

»MLADI ZA NAPREDEK MARIBORA«

33. SREČANJE

Ekstrakcija tujona iz *Thuje occidentalis* s superkritičnim CO₂

BIOTEHNOLOGIJA, KMETIJSTVO, ŽIVILSTVO

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: ALENKA HAFNER
Mentor: ZDENKA KEUC
Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

2016, Maribor

»MLADI ZA NAPREDEK MARIBORA«

33. SREČANJE

Ekstrakcija tujona iz *Thuje occidentalis* s superkritičnim CO₂

BIOTEHNOLOGIJA, KMETIJSTVO, ŽIVILSTVO

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

2016, Maribor

Zahvala

Rada bi se zahvalila svoji mentorici brez katere bi bilo moje raziskovanje težje. Prav tako gre zahvala Laboratoriju za separacijske procese na Fakulteti za kemijo in kemijski inženiring Univerze Maribor, kjer sem ne le izvedla eksperiment, ampak pridobila tudi veliko ključnih informacij. Nazadnje se zahvaljujem še šolski koordinatorici raziskovalne dejavnosti, ki je poskrbela za mojo dobro obveščeno in objavo naloge.

Povzetek

Tujon je kontroverzna molekula zanimiva za raziskovanje, saj je tujon halucinogen ter ima potencialne antimikrobne učinke. Da bi le te lahko raziskovali potrebuje ekstrakt rastline s čim višjo vsebnostjo tujona in brez dodatnih topil, ki bi lahko motila rezultate. V raziskovalni nalogi sem odgovorila na vprašanje: »Je ekstrakcija s superkričnim CO₂ učinkovita metoda pridobivanja tujona iz iglic *Thuje occidentalis*?« Učinkovitost metode sem preverila s ATR - IR spektroskopijo in tankoplastno kromatografijo. Rezultati so pokazali, da pridobljen ekstrakt vsebuje 13,5% tujona ter, da so v njem prisotne tudi druge molekule. Zaradi tega je metoda relativno primerna, a bi potrebovala optimizacijo glede temperature in tlaka med ekstrakcijo za večji donos. S takšnim ekstraktom se lahko bioaktivnost rastline omeji na peščico molekul s preprostimi antimikrobnimi testi.

Kazalo vsebine

1. UVOD	3
1.1. Raziskovalno vprašanje in hipotezi	4
1.2. Uporabljena metodologija dela.....	5
2. TEORETIČNO OZADJE.....	6
2.1. Ekstrakcija s superkritičnim CO ₂	6
2.1.1. Ekstrakcija tujona.....	7
2.2. ATR - FTIR spektroskopija.....	8
2.3. Tankoplastna kromatografija ekstrakta	9
3. PRAKTIČNI DEL.....	10
3.1. Priprava rastlinskega materiala.....	10
3.1.1. Liofilizacija	10
3.2. Ekstrakcija s superkritičnim CO ₂	11
3.3. ATR - FTIR analiza ekstrakta	12
3.4. Tankoplastna kromatografija ekstrakta	13
4. REZULTATI.....	14
4.1. Masa produkta in izkoristek ekstrakcije	14
4.2. IR spektra ekstrakta <i>Thuje occidentalis</i> in (+/-)-tujona.....	15
4.3. Tankoplastna kromatografija.....	16
5. ANALIZA REZULTATOV.....	17
5.1. Identifikacija absorpcijskih vrednosti pridobljenih z ATR IR spektroskopijo.....	17
5.2. Izračun mase tujona v ekstraktu	17
5.3. Rezultati tankoplastne kromatografije (TLC).....	20
6. RAZPRAVA	21
7. DRUŽBENA ODGOVORNOST.....	22
8. ZAKLJUČEK.....	23
9. BIBLIOGRAFIJA	24

Kazalo slik

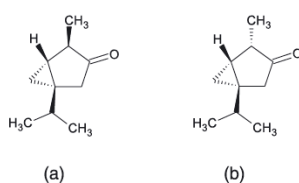
Slika 1: (a) (-)- α -tujon in (b) (+)- β -tujon (El Montassir s sodel., 2013).....	3
Slika 2: Shema metod uporabljenih v raziskovalni nalogi	5
Slika 3: fazna ravnotežja in supekritični fluidi (Petrovič, 2013).....	6
Slika 4: Proces ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami (Danielski, 2007).....	7
Slika 5: Grafični prikaz delovanja ATR - FTIR spektroskopije (Pike Technologies, 2014)	8
Slika 6: Vejica <i>Thuja occidentalis</i> , kleka	10
Slika 7: Liofilizator	11
Slika 8: Ekstraktor	11
Slika 9: Separator 1 z ekstraktom.....	12
Slika 10: ATR FTIR Perkin Elmer Spectrum Two	13
Slika 11: Produkt je temno rumena mehka pasta z značilnim vonjem kleka	14
Slika 12: IR spekter <i>Thuja occidentalis</i> ekstrakta.....	15
Slika 13: IR spekter standarda tujona.....	15
Slika 14: Rezultati tankoplastne kromatografije	16
Slika 15: Umeritvena premica za absorpcijo pri valovni dolžini 1739 cm^{-1}	18

Kazalo tabel

Tabela 1: Masa rastlinskega materiala	14
Tabela 2: Masa ekstrakta.....	14
Tabela 3: Rf vrednosti za ekstrakt.....	16
Tabela 4: Analiza IR spektrov.....	17
Tabela 5: Standardne raztopine tujona za pripravo umeritvene premice	18
Tabela 6: Površina pod vrhom 1739 cm^{-1}	18

1. UVOD

Esencialna olja mnogih rastlin so odgovorna za njihov okus in farmakološke lastnosti. Večina esencialnih olj je sestavljena iz terpenov, raznolike skupine naravnih produktov, ki izvirajo iz 5-členskih ogljikovih izoprenovih monomerov (French, 2012). Eden od njih je tujon, keton in monoterpen (slika 1), ki ga lahko najdemo v esencialnih oljih mnogih zelišč (npr. žajbelj, zelena meta, pelin) in v drevesnih vrstah kot so brinjevci in tuje (kleki). Koncentracija tujona v omenjenih rastlinah običajno ni poznana (Committee on Herbal Medicinal Products, 2011).



