vodi. Prevretke so pripravili samo iz korenin ali iz vegetativnih delov ali samo iz cvetov (Pereira idr. 2017).

Ekstrakcija po Soxhletu

Ta vrsta ekstrakcije združuje uporabo ekstrakcije pod refluksom in perkolacije – postopka ekstrakcije, kjer se topilo ves čas menjava s svežim. Soxhletov aparat (steklena aparatura podobna destilatorju) omogoča avtomatizirano in kontinuirano ekstrakcijo z visoko učinkovitostjo (Zhang idr. 2018). Zmlet rastlinski material se napolni v porozno vrečko, skozi katero po kapljicah prehaja kondezirano topilo. Ko se ekstrakcijska posoda napolni s kondenziranim topilom, se le-to skupaj z izvlečkom vrne v bučko, kjer se topilo ponovno upari in preko kondenzorja v tekoči obliki vrne v ekstrakcijsko posodo. Ekstrakcija poteka tako dolgo, dokler rastlinski material ni popolnoma ekstrahiran (Abubakar in Haque 2020).

Čas takšne ekstrakcije je posledično krajši in poraba topil je v primerjavi z maceracijo ali perkolacijo manjša. Ekstraktov tudi ni treba filtrirati, saj rastlinski material ostane v vrečki. Zaradi segrevanja pa lahko pride do razpada nekaterih občutljivih učinkovin (Zhang idr. 2018).

Maja Molnar idr. (2017) so za ekstrakcijo 5 g cvetov laškega smilja uporabili Soxhletov aparat in 150 ml n-heksana kot topila. Ekstrakcija je potekala osem ur, izkoristek pa je bil približno pet odstoten (Molnar idr. 2017).

Ekstrakcija z uporabo ultrazvoka

Pri ekstrakciji z uporabo ultrazvoka, imenovani tudi ultrazvočna ekstrakcija ali sonikacija, izkoriščamo energijo ultrazvoka pri frekvencah, večjih od 20 KHz. Ultrazvok povzroči kavitacijo topila in pospeši raztapljanje ter difuzijo topljenca kot tudi prenos toplote, kar izboljša učinkovitost ekstrakcije. Naslednje prednosti te metode so tudi majhna poraba topil in energije, skrajšanje časa ekstrakcije in uporaba nižjih temperatur. Metoda je tako primerna za ekstrakcijo termolabilnih spojin, lahko pa energija ultrazvoka povzroči razpad nekaterih občutljivih spojin zaradi nastanka prostih radikalov (Zhang idr. 2018; Abubakar in Haque 2020).

Brigida D'Ambrosia idr. (2013) so pripravili metanolni izvleček iz listov ali stebel laškega smilja s pomočjo ultrazvoka. Posamezna ekstrakcija je trajala eno uro. Dobljena izvlečka so prečistili, frakcionirali in izolirali posamezne bioaktivne spojine (D'Ambrosia idr. 2013). V naši raziskavi (Kramberger idr. 2020) smo pripravili izvlečke laškega smilja podvrst *italicum* in *tyrrhenicum*. Ekstrakcijo smo izvedli s hladno vodo v dveh korakih – 2,5 g suhega rastlinskega materiala smo prelili s 30 ml hladne vode in ga 60 minut ekstrahirali v ultrazvočni kadički, odlili ekstrakt in preostali rastlinski material ponovno ekstrahirali z 20 ml sveže hladne vode še 30 minut. Oba ekstrakta smo nato združili. Tak izvleček je imel sicer visoko vsebnost fenolnih spojin, njegovo antioksidativno delovanje pa je bilo šibko (Kramberger idr. 2020).

