



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ
София
ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО
КАТЕДРА „ИНЖЕНЕРНА ХИМИЯ“

инж. Мария Цветанова Мондашка

на тема:

КОМБИНИРАНИ МЕТОДИ ЗА РАЗДЕЛЯНЕ И
КОНЦЕНТРИРАНЕ НА ЕКСТРАКТИ ОТ ПРИРОДНИ
СУРОВИНИ С БИОРАЗТВОРИТЕЛИ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор“
по научна специалност 5.10. Химични технологии (Процеси и апарати в химичната и
биохимичната технология)

Научен ръководител: доц. д-р инж. Илонка Съйкова

Научно жури:

1.- председател
2. - рецензент
3. - рецензент
4.
5.

София, 2025

Дисертационният труд е написан на 169 страници, съдържа фигури и таблици. Цитирани са източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на научен съвет на научното звено на катедра „Инженерна химия”, състояло се на 09.01.2026 година.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на от часа в зала, сграда „.....” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересуващите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Преди всичко бих искала да изкажа своята голяма благодарност на моя основен съветник и ръководител, **доц. д-р инж. Илонка Съйкова**, че ме прие в своя екип и ми даде възможност да работя по този интересен проект. Като мой ръководител тя ми даде много насоки и ценни предложения за експериментите и писането на дисертационният ми труд.

Оценявам търпението и насърчаването ѝ, което ми помогна, за да завърша изследванията си. Оценявам също нейната образователна и професионална подкрепа за много статии, постерни сесии, публикации и проекти, в които ми предложи да участвам.

Благодарна съм на нейната вискателност по отношение на цялостното изпълнение до предаване на дисертационният ми труд. Изключителен професионалист и специалист. Научи ме на толкова много и до последно изискваше още и още, за да стане по най-добрия начин.

С уважение и признателност за всичко, което направихте за мен през годините и разработката на този труд!

БЛАГОДАРЯ ВИ МНОГО ДОЦ. СЪЙКОВА!

Искам да благодаря за подкрепата и съдействието на колегите от катедра „Инженерна химия“ – и по-специално на **доц. д-р инж. Чавдар Чилев**, който ме насочи към тази специалност.

Благодаря за помощта и съветите в някои експерименти на **доц. д-р инж. Димитър Пешев**, за подкрепата на **доц. д-р инж. Ивайло Хинков** и на всички преподаватели и ментори, които са ме обучавали в университета и са ме подкрепяли безрезервно по време на писането и експерименталната работа в моят дисертационен труд.

Благодаря на семейството и близките ми, които бяха до мен и ме подкрепяха и даваха сили да продължа и завърша труда си.

ДЪЛБОКО ОЦЕНЯВАМ ВАШАТА ПОДКРЕПА И СЪМ ВИ БЕЗКРАЙНО БЛАГОДАРНА!

инж. Мария Мондашка
ноември, 2025 г.

I ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години има устойчива тенденция към разработване и използване на терапевтични и профилактични лекарствени растителни продукти, козметични средства и хранителни добавки от лечебни растения. Това е свързано с редица причини: многообразието от растителни видове, богати на ценни биологично-активни съединения с широк спектър на действие; разширяващите се научни доказателства, потвърждаващи техните лечебни и превантивни свойства срещу различни заболявания, както и достъпност спрямо синтетичните лекарствени средства, получаването на които често е трудно осъществимо.