Slika 1: (a) (-)- α -tujon in (b) (+)- β -tujon (El Montassir s sodel., 2013)

Tujon v naravi najdemo kot mešanico obeh izomer α -tujona in β -tujona. Za tujon vemo, da lahko povzroči vznburjenje centralnega živčnega sistema, saj je receptorski antagonist Gama-amino maslene kisline, t.i. GABA receptor (Olsen, 2000).¹ Od začetka 19. stoletja dalje tujon velja za močan nevrotoksin (toksičen za možgane, ledvice in jetrne celice). Zaužit v prevelikem odmerku lahko povzroča tudi mišične krče. Vendar v zadnjih 15 letih vedno več znanstvenikov poroča tudi koristnih lastnosti tujona (Bielenberg, 2007; Committee on Herbal Medicinal Products, 2011). Razlog so rastline, ki se v ljudski medicini že dolgo učinkovito uporabljajo in vsebujejo tujon. Primer so rastline iz družine *Arborvitae*, v katero spada tudi klek (lat. *Thuja occidentalis*) ali žajbelj (lat. *Salvia officinalis*) iz družine *ustnatic*, katerih zeliščni pripravki so prisotni tudi na prostem trgu. Ponudniki jih priporočajo za krepitev imunskega sistema, za zdravljenje kožnih bolezni, nekateri pa jim pripisujejo celo antikarcinogene (Biswas et al., 2011) in antimikrobne učinke (Naser s sodel., 2005). Klinične študije z ekstrakti *Thuja occidentalis* so pokazale terapevtsko učinkovitost v zdravljenju okužb dihal (Naser, Bodinet, Tegtmeier, & Lindequist, 2005).

¹ GABA je glavni inhibitorski neurotransmiter v centralnem živčnem sistemu sesalcev. Igra glavno vlogo v reduciranju nevrološke vznburjenosti živčnega sistema. Pri ljudeh je GABA direktno odgovoren za regulacijo mišičnega tonusa (Watanabe, Maemura, Kanbara, Tamayama, & Hayasaki, 2002).

Thuja occidentalis, ameriški klek, je v Sloveniji zelo pogosta rastlina za t.i. žive meje. Raziskave o vsebnosti tujona v tej rastlini (v Sloveniji) še niso bile izvedene. Predpostavili smo, da je bioaktivnost rastlinskega ekstrakta odvisna od koncentracije tujona v rastlini. Da bi preverili hipotezo, je potrebno tujon najprej ekstrahirati iz rastline, zato sem se odločila, da najprej raziščem možne (učinkovite) tehnike ekstrakcije in na tej osnovi določim koncentracijo tujona v listih te rastline. Seveda je pomembno tudi vprašanje, ali je tujon res tista aktivna molekula, ki je odgovorna za različne fiziološke učinke, ki jih za navadni klek zasledimo v literaturi ali ne?

Po pregledu literature sem se odločila za ekstrakcijo s superkritičnimi fluidi. Metoda se v literaturi opisuje kot najbolj primerna za ekstrakcijo monoterpenov iz liofiliziranega rastlinskega materiala (Al-Asheh, 2012). Na tej osnovi sem sklepala, da bi lahko bila primerna tudi za ekstrakcijo tujona. Odločila sem se za ekstrakcijo s superkritičnim CO₂ in identifikacijo ter določitev koncentracije tujona v pridobljenem ekstraktu z ATR - IR spektroskopijo in tankoplastno kromatografijo (TLC), ki sta na voljo v šolskem laboratoriju.

1.1. Raziskovalno vprašanje in hipotezi

Postavljeno raziskovalno vprašanje je bilo: »Je ekstrakcija s superkritičnim CO₂ primerna metoda za učinkovito ekstrakcijo tujona iz *Thuja occidentalis*?«

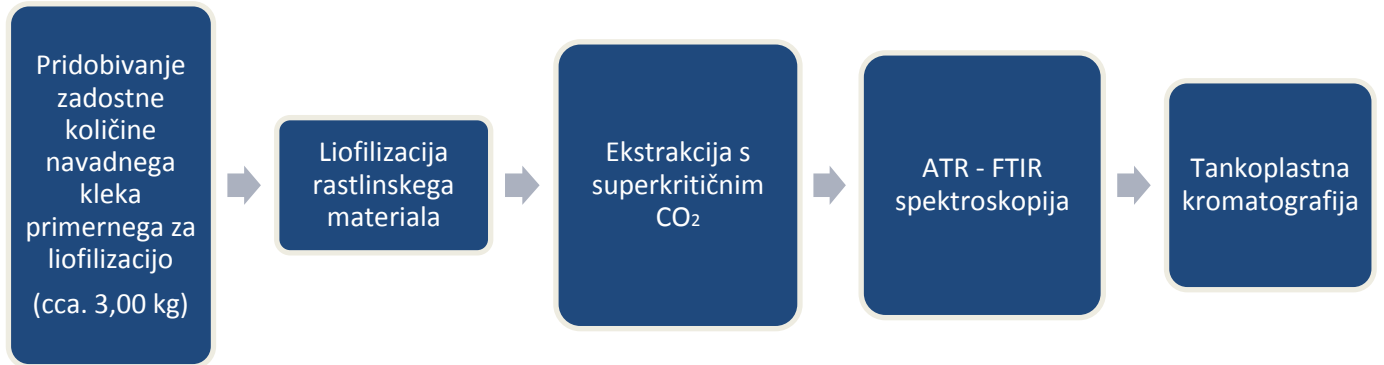
Postavljeni sta bili naslednji hipotezi:

Hipoteza 1: Ekstrakcija s superkritičnim CO₂ je učinkovita metoda za ekstrakcijo tujona. Pridobili bomo produkt, ki ne bo čist, saj je ekstrakcija odvisna od eksperimentalnih pogojev, kot so temperatura, tlak, količina in kvaliteta rastlinskega materiala. Ker gre za prvo takšno raziskavo, teh parametrov ne moremo optimizirati v naprej. Pričakovali smo, da bo produkt mešanica različnih terpenov.

Hipoteza 2: Skupna količina tujona pridobljenega z ekstrakcijo s superkritičnim CO₂ bo primerljiva z vrednostmi najdenimi v literaturi, kjer je bila, kot metoda ekstrakcije, uporabljena parna destilacija. V esencialnih oljih različnih rastlin se vrednosti tujona gibljejo do 43% skupne mase ekstraktov (Committee on Herbal Medicinal Products, 2011; Montassir s sodel., 2012).

1.2. Uporabljena metodologija dela

Potek eksperimentalnega dela je predstavljen v naslednji shemi.