Ekstrakcija s superkritičnim CO₂

Alternativa konvencionalnim postopkom ekstrakcije je ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami. Superkritična tekočina ima podobno topnost kot tekočina in podobno difuzivnost kot plin, zato lahko raztaplja širok nabor naravnih spojin. Najpogosteje se za tovrstno ekstrakcijo uporablja superkritični ogljikov dioksid – S-CO₂, ker ima nizko kritično temperaturo (31 °C), je selektiven, inerten, netoksičen in poceni. Zaradi svoje

nepolarnosti je S-CO₂ idealen za izolacijo lipofilnih snovi, kot so lipidi in eterična olja. Z ustreznim spreminjanjem parametrov tlaka in temperature pa lahko izoliramo tudi polarnejše spojine. Pri milejših pogojih ($P = 90\text{--}100$ bar in $T = 40\text{--}50$ °C) tako dobimo eterična olja, pri ostrejših pa nepolarne in srednje polarne fenolne spojine ($P = 600$ bar; $T =$ do 120 °C). Za izolacijo polarnejših polifenolov je treba dodati organski modifikator (npr. etanol, metanol) (Zhang idr. 2018). Ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami ima kar nekaj prednosti v primerjavi s tradicionalnimi postopki zaradi možnosti spreminjanja parametrov ekstrakcije, kar omogoča izolacijo različnih razredov spojin, tudi termolabilnih. Je okolju prijaznejša metoda, saj porabimo manj organskih topil, ter energetsko varčnejša, saj ni treba dovajati energije za odstranjevanje topil in koncentriranje končnih izvlečkov (Reverchon in De Marco 2006).

Nekaj raziskav kemijske sestave laškega smilja je bilo narejenih tudi na izvlečkih s S-CO₂. Pogoji ekstrakcije so bili med 80 in 350 bar, med 35,86 in 64,14 °C in so trajali od 1,5 do štiri ure. Izkoristki ekstrakcije so bili v območju 0,35 do 6,31 %. Spojine, ki so jih izolirali, so bile večinoma nepolarni terpeni, predvsem mono- in seskviterpeni, ter drugi ogljikovodiki, kisline, estri in voski (Maksimovic idr. 2017). Stela Jokić idr. (2016) so uporabili tovrstno ekstrakcijo za selektivno izolacijo kumarina skopoletina iz cvetov laškega smilja. Največjo vsebnost skopoletina (1,933 mg/100 g) je imel izvleček, pripravljen pri 20 MPa in 40 °C (Jokić idr. 2016).

Separacijske metode

Surovi izvlečki, pripravljeni po zgoraj opisanih metodah, imajo kompleksno kemijsko sestavo, saj vsebujejo številne bioaktivne spojine in druge izolirane spojine. Surove izvlečke je tako treba še frakcionirati in prečistiti, da dobimo aktivno frakcijo izvlečka oz. čisto bioaktivno spojino. Ločba temelji na fizikalnih in kemijskih razlikah med posameznimi spojinami v izvlečku. Za izolacijo čiste spojine iz kompleksnih rastlinskih vzorcev so najprimernejše razne kromatografske tehnike, predvsem kolonska kromatografija (Zhang idr. 2018).

Frakcionacija

Za frakcionacijo izvlečka je navadno treba navlažiti posušen surovi izvleček oz. ga popolnoma raztopiti v vodi, prenesti v lij ločnik, pretresti in pustiti, da se posede. Nato se k izvlečku dodaja topila po naraščujoči polarnosti; najprej npr. n-heksan, ki je najbolj nepolaren, nato kloroform, sledi srednje polaren aceton in nazadnje n-butanol. Najprej se izvlečku

Preglednica 2 Pregled različnih metod za ekstrakcijo naravnih spojin (prirejeno po Zhang idr. 2018)