В основата на целия технологичен процес за получаване на растителни продукти е екстракцията (извличането) с разтворител, затова от това, как е организиран този процес, в значителна степен зависи и степента на добавяне на стойност към използваното растение. От години се провеждат интензивни изследвания за усъвършенстване на съществуващи и разработване на нови (неконвенционални) методи и оборудване с оглед намаляване консумацията на енергия и подобряване ефективността на процесите. Проблемът с разтворителите е от особено значение, защото те присъстват не само при процесите на екстракция и пречистване, но се появяват и при формулиране на крайните продукти. Увеличаването на научните доказателства за неблагоприятните ефекти на някои често използвани разтворители върху човешкото здраве и околната среда, както и по-строгите изисквания, регламентирани от съвременните стандарти и норми, насърчават разработването и приложението на нови разтворители в промишлеността. Приоритет е ограничаване употребата на органични разтворители на петролна основа и/или замяна на опасните разтворители с по-безопасни такива, получени от възобновяеми източници, в много случаи от агробιο отпадъци, като етанол, естери на мастни киселини или масла от маслодайни растения. Предимството на тези разтворители е, че са изградени от съединения, които са често срещани в природата, лесно разградими са и не представляват сериозна заплаха за околната среда.

В научно-методичен план, тези екологични разтворители са внедрени в разделителните процеси в различна степен и възможностите им все още не са изследвани напълно. В това изследване, освен че се опитваме да дефинираме един цялостен подход за разработване на методи за екстракция, който се изразява в комбинирането на правилно подбрани екстракционни разтворители, адекватна предварителна подготовка на билката и добри работни условия, ние изследваме и възможностите за по-широко използване на едно от доказалите се лечебни растения - жълт кантарион (*Hypericum perforatum*) - като източник за получаване на традиционни и нови продукти за различни приложения.

Изводи от литературния обзор

Въз основа на проучените литературни източници и анализът на информацията са формулирани следните по-важни изводи:

1. Традиционните лечебни растения като *Hypericum Perforatum* са с добре изучен химичен състав и признати лечебни свойства. Понастоящем изследванията все повече се насочват към изясняване на връзката „структура-свойства“ чрез отчитане влиянието на молекулната структура на съединенията върху техните физикохимични свойства и биологична активност. Малко засегнат аспект са възможностите за рационално и комплексно използване на билката с оглед получаване на традиционни и нови продукти в зависимост от използваните разтворители и условия на процеса.

2. Предвид терапевтичното им приложение, при производството на продукти от лечебни растения се следват утвърдени производствени схеми поради по-строгата регулация и процедури на одобрение на продуктите. Поради това, традиционните технологии все още се използват в по-големи мащаби, а иновативни методи се прилагат най-близки до наличните технологични схеми.

3. Сред различните методи за подпомагане на екстракцията, като най-често използван метод се е наложила ултразвуковата екстракция поради сравнително простата схема на процеса, достъпност на оборудването и приложимост при различни класове вещества и видове разтворители. Параметрите за провеждане на процеса (мощност, време и температура) обаче варират в широки граници, а резултатите за въздействието върху степента на екстракция и селективността към даден клас съединения не са еднозначни.

4. По отношение на разтворителите, водно-етанолните смеси остават най-широко използваните екстракционни разтворители. Голяма част от изследванията се фокусират върху полифенолните киселини и флавоноиди поради тяхната широка приложимост. Липсват достатъчно данни за извличането на комплекса липофилни съставки, сред които са повечето активни компоненти.

5. Нарастващата тенденция за използване на разнообразни екстрагенти на растителна основа разкрива необходимостта от въвеждане на теоретични подходи за предсказване афинитета на разтворителите по отношение на целевите съединения, които да послужат при обосновка на избора на подходящ разтворител за дадено приложение.

6. Все още са недоизяснени механизмите на взаимодействие на ултразвуковите полета с разтворителите и суровината и възможните неблагоприятни ефекти върху състава и свойствата на получаваните екстракти. Не са открити и проучвания в литературата за доказване стабилността и безвредността на екстракти от жълт кантарион, след ултразвукова обработка.

II ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основна цел на настоящата дисертация е разширяване на методологията за изследване на екстракцията от лечебни растения при използване на традиционни и нетрадиционни разтворители на растителна основа, включваща въвеждането на екологични показатели и показатели, свързани с качеството и безопасност на получените екстракти.

В съответствие с поставената цел са определени следните основни задачи:

1. Да се приложи концепцията на параметрите на разтворимост на Хансен и на тази основа да се обоснове избора на разтворители за извличане на комплекса полярни и липофилни