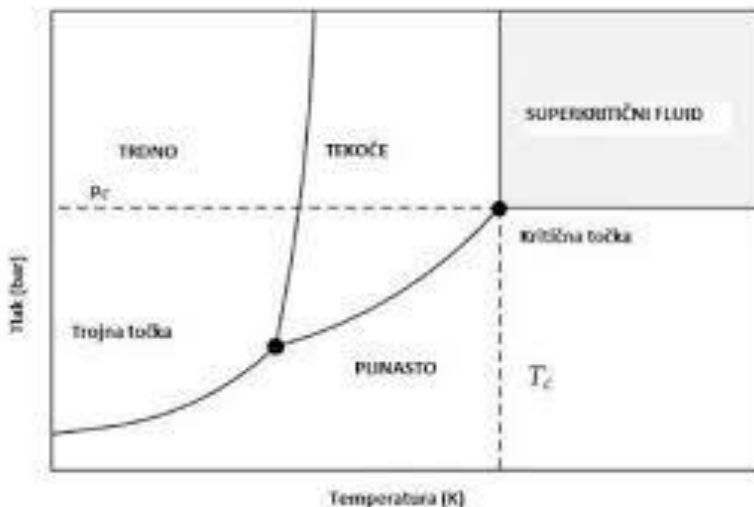


Slika 2: Shema metod uporabljenih v raziskovalni nalogi

2. TEORETIČNO OZADJE

2.1. Ekstrakcija s superkritičnim CO₂

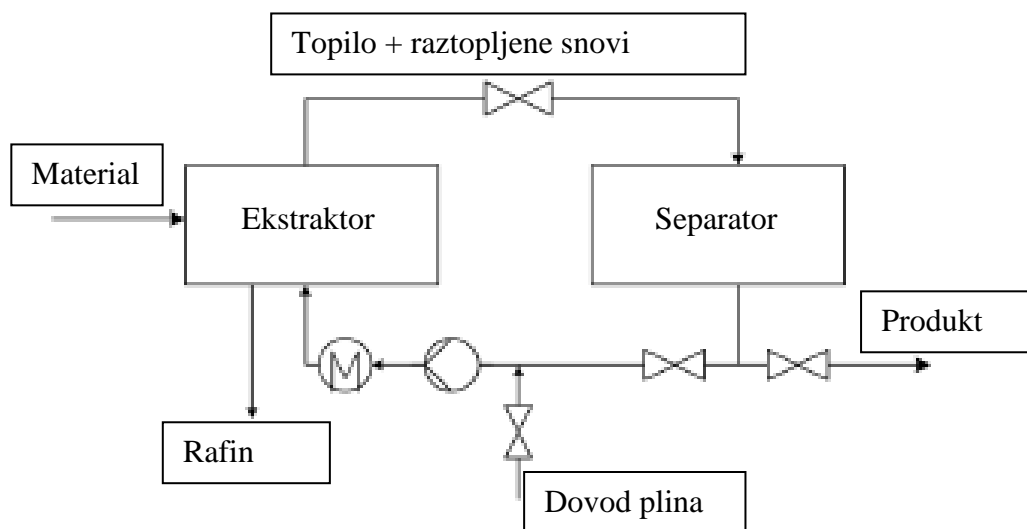
Snov doseže t.i. superkritično stanje, ko tlak in temperatura presežeta kritični vrednosti. Na tej točki ne moremo več razlikovati med plinastim in tekočim stanjem (Danielski, 2007).



Slika 3: fazna ravnotežja in supekritični fluidi (Petrovič, 2013)

Ekstrakcija s superkritičnim CO₂ je uveljavljen industrijski proces za ekstrakcijo naravnih snovi, saj z njo lahko dobimo izjemno čiste ekstrakte, brez ostankov topil. Tipični produkti vključujejo ekstrakte hmelja, kave in čaja (brez kofeina), zeliščne in začimbne ekstrakte, ekstrakte zdravilnih zelišč ter različnih olj. Ogljikov dioksid, CO₂, je relativno slabo, a zelo selektivno topilo za nepolarne, lipofilne snovi. Ker je CO₂ hidrofobno topilo, ga ne moremo uporabiti za ekstrakcijo vlažne biomase. Zato morajo biti surovi materiali pred ekstrakcijo posušeni in zmleti. Čeprav sta sušenje in mletje preprosti tehniki dela, sta ključni za izkoristek pridobljenega ekstrakta (Catchpole s sodel., 2012).

Ekstrakcija trdnih delcev s superkritičnimi tekočinami je ena najpogostejših aplikacij superkritičnih tekočin. Ekstrakcija se izvaja pod visokim tlakom in s konstantnim stikom med vzorcem in topilom. Trden material je naložen v ekstraktor, skozi katerega teče superkritična tekočina, pri čemer prihaja do raztapljanja zelenih snovi (Danielski, 2007).



Slika 4: Proces ekstrakcije s superkritičnimi tekočinami (Danielski, 2007)

Kot je razvidno s slike 4, je material najprej vstavljen v ekstraktor. Nato v komoro dovajamo topilo (v našem primeru CO₂), kjer je vzpostavljeno superkritično stanje s pomočjo primernih pogojev (tlak in temperatura). Material je potem prenesen v naslednjo komoro, kjer pogoji dovoljujejo ločevanje komponent v zmesi. Sledi odstranitev končnega produkta.

2.1.1. Ekstrakcija tujona

Oba faktorja, polarnost in ustrezno topilo, igrata pomembno vlogo pri ekstrakciji tujona iz kleka. Tujon se najbolje raztaplja v propanonu, ki mu sledijo etil acetat, heksan, etanol (Evropska komisija za zdravje in varstvo potrošnikov, 2003). Zaradi karbonilne skupine je molekula polarna, vendar tudi zelo hlapna. Če bi omenjena topila dodali k rastlinskemu vzorcu, bi lahko pričakovali večji izkoristek ekstrakcije, vendar bi topila postala sestavni del produkta. Dodana topila bi lahko vplivava na bioaktivnost ekstrakta ter onemogočila razlikovanje med učinki ekstrakta in topil.² Ker želimo ekstrakt uporabiti za nadaljnje farmakološki raziskave, smo se odločili, da bomo kot topilo uporabili samo ogljikov dioksid.

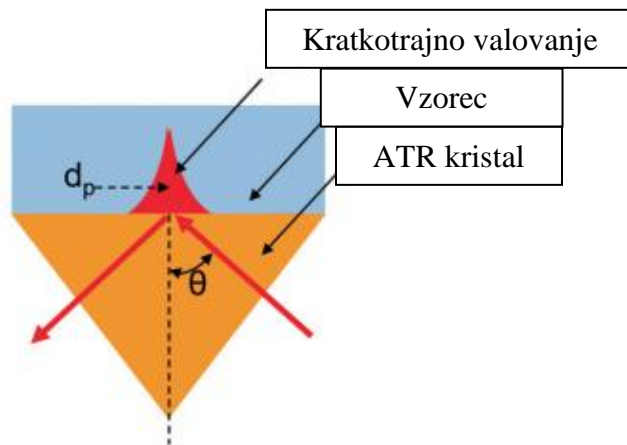
² Zaradi tega je ekstrakcija s superkritičnim CO₂ ena bolj primernih metod za ekstrakcijo snovi uporabljenih v farmakološke namene.

2.2. ATR - FTIR spektroskopija

Ko molekule absorbirajo energijo v infrardeči področju elektromagnetnega valovanja, vibrirajo (vezi se raztezajo in upogibajo). Ko infrardeče sevanje potuje skozi vzorec, spekter pokaže značilne absorpcijske vrednosti, ki potrjujejo, da je specifična vez prisotna v molekuli. Poleg značilnih absorpcijskih vrednosti za posamezne vezi, infrardeči spekter vsebuje tudi t.i. območje »prstnega odtisa« molekule. To je karakteristični vzorec, med 400 in 1500 cm^{-1} , značilen za posamezno molekulo (Neuss, 2014).