Metoda	Topilo	Temperatura	Tlak	Čas	Volumen organskega topila	Polarnost izoliranih spojin
Maceracija	Voda ali nevodna topila	Sobna T	Atm	Dolg	Velik	Odvisno od topila
Priprava poparka	Voda	Voda s T 70–100 °C	Atm	Kratek	Nič	Polarna
Priprava prevretka	Voda	Segrevanje	Atm	Kratek	Nič	Polarna
Ekstrakcija po Soxhletu	Organska topila	Segrevanje	Atm	Dolg	Srednji	Odvisno od topila
Ekstrakcija z ultrazvokom	Voda in nevodna topila	Sobna T ali segrevanje	Atm	Kratek	Srednji	Odvisno od topila
Superkritična ekstrakcija	Superkritični CO ₂	Blizu sobne T	Visok	Kratek	Nič	Nepolarna do srednje polarna
Destilacija	Voda	Segrevanje	Atm	Dolg	Nič	Nepolarna (eterična olja)

doda količino najmanj polarnega topila, n-heksana, in vsebino močno pretrese. Ko se fazi ločita, se odstrani spodnjo vodno fazo, nepolarno fazo, ki predstavlja prvo frakcijo, pa se prelije v čisti vsebnik. Vodni fazi se ponovno doda enako količino n-heksana in po stresanju loči faze. Postopek ponavljamo, dokler po dodatku n-heksana ni več znatnega premika vodnega izvlečka v nepolarno fazo. Potem sledi dodatek polarnejšega topila, kloroforma. Nepolarno fazo po vsaki ločbi zbiramo, da dobimo naslednjo frakcijo izvlečka. Potem se preostalemu vodnemu izvlečku doda naslednje topilo, aceton, da dobimo tretjo frakcijo, in nazadnje n-butanol za četrto frakcijo. Po koncu vseh frakcionacij ostane vodna (peta) frakcija izvlečka (Abubakar in Haque 2020).

Čiščenje in dodatna ločba

Frakcionirane izvlečke nato očistimo oz. dodatno frakcioniramo z uporabo kromatografskih tehnik. Ločba spojin poteka glede na njihovo velikost, obliko in naboj. Sistem vsebuje mobilno fazo, ki je navadno enaka ekstrakcijskemu topilu, in stacionarno fazo. Vezava spojin na stacionarno fazo lahko temelji na mehanizmi adsorpcije, porazdeljevanja, afinitete vezave, ionske izmenjave ali velikostne izključitve (Abubakar in Haque 2020).

V začetnih fazah ločbe se najpogosteje uporablja adsorpcijsko kolonsko kromatografija, saj je preprosta, ima visoko kapaciteto in je stroškovno ugodna. Ločba poteka na osnovi razlik posameznih spojin za tvorbo interakcij s površino adsorbenta. Izbira ustreznega adsorbenta (stacionarne faze) kot tudi mobilne faze je ključnega pomena za doseganje dobre ločbe spojin in maksimalni izkoristek ciljnih spojin. V večini primerov stacionarna faza vsebuje silikagel, ki je polarni adsorbent, na katerega se vežejo molekule z vodikovimi vezmi in interakcijami dipol–dipol. Polarne spojine se bodo torej dalj časa zadržale na koloni v primerjavi z nepolarnimi. Stacionarna faza so lahko tudi poliamidi, ki glede na sestavo mobilne faze tvorijo bodisi hidrofozne bodisi vodikove vezi. Če je mobilna faza voda, bodo poliamidi delovali kot nepolarna stacionarna faza. Poliamidna kromatografija je primerna za izolacijo fenolnih kislin in flavonoidov (Zhang idr. 2018). Pogosto uporabljena stacionarna faza so tudi makroporozne smole brez ionskih funkcionalnih skupin, ki lahko selektivno adsorbirajo skoraj vse naravne spojine. Lahko se uporabljajo samostojno ali samo kot stopnja v predpripravi izvlečka za odstranjevanje nečistoč ali v obogatitvi izvlečka s tarčnimi spojinami. Makroporozne smole imajo visoko kapaciteto adsorpcije, so relativno cenovno ugodne in enostavne za regeneracijo. Ločba temelji na elektrostatskih silah, vodikovih vezeh, tvorbi kompleksov in velikostni izključitvi. Ključni faktorji, ki vplivajo na ločbo, so torej površina, premer por in polarnost (Zhang idr. 2018).