Infrardeča spektroskopija se primarno uporablja kot kvalitativna tehnika za določanje in preverjanje čistih snovi. Infrardeč spekter, ki ga pridobimo iz rastlinskih vzorcev, je lahko izredno kompleksen, saj vsaka prisotna funkcionalna skupina prispeva h končnemu rezultatu. Končni rezultat je spekter, katerega vrhovi so izredno težko določljivi zaradi prekrivajočih se absorpcijskih vrednosti. Tu je tehnika ATR (ang. *Attenuated Total Reflectance* (ATR) IR) lahko zelo koristna (Bruker Co., n.d. 2015).

ATR dovoljuje kvalitativno in kvantitativno analizo vzorcev z zelo malo ali nič predhodne priprave vzorcev, kar zelo pospeši proces analize. Pri ATR spektroskopiji usmerimo IR žarek direktno v kristal (v našem primeru diamant) z visokim indeksom refrakcije (lom svetlobe). IR žarek se potem odbije od notranje površine kristala in ustvari kratkotrajno valovanje, ki se pravokotno projicira v vzorec, ki je v direktnem stiku z ATR kristalom. Del valovanja se zaradi vzorca absorbira in del odbije nazaj na detektor (slika 5) (Pike Technologies, 2014).



Slika 5: Grafični prikaz delovanja ATR - FTIR spektroskopije (Pike Technologies, 2014)

Za vzorce v tekočem ali trdnem stanju kontakt s ATR kristalom ne predstavlja nobenega problema (Pike Technologies, 2011).

Za ugotavljanje, če je tujon prisoten v vzorcu, moramo določiti karakteristične absorpcijske vrednosti za to molekulo. Iz strukturne formule tujona je razvidno, da v molekuli najdemo naslednje funkcionalne skupine:

1. $C-H$ vez (v alkanih vezanih na obroč in v obroču) in
2. $C=O$ vez kot funkcionalno skupino, vezno na obroču.

Absorpcijska vrednost za keton (karbonilne skupino) se pojavi med 1655 in 1760 cm^{-1} . Drug, relativno močan signal, lahko pričakujemo tudi med 2850 in 2965 cm^{-1} , kar kaže na $C-H$ vez.

Kvantifikacija je mogoča z uporabo Spectrum Quant programa. Tujon je slabo raziskana molekula in v literaturi je bil najden le en IR spekter (French, 2012).

2.3. Tankoplastna kromatografija ekstrakta

Tankoplastna kromatografija omogoča ločitev komponent v zmesi in na osnovi primerjave retencijskih faktorjev tudi identifikacijo čistih snovi.

Sredstvo za identifikacijo komponent v razvitem kromatogramu je vsebovalo 2,4-dinitrofenil hidrazin (2,4-DNPH), ki se v prisotnosti karbonilne skupine (molekula tujona) značilno obarva.

3. PRAKTIČNI DEL

Vzorci so bili pripravljani in analizirani v šolskem laboratoriju, medtem, ko je liofilizacija in ekstrakcija s superkritičnim CO₂ potekla na Univerzi.

3.1. Priprava rastlinskega materiala

Rastlinski material je bil iz zasebnega vrta pobran novembra 2015. Pobrani so bili le zeleni deli rastline in ročno ločeni od preostalih olesenelih delov. Material je 24 ur shranjen v temnem in suhem prostoru ter nato liofoliziran.



Slika 6: Vejica *Thuja occidentalis*, kleka

Da bi bila liofolizacija učinkovitejša, je bil material predhodno zdrobljen v Bosh™ kavnem mlinčku. Velikost delcev posušenega rastlinskega materiala vstavljena v liofilizator (Zirbus), je bila med 1 do 10 mm. Zmlet material je pomenil večjo ekstrakcijsko površino in s tem večji izkoristek ekstrakcije. Premajhni delci materiala ne bi bili dobri, saj bi se zaradi tega dostop molekul CO₂ zmanjšal in s tem negativno vplival na izkoristek ekstrakcije.

3.1.1. Liofilizacija

Liofilizacija je energetsko in masno najbolj intenzivna metoda sušenja, ki pa hkrati ne uniči snovi, ki so občutljive na svetlobo, toploto ali prisotnost kisika. Zato je liofilizacija je izjemno dobra metoda za sušenje materiala z visoko vsebnost polinenasičenih lipidov in lipofilnih antioksidantov. Z njo iz materiala odstranimo vodo, ne da bi ob tem odstranili tudi druge snovi. Material mora po liofilizaciji biti čim prej uporabljen (ali ustrezno shranjen), saj porozna narava

posušenega materiala omogoča dostop kisiku. Liofiliziran material ima običajno nizko gostoto in mora biti pred ekstrakcijo zmlet (Catchpole et al., 2012).

Liofilizator vodo v materialu najprej zamrzne in nato s pomočjo vakuuma odstrani. Voda iz materiala sublimira, vse ostale molekule pa v vzorcu ostanejo. Rastlinski material smo v liofilizatorju sušili 5 dni pri -20°C .



Slika 7: Liofilizator

3.2. Ekstrakcija s superkričnim CO_2



Slika 8: Ekstraktor

Naprava uporabljena za ekstrakcijo s superkričnim CO_2 je imela eno ekstrakcijsko komoro ter dva separatorja. Tok CO_2 je bil 15 L/h. Ekstrakcija je potekala 60 minut. Pogoji znotraj ekstraktorja so bili optimizirani glede na vrednosti v literaturi (Al-Asheh, 2012). Optimalni tlak za maksimiranje količine ekstrahiranega tujona je bil določen kot 140 barov. Temperatura v ekstraktorju ter prvem separatorju je bila 40°C (standardno uporabljeno temperatura za ekstrakcijo s superkričnim CO_2 v tem laboratoriju). V separatorjih je bil tlak počasi znižan iz

140 barov na 50 barov in potem na 20 barov. Temperatura v drugem separatorju je bila na koncu ločitve -12°C . Ta relativno nizka temperatura je bila izbrana zaradi preprečitve izhlapevanja tujona v ekstraktu. Produkt je bil potem postrgan iz separatorja, stehtan in shranjen v posodici iz temnega stekla, na hladnem in suhem prostoru. S tem smo preprečili razgradnjo ekstrakta zaradi vpliva svetlobe ali temperature ter njegovo izhlapevanje.