Ločba lahko temelji tudi na osnovi velikosti molekul. Po tem načelu delujeta membranska filtracija in gelska izključitvena kromatografija. Pri membranski filtraciji semipermeabilna membrana omogoča prehod majhnih molekul, večje molekule pa se zadržijo na membrani. Ta metoda je zelo uporabna za koncentriranje izvlečkov in odstranjevanje nečistoč. Pri gelski izključitveni kromatografiji se majhne molekule dlje časa zadržijo na koloni kot velike. Pogosta stacionarna faza je sephadex, ki je sestavljen iz premreženega dekstrana. Sephadex LH20 je hidroksipropiliran derivat dekstrana, ki tvori tako hidrofozne kot hidrofilne interakcije, tako da je primeren za ločevanje širokega nabora spojin, bodisi v vodnih bodisi nevodnih topilih.

Ionsko izmenjevalna kromatografija ločuje molekule glede na razlike v njihovem celokupnem naboju. S to metodo lahko torej ločimo tiste naravne spojine, ki lahko ionizirajo, npr. alkaloidne in organske kisline. Stacionarna faza vsebuje ionsko izmenjevalne smole, ki privlačijo enako nabite spojine, odbijajo pa tiste, ki imajo drugačen naboj. Kationsko

izmenjevalne smole tako vežejo alkaloide, anionsko izmenjevalne pa organske kisline in fenole. S spreminjanjem ionske moči mobilne faze (s spremembo pH ali koncentracije soli) pa vplivamo na vezavo oz. sprostitev tarčnih spojin (Zhang idr. 2018).

Kromatografske tehnike, ki so najpogostejše v uporabi za separacijo spojin v rastlinskih izvlečkih, so tankoplastna tekočinska kromatografija (angl. *thin-layer chromatography* – TLC), kolonska kromatografija (angl. *column chromatography* – CC), plinska kromatografija (angl. *gas chromatography* – GC) in tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (angl. *high-performance liquid chromatography* – HPLC). Mehanizem ločbe pri posamezni metodi je lahko samo en ali jih je več.

TLC je metoda, ki temelji samo na mehanizmu adsorpcije in je primerna predvsem za ločbo spojin z majhno molekulsko maso. Stacionarna faza je navadno silikagel, raztopljen v vodi. Raztopino silikagela se nato vlije na stekleno ploščo ustreznih dimenzij, da tvori 1,5 mm debelo plast. Sledi sušenje pri 105 °C, da se silikagel strdi. Na trdno ploščico silikagela se nato nanese vzorec in se jo navpično položi v posodo z mobilno fazo. Spojine bodo na ploščici prepotovale različno dolgo pot glede na svojo topnost. Za vsako liso lahko izračunamo retencijski faktor, ki je razmerje med prepotovano potjo spojine in prepotovano potjo topila. Rezultat lahko primerjamo z znano spojino. Spojine lahko s spatulo postrgamo s ploščice in jih ponovno ekstrahiramo. Prednosti te metode sta predvsem kratek čas ločbe in enostavnost.

Ločba pri kolonski kromatografiji temelji na adsorpciji, velikostni izključitvi in ionski izmenjavi. Kolona je sestavljena iz dolge steklene cevke premera 5–50 mm, ki ima na dnu ventil in filter iz steklene volne. Stacionarna faza je lahko iz silikagela, sephadexa ali smole, mobilna faza pa je tekoča. Stacionarno fazo se napolni v kolono in na vrh slednje nanese izvleček. Sledi dodatek mobilne faze – topila z najmanjšo polarnostjo. Po eni uri se mobilno fazo izpusti iz kolone in zbere frakcije. Nato lahko sledi še spiranje kolone z drugimi topili po naraščajoči polarnosti. Zbrane frakcije se nato lahko karakterizira.