Slika 9: Separator 1 z ekstraktom

3.3. ATR - FTIR analiza ekstrakta

Da bi lahko uporabili ekstrakt *Thuje occidentalis* za kvalitativno in kvantitativno analizo, je bilo najprej potrebno posneti ATR IR spekter ekstrakta in standarda (+/-)-tujona (Sigma – Aldrich; $\geq 96\%$). Predpostavljeno je bilo, da je tujon prisoten v ekstraktu. Analiza je bila izvedena na prenosnem diamantnem ATR - FTIR spektrometru (Perkin Elmer spectrum Two). Na površino diamantnega (ATR) kristala smo položili od 2 do 10 mg ekstrakta.

Spekter je bil posnet pod naslednjimi pogoji:

- valovna dolžina v območju od 400 in 4000 cm^{-1} .
- Resolucija: 4 cm^{-1} .
- Detektor: DLaTGS
- Vir IR svetlobe: MIR (običajne nastavitve)
- ATR: Pike Diamond MIRacle



Slika 10: ATR FTIR Perkin Elmer Spectrum Two

3.4. Tankoplastna kromatografija ekstrakta

Mobilna faza³ je bila:

Petrol eter : aceton: kloroform : etanol = 30:10:10:50

Plošča za tankoplastno kromatografijo je bila aluminijasta folija prevlečena s plastjo SiO₂ (Sigma- Aldrich). Vizualizacijski reagent: 0,4g 2,4-DNPH v 100 mL 2M HCl (Fluka), z dodanim 1 ml etanola (Fluka; 97%)

1 cm od roba TLC plošče je bila s svinčnikom zarisana začetna črta. S črko »S« bila označena točka za standard ter s črko »E« ekstrakt.

0,020 g ekstrakta je bilo raztopljenega v 2 mL diklorometana (Sigma-Aldrich, p.a.). Čista raztopina tujona je bila uporabljena kot standard.

Mikrokapilarna cevka smo potopili v raztopino obeh snovi in ju prenesli na označeni točki na TLC plošči. Ta korak je bil ponovljen štirikrat. Tako pripravljeno TLC ploščo smo postavili v stekleni valj (predhodno nasičen z mobilno fazo), in pokrili s steklenim pokrovom. Po 50 minutah je bila TLC plošča odstranjena in fronta topila označena s svinčnikom. TLC ploščo smo nato na zraku posušili in jo nato popršili s posebej zato pripravljenim vizualizacijskim sprejem. Sledilo je 3 minutno sušenje plošče pri 105°C.

³ Vse kemikalije so bile Flukov produkt in primerne za kromatografijo.

4. REZULTATI

4.1. Masa produkta in izkoristek ekstrakcije

Masa izhodiščnega rastlinskega materiala se je med sušenjem in liofilizacijo zelo zmanjšala. Iz treh kilogramov na manj kot en kilogram (Tabela 1), ki smo ga razdelili na tri dele. S prvim in drugim delom liofiliziranega materiala smo očistili aparaturo⁴, s preostankom 600 g (Tabela 1) pa smo izvedli ekstrakcijo, ki je bila vodena pri dveh različnih temperaturnih pogojih (40°C in 12°C). Tabela 2 prikazuje maso produkta iz obeh ekstraktorjev.

Tabela 1: Masa rastlinskega materiala

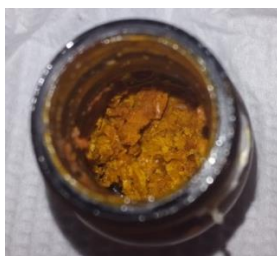
Material	Masa (g ± 5 g)
Masa surovega rastlinskega materiala	3000
Masa liofiliziranega materiala	600

Tabela 2: Masa ekstrakta

Komora	Masa produkta (g ± 0,001 g)
Separator 1 (T = 40°C)	5,964
Separator 2 (T = -12°C)	0,000

Izračun izkoristka za prvi separator:

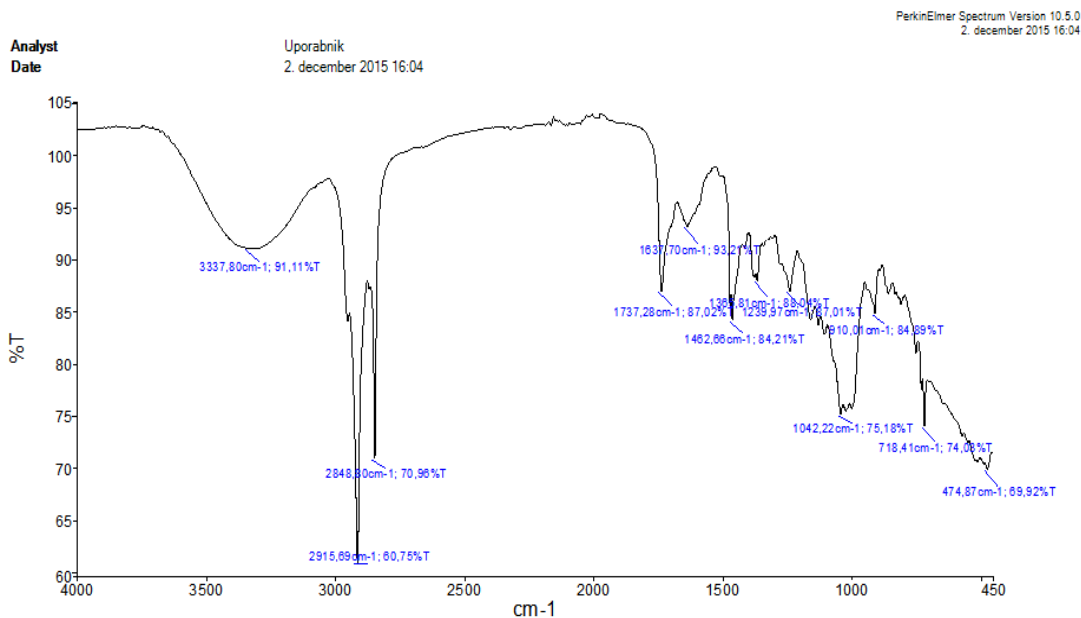
$$\% \text{ izkoristek} = \frac{5,946 \text{ g}}{6,00 \times 10^3 \text{ g}} \times 100 = 0,991\% \approx 1\%$$



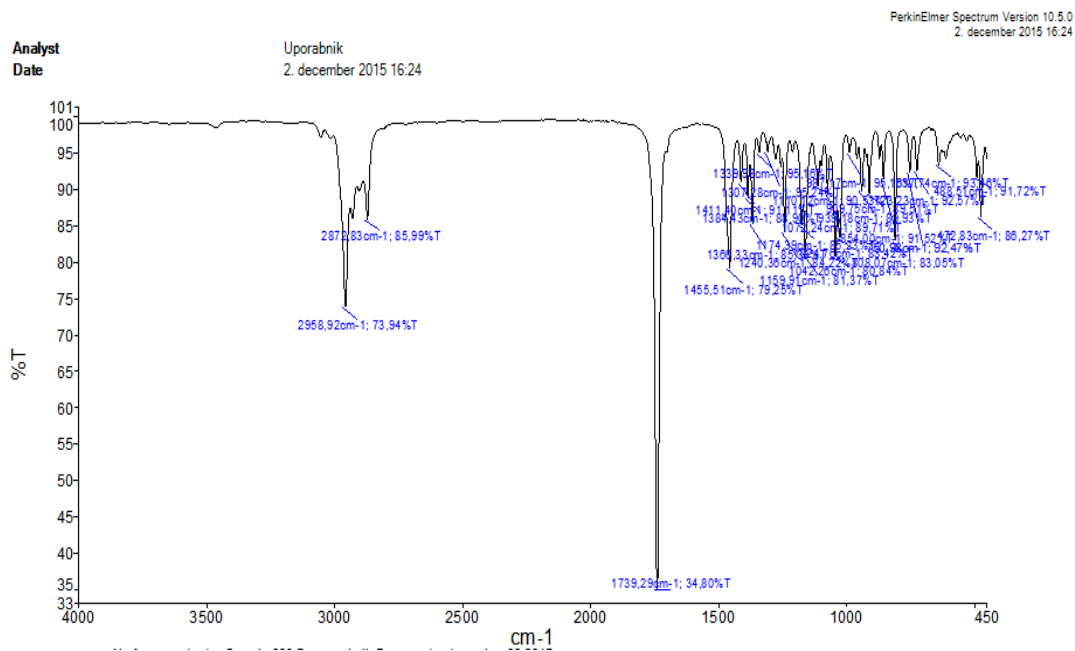
Slika 11: Produkt je temno rumena mehka pasta z značilnim vonjem kleka

⁴ To je bilo storjeno, da so bile odstranjene snovi, ki so ostale od predhodnih ekstrakcij.

4.2. IR spektra ekstrakta *Thuja occidentalis* in (+/-)-tujona

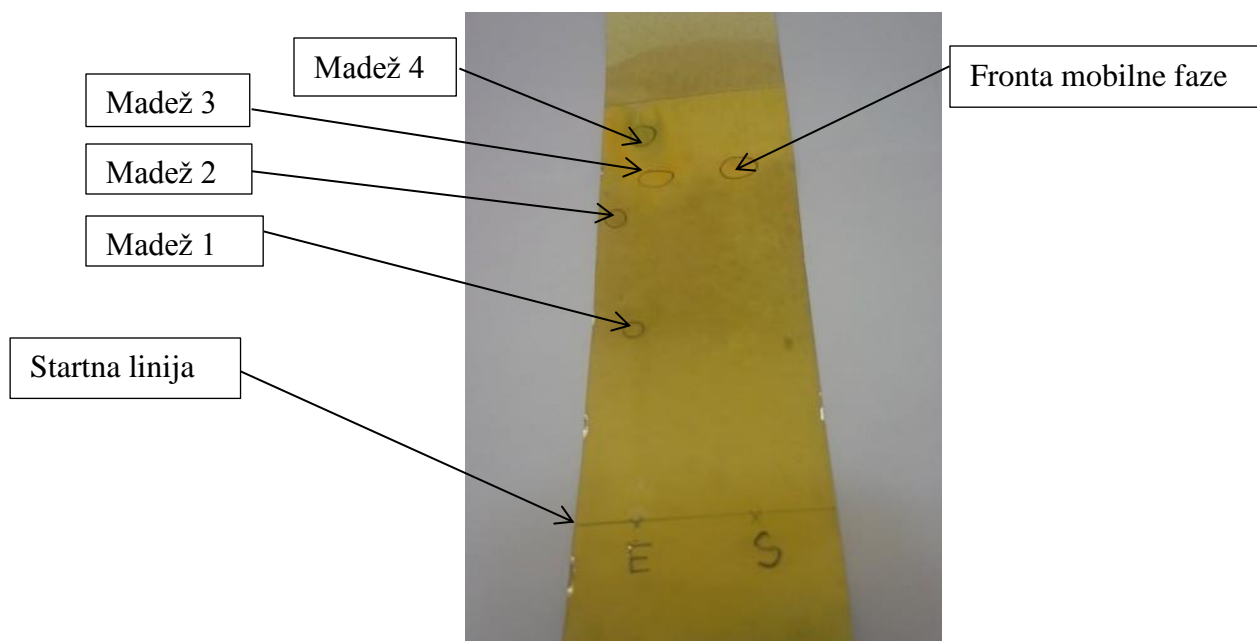


Slika 12: IR spekter *Thuja occidentalis* ekstrakta



Slika 13: IR spekter standarda tujona

4.3. Tankoplastna kromatografija



Slika 14: Rezultati tankoplastne kromatografije

Tabela 3: Rf vrednosti za ekstrakt

točka	dolžina (mm \pm 0,1 mm)	Rf
1	32,0	0,337
2	69,0	0,726
3	74,0	0,777
4	86,0	0,905
Mobilna faza	95,0	-

Rf vrednost za standard tujona je bila 0,777.

5. ANALIZA REZULTATOV

5.1. Identifikacija absorpcijskih vrednosti pridobljenih z ATR IR spektroskopijo

Identificirane so bile le vrednosti izven območja »prstnih odtisov« molekule (več kot 1500 cm^{-1}).

Tabela 4: Analiza IR spektrov

Spekter	Absorpcijska frekvenca (cm^{-1})	Pripadajoče funkcionalne skupine
<i>Thuja occidentalis</i> ekstrakt	1638	konjugirana C=O vez
	1737	C=O vez (razteg)
	2848	C-H vez pri C v C=O vezi (razteg)
	2916	C-H vez v sp^3 hibridiziranih C atomih (razteg)
	3338	COOH
Tujon standard	1739	C=O vez (razteg)
	2873	C-H vez pri C v C=O vezi (razteg)
	2959	C-H vez v sp^3 hibridiziranih C atomih (razteg)

5.2. Izračun mase tujona v ekstraktu

Za kvantitativno določanje količine tujona v vzorcu je bil uporabljen računalniški program Quant Spectrum. Umeritvena premica je bila narejena z linearno regresijo karakterističnega valovnega števila za tujon, 1739 cm^{-1} . Za algoritem je bil izbran Beer-Lambertov zakon. Da bi lahko kvantificirali zgolj tujon in preprečili interferenco podobnih snovi, smo uporabili metodo standardnega dodatka.⁵

⁵ 0,100 g ekstrakta je bilo dodano 0,100 g standarda ter posnet IR spekter. Nato je bil spekter analiziran, da bi ugotovili, če je dodatek standarda vplival na intenzivnost karakteristične absorpcijske vrednosti (pri valovni dolžini 1739 cm^{-1}). Ponovljivost je bila v območju med 98- 102%, kar pomeni, da je metoda zanesljiva.