Z metodo plinske kromatografije ločujemo hlapne snovi na osnovi porazdeljevanja med tekočo in plinasto fazo. Mobilna faza je v plinasti obliki, tekoče topilo pa je adsorbirano na površino inertnih trdnih delcev in služi kot stacionarna faza. Spojine, ki so topne v plinasti fazi, bodo zapustile tekočino in se porazdelile v plinasto mobilno fazo ter potovale s hitrostjo pretoka mobilne faze. Spojine, ki so topne samo v tekoči fazi,

bodo ostale v stacionarni fazi. Spojine, ki so topne v obeh fazah, bodo potovale s srednjo hitrostjo. Mobilna faza je navadno inertni helij. Surovi izvleček, ki vsebuje hlapne snovi, se najprej raztopi v metanolu, nato se ga upari in injicira na začetek kromatografske kolone. Sledi potovanje po koloni skupaj s plinasto mobilno fazo (Abubakar in Haque 2020; Ingle idr. 2017). Metoda je predvsem kvantitativna, saj lahko določimo celokupno količino hlapnih spojin (Sahira Banu in Cathrine 2015). Za določanje sestave eteričnih olj in hidrolatov je detektor navadno masni spektrometer (MS) ali plamensko ionizirajoči detektor (angl. *flame ionization detector* – FID) (Almeida idr. 2024).

HPLC je učinkovita metoda za ločbo spojin in temelji na mehanizmu adsorpcije. Ločimo lahko tako organske kot anorganske spojine. Stacionarna faza je sestavljena iz trdnih delcev, tesno stisnjenih v kolono. Stacionarna faza je navadno nepolarni C18, mobilna faza pa je polarna – mešanica vode in še nekega drugega topila, ki dobro raztaplja analite v vzorcu. Za elucijo analitov so potrebni visoki pritiski do 400 bar. Aparatura je sestavljena iz vsebnika za mobilno fazo, injektorja, črpalke in detektorja. Vzorec injiciramo in ga s pomočjo črpalke skupaj z mobilno fazo vodimo čez kolono, kjer poteka ločba spojin (Abubakar in Haque 2020; Ingle idr. 2017). Na koncu detektor zazna spojine in pošlje signal do računalnika. Osnovni detektor je navadno detektor UV-VIS, ki omogoča merjenje absorpcijskega spektra naenkrat samo pri eni valovni dolžini, ali detektor z nizom diod (angl. *diode array detector* – DAD), ki istočasno posname spektre v celotnem območju UV-VIS. Če želimo spojine identificirati natančneje, za detekcijo izberemo masni detektor. Z metodo HPLC lahko ločimo in detektiramo nehlapne spojine oz. spojine, ki so občutljive na toploto. Metoda je lahko tako kvantitativna kot kvalitativna (Abubakar in Haque 2020; Sahira Banu in Cathrine 2015).

Identifikacija bioaktivnih spojin

Identiteto spojin lahko določimo s kromatografskimi metodami, sklopljenimi z masno spektrometrijo (npr. HPLC-MS, GC-MS), medtem ko je za določitev točne kemijske strukture novih spojin potrebna uporaba spektroskopskih metod, kot sta jedrna magnetna resonanca (angl. *nuclear magnetic resonance* – NMR) in infrardeča (angl. *infrared* – IR) spektroskopija. Osnovno načelo spektroskopskih metod je prehod elektromagnetnega sevanja skozi organsko molekulo, ki absorbira del prejetega sevanja. Z merjenjem količine absorbiranega sevanja se lahko ustvari spekter, ki je specifičen za določene vezi v molekuli. Na podlagi posnetega

spektra in primerjavi le-tega s spektrom znane spojine se lahko določi strukturo preučevane molekule (Altemimi idr. 2017).