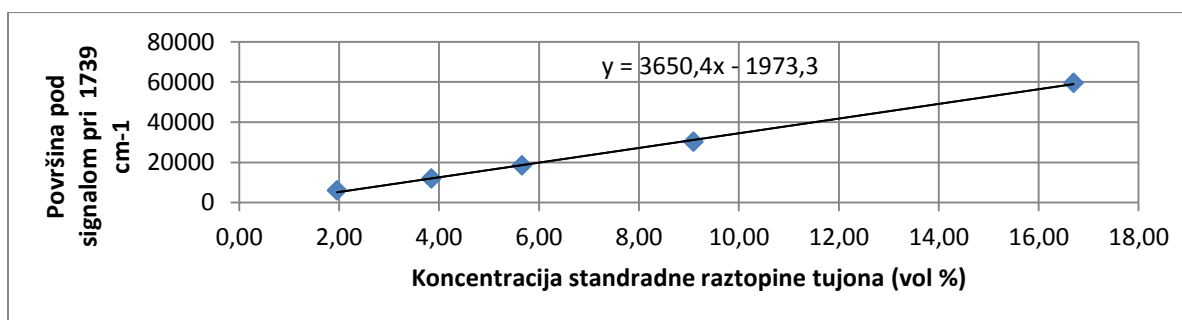
Za določitev koncentracije tujona, smo najprej pripravili standardne raztopine čistega (+/-)-tujona s CH_2Cl_2

Tabela 5: Standardne raztopine tujona za pripravo umeritvene premice

Prostornina standardne raztopine tujona (± 0.001), mL	Prostornina CH_2Cl_2 , (± 0.01), mL	Koncentracija tujona v standardni raztopini (Vol %)
0,100	5,00	1,96
0,200	5,00	3,85
0,300	5,00	5,66
0,500	5,00	9,09
1,000	5,00	16,7

Tabela 6: Površina pod vrhom 1739 cm^{-1}

c (+/-)-tujon (Vol %)	Površina pod signalom pri 1739 cm^{-1}
1,96	6002
3,85	11965
5,66	18402
9,09	30231
16,7	59549



Slika 15: Umeritvena premica za absorpcijo pri valovni dolžini 1739 cm^{-1}

Sledil je izračun koncentracije tujona v ekstraktu, glede na površino signala, ki ga je dal tujon pri 1739 cm^{-1} .

Površina pod absorpcijsko vrednostjo 1739 cm^{-1} v IR spektrogramu je bila določena kot 47201 (ATR enote). Iz tega je bil izračunana koncentracija Vol% tujona v produktu:

$$\text{Vol\% (tujon)} = \frac{47201 + 1973,3}{3650,4} = 13,5\%$$

Ekstrakt je pod 28°C v trdnem stanju. Da bi lahko izračunali izkoristek glede na začetno maso rastlinskega materiala, smo potrebovali gostoto ekstrakta. Gostota je bila določena z uporabo piknometra.

$$\rho (\text{ekstrakt}) = \frac{m (\text{piknometer in ekstrakt}) - m (\text{piknometer})}{V (\text{piknometer})} = 0,925 \frac{\text{g}}{\text{mL}} (\pm 0,012\%)$$

Bielenberg (2007) navaja, da je gostota β -tujona $0,92\text{ g/mL}$, kar še nepomeni, de je naš ekstrakt čisti tujon, vendar je potrditiv, da je uspela ekstrakcija snovi, s podobno gostoto kot jo ima tujon.

Sledil je izračun mase tujona v ekstraktu:

$$V (\text{ekstakt}) = \frac{5,964\text{ g}}{0,925\text{ g/mL}} = 6,448\text{ mL}$$

$$m (\text{tujon}) = 0,135 \times 6,448\text{ mL} \times 0,925 \frac{\text{g}}{\text{mL}} = 0,805\text{ g} (\pm 0,041\%)$$

Masni delež tujona ostane približno enak volumskemu delež ($13,5\%$). To pomeni, da $0,805\text{ g}$ (od začetnih 600 g liofiliziranega materiala) lahko predstavlja tujon, kar prevedeno v izkoristek pomeni le $0,134\%$.

$$\text{donos \%} = \frac{0,805\text{g}}{600\text{ g}} \times 100 = 0,134\% (\pm 0,041\%)$$

Relativna napaka vseh izračunov je ocenjena na manj kot 1% in zato nima signifikantnega vpliva na rezultate.

5.3. Rezultati tankoplastne kromatografije (TLC)

Kromatogram, ki je bil razvit s postopkom in pod pogoji opisanimi v poglavju 3.4. je jasno pokazal, da je v ekstraktu in standardu prisotna ista snov tujon ($R_f = 0,777$). Standard tujona je bil mešanica obeh izomer zato je jasno, da je ena (ali morda obe) tudi komponenta ekstrakta pridobljenega z ekstrakcijo s superkričnim CO_2 . V ekstraktu so prisotne tudi druge snovi (več madežev na kromatogramu).

6. RAZPRAVA

Prvi del eksperimenta je predstavljal ekstrakcija rastlinskega materiala (klek) s superkritičnim CO₂ pri dveh različnih temperaturnih pogojih. Samo v primeru 40°C smo po končani ekstrakciji dobili produkt, pri -12°C je bila ekstrakcija neuspešna. Z uporabo ATR FTIR spektroskopije smo ugotovili, da je delež tujona v ekstraktu zelo majhen ($\approx 1\%$ mase osnovnega materiala je predstavljal tujon). Čistost ekstrakta in prisotnost tujona smo preverili še s tankoplastno kromatografijo. Rezultat je pokazal, da je ekstrakt zmes vsaj štirih različnih snovi, vendar je ena izmed njih tudi tujon.

ATR- FTIR spektroskopija je bila uporabljena za kvalitativno in kvantitativno analizo skupnega tujona v ekstraktu. Ugotovljeno je bilo, da je o 13,5 vol% ekstrakta predstavljal tujon. Ali je to vse, torej maksimalna vsebnost tujona v rastlini *Thuja occidentalis* ali ne, na osnovi teh rezultatov ne moremo potrditi. Montassir s sodel.(2012) navaja, da je delež tujon aprecej višji, okoli 43%. Ta delež je bil določen z metodo destilacije z vodno paro, zato rezultati ne morejo biti povsem primerljivi. Vsekakor pa lahko zaključimo, da pogoji ekstrakcije s superkritičnim CO₂ verjetno niso bili optimalni. Optimizacija tlaka in temperature ekstrakcije je lahko cilj nadaljnjih raziskav. Ta zaključek potrjuje drugo postavljeno hipotezo.

Dejstvo, da pogoji ekstrakcije niso bili optimalni, potrjujejo tudi rezultati IR spektrometrije in tankoplastne kromatografije. Spektra ekstrakta in standarda tujona se ne ujemata, saj so prisotne tudi druge spojine, ki so odgovorne za ostale absorpcijske vrednosti na spektru. Ti rezultati potrjujejo prvo hipotezo. Predvidevamo, da komponente v ekstraktu pripadajo skupini molekul, ki so podobne tistim najdenim v enakih pogojih (Al-Asheh et al., 2012) pri žajblju. To so pinen, kampen, limonen in eukaliptol. Za identifikacijo teh snovi bi bila potrebna nadaljnja analiza s HPLC ali plinska kromatografija (gre za lahko hlapne snovi).

Ena od slabosti izbrane metode za ekstrakcijo tujona je velika količina rastlinskega materiala in čas, ki je potreben za ekstrakcijo ter pripravo materiala za ekstrakcijo s superkritičnimi fluidi. Vendar je prednost ta (v kolikor bi uspeli optimizirati pogoje le za ekstrakcijo tujona), da lahko pridobimo čiste snovi brez ekstrakcijskih topil, kar je za nadaljnje farmakološke raziskave zelo pomembno. Zaradi omejitev, ki sem jih navedla, je bila ekstrakcija izvedena le enkrat, kar

pomeni, da pogojev (še) nismo mogli optimizirani. Nadaljnja raziskava bi se morala osredotočiti predvsem na določitev optimalnega tlaka in temperature ekstrakcije.

ATR-IR spektrometrija se je izkazala za učinkovito in uporabno metodo, saj je zelo hitra ter dostopna. Je dobra tehnika za začetno določanje prisotnosti snovi v produktu in s kombinacijo različnih matematičnih pristopov omogoča tudi kvantifikacijo.

7. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Z raziskavo sem želela pokazati, kako lahko s kombinacijo različnih laboratorijskih tehnik raziskujemo naravne materiale in njihovo potencialno učinkovitost v farmakološke namene. Šele pridobitev čistih snovi nam omogoči nedvoumno preučevanje njihove učinkovitosti ter posledično uporabo v terapevtske namene. V preteklosti sem že raziskovala bioaktivnost alkoholnega ekstrakta tuje, kjer sem predvidevala, da je aktivna učinkovina tudi tujon. Rezultati so pokazali, da je ekstrakcija čistega tujona ključna za kakršnokoli sklepanje, zato menim, da sem z nalogo opravljeno letos, prispevala en kamenček v mozaiku našega razumevanja narave in trajnostne rabe naravnih virov. Raziskave takšne narave so pomembne predvsem, ker so prva faza v odkrivanju novih potencialnih zdravilnih učinkovin. Eden največjih problemov današnje družbe je rezistenca na antibiotike zato je ključno, da povezujemo področja kot sta kemijska tehnologija in biologija ter s tem pospešimo razvoj rešitev.

8. ZAKLJUČEK

Na osnovi rezultatov pridobljenih z ekstrakcijo s superkričnimi CO₂ liofiliziranega materiala *Thuja occidentalis* in kasnejše analize z ATR - IR spektroskopijo ter tankoplastno kromatografijo, lahko odgovorimo na raziskovalno vprašanje (»Je ekstrakcija s superkričnim CO₂ primerna ter uporabna metoda za pridobivanje tujona iz *Thuja occidentalis*?«). Ekstrakcija s superkričnim CO₂ je bila uspešna metoda za ekstrakcijo tujona iz *Thuja occidentalis*. Toda pogoji, ki so bili uporabljeni v tej raziskavi (tlak in temperatura) niso bili optimalno izbrani zato so izkoristki majhni, produkt pa ni čist. Izračunano je bilo, da celoten liofiliziran material vsebuje le 0,134% tujona, v ekstraktu, pridobljenem s superkričnim CO₂ pa je do 13,5% tujona. Relativna napaka vseh izračunov je bila manj kot 1% in zato ne vpliva na zaključke raziskave. Za optimizacijo procesa je potrebno poiskati optimalen tlak in temperaturo za čim večji donos tujona. Gledano v celoti, pa je bil cilj raziskave dosežen.

9. BIBLIOGRAFIJA

1. Al-Asheh, S. (2012). Supercritical fluid extraction of useful compounds from sage. *Natural Science*, 04(8), 544–551. <http://doi.org/10.4236/ns.2012.48072>
2. Bielenberg, J. (2007). Thujone. *Medizinische Monatsschrift Fur Pharmazeuten*, 30(9), 322–326.
3. Biswas, R., Mandal, S. K., Dutta, S., Bhattacharyya, S. S., Boujedaini, N., & Khuda-Bukhsh, A. R. (2011). Thujone-Rich Fraction of Thuja occidentalis Demonstrates Major Anti-Cancer Potentials: Evidences from In Vitro Studies on A375 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2011, 568148. <http://doi.org/10.1093/ecam/nej042>
4. Bruker Co., L. (n.d.). Classification of Essential Oils with FT-IR Spectroscopy. Retrieved January 16, 2016, from <http://www.syntechinnovation.com/index.php/knowledge/145-classification-of-essential-oils-with-ft-ir-spectroscopy.html>
5. Catchpole, O., Tallon, S., Dyer, P., Montanes, F., Moreno, T., Vagi, E., ... Billakanti, J. (2012). Integrated supercritical fluid extraction and bioprocessing. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(4), 263–287. <http://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2012.263.287>
6. Committee on Herbal Medicinal Products. (2011). Public statement on the use of herbal medicinal products containing thujone. *ReVision*, 44(January), 1–9.
7. Danielski, L. (2007). Extraction and Fractionation of Natural Organic Compounds from Plant Materials with Supercritical Carbon Dioxide, 195.
8. French, L. G. (n.d.). SUPPLEMENTAL MATERIALS for online Publication STUDENT HANDOUT Isolation , Purification and Structure Determination of a Terpene Natural Product from the Essential Oil of a Plant ., 1–17.
9. Naser, B., Bodinet, C., Tegmeier, M., & Lindequist, U. (2005). Thuja occidentalis (Arbor vitae): A review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties. *Evidence-*

Based Complementary and Alternative Medicine, 2(1), 69–78.
<http://doi.org/10.1093/ecam/neh065>

10. Neuss, G. (2014). *Chemistry for the IB Diploma* (2014 editi). Oxford University Press.
11. Olsen, R. W. (2000). Absinthe and gamma-aminobutyric acid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4417–8.
Retrieved from
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=34311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
12. Petrovič, T. (2013). *Procesi v nekonvencionalnih superkritičnih fluidih*. Univerza v Mariboru.
13. Pike Technologies. (2014). APPLICATION NOTE ATR – Theory and Applications. *Pike Technologies*, 1–3.
14. Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T., & Hayasaki, H. (2002). GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *International Review of Cytology*. [http://doi.org/10.1016/S0074-7696\(02\)13011-7](http://doi.org/10.1016/S0074-7696(02)13011-7)