Pogost in najosnovnejši način detekcije spojin je z UV-spektroskopijo. Metoda omogoča tako kvalitativno kot kvantitativno analizo spojin, prisotnih v rastlinskem izvlečku. Številni sekundarni presnovki absorbirajo svetlobo pri točno določeni valovni dolžini: flavonoidi pri 330 nm, fenolne spojine pri 280 nm, antocianini pri 520 in fenolne kisline pri 360 nm. Metoda UV-VIS sicer ni najselektivnejša, zato je primernejša za kvantifikacijo celokupnih polifenolnih spojin. Njene prednosti so kratek čas analize, enostavnost in cenovna ugodnost v primerjavi z drugimi metodami (Abubakar in Haque 2020; Altemimi idr. 2017).

Masna spektrometrija omogoča identifikacijo spojin na osnovi njihove kemijske strukture in molekulske mase. Gre za zmogljivo analitsko metodo, ki se uporablja za identifikacijo neznanih spojin, kvantifikacijo znanih spojin in določanje kemijske strukture molekul. Organske molekule v vzorcu se najprej pretvori v visoko energijsko nabito ionizirano obliko, navadno z ionizacijo z razprševanjem, nato detektor posname spekter fragmentiranih ionov. Masni spekter je graf relativne pogostosti fragmentiranega iona glede na razmerje med maso in nabojem tega iona. Signal je relativna molekulska masa fragmentiranega iona glede na njegov naboj. Na tak način lahko z veliko natančnostjo določimo relativno molekulsko maso in glede na vzorec fragmentacije tudi molekulsko formulo spojine (Abubakar in Haque 2020; Altemimi idr. 2017).

Z jedrsko magnetno resonanco določamo predvsem magnetne lastnosti določenih atomskih jeder, največkrat vodikovega atoma ali protona, ogljikovega atoma in izotopov ogljika. Določimo lahko tudi postavitev atomov v molekuli. Z NMR lahko določimo razlike med različnimi atomskimi jedri in s tem njihov položaj v molekuli. Določimo lahko, kateri atomi so prisotni v skupinah, vezanih na ta atom, in koliko jih je. S ^{13}C -NMR identificiramo vrste ogljikovih atomov, ki so prisotni v spojini, s ^1H -NMR pa, katere vrste vodika so prisotne in kako so vodikovi ioni med seboj povezani (Abubakar in Haque 2020; Altemimi idr. 2017; Sahira Banu in Cathrine 2015).

Z metodo infrardeče spektroskopije poskušamo določiti prisotnost funkcionalnih skupin v molekuli, določimo pa lahko tudi prisotnost enojnih, dvojnih in trojnih vezi. Organsko spojino obsevamo z IR-svetlobo, ki se absorbira pri določenih valovnih dolžinah. Svetloba IR ima dovolj energije, da vzbudi molekulske vibracije na višje energijske ravni. Rezultat je

spekter, ki predstavlja delež transmitirane svetlobe. Valovna dolžina absorpcijskih pasov je značilna za določeno vrsto kemijskih vezi, zato lahko z IR-spektroskopijo kvalitativno analiziramo organske spojine. Predvsem lahko potrdimo identiteto določene spojine, če posneti spekter primerjamo z referenčnim, v pomoč pa nam je tudi pri določanju strukture novosintetiziranih molekul. Tekoči vzorci so identificirani na ploščah z natrijevim kloridom, trdni vzorci pa s kalijevim bromidom in stisnjeni v tanek pelet (Abubakar in Haque 2020; Sahira Banu in Cathrine 2015).

Viri

- Abubakar, A. R., in M. Haque. 2020. »Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes.« *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 12 (1): 1–10. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_175_19.
- Almeida, H. H. S., I. P. Fernandes, J. S. Amaral, A. E. Rodrigues in M.-F. Barreiro. 2024. »Unlocking the Potential of Hydrosols: Transforming Essential Oil Byproducts into Valuable Resources.« *Molecules* 29 (19): 4660.
- Altemimi, A., N. Lakhssassi, A. Baharlouei, D. G. Watson in D. A. Lightfoot. 2017. »Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts.« *Plants* 6 (4): 42.
- D'Ambrosia, B., E. Buommino, G. D'Angelo idr. 2013. »Spectroscopic Identification and Anti-Biofilm Properties of Polar Metabolites from the Medicinal Plant *Helichrysum italicum* Against *Pseudomonas aeruginosa*.« *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 21 (22): 7038–7046.
- Ingle, K. P., A. G. Deshmukh, D. A. Padole, M. S. Dudhare, M. P. Moharil in V. C. Khelurkar. 2017. »Phytochemicals: Extraction Methods, Identification and Detection of Bioactive Compounds from Plant Extracts.« *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6 (1): 32–36.
- Jokić, S., M. Rajić, B. Bilić in M. Molnar. 2016. »Supercritical Extraction of Scopoletin from *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Flowers.« *Phytochemical Analysis: PCA* 27 (5): 290–295.
- Kramberger, K., Z. Jenko Pražnikar, A. Baruca Arbeiter, A. Petelin, D. Bandelj in S. Kenig. 2021. »A Comparative Study of the Antioxidative Effects of *Helichrysum italicum* and *Helichrysum arenarium* Infusions.« *Antioxidants* 10 (3): 380.
- Kramberger, K., D. Barlič-Maganja, D. Bandelj idr. 2020. »HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS Determination of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity Comparison of the Hydroalcoholic and Water Extracts from Two *Helichrysum italicum* Species.« *Metabolites* 10 (10): 403.

- Kumar, R., in Y. C. Tripathi. 2011. »Getting Fragrance from Plants.« V *Training Manual on Extraction Technology of Natural Dyes & Aroma Therapy and Cultivation Value Addition of Medicinal Plant*. Forest Research Institute.
- Maksimovic, S., V. Tadic, D. Skala in I. Zizovic. 2017. »Separation of Phytochemicals from *Helichrysum italicum*: An Analysis of Different Isolation Techniques and Biological Activity of Prepared Extracts.« *Phytochemistry* 138 (22): 9-28.
- Molnar, M., I. Jerković, D. Suknović idr. 2017. »Screening of Six Medicinal Plant Extracts Obtained by Two Conventional Methods and Supercritical CO₂ Extraction Targeted on Coumarin Content, 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radical Scavenging Capacity and Total Phenols Content.« *Molecules* 22 (3): 348.
- Pereira, C. G., L. Barreira, S. Bijttebier itd. 2017. »Chemical Profiling of Infusions and Decoctions of *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* by UHPLC-PDA-MS and *in vitro* Biological Activities Comparatively with Green Tea (*Camellia sinensis*) and Rooibos Tisane (*Aspalathus linearis*).« *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 145 (11): 593-603.
- Pheko-Ofitlhile, T., in A. Makhzoum. 2024. »Impact of Hydrodistillation and Steam Distillation on the Yield and Chemical Composition of Essential Oils and Their Comparison with Modern Isolation Techniques.« *Journal of Essential Oil Research* 36 (2): 105-115.
- Production Farm Est. Palneca. B. I. »Triple Solar Maceration with the *Helichrysum italicum* Essential Oil.« <https://www.helichrysum-italicum.com/macerate>.
- Reverchon, E., in I. De Marco. 2006. »Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Natural Matter.« *The Journal of Supercritical Fluids* 38 (2): 146-166.
- Rocha, C., A. P. Moura in L. M. Cunha. 2020. »Consumers' Associations with Herbal Infusions and Home Preparation Practices.« *Food Quality and Preference* 86:104006.
- Sahira Banu, K., in L. Cathrine. 2015. »General Techniques Involved in Phytochemical Analysis.« *International Journal of Advanced Research in Chemical Science* 2 (4): 25-32.
- Zhang, Q.-W., L.-G. Lin in W.-C. Ye. 2018. »Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products: A Comprehensive Review.« *Chinese Medicine* 13 (1): 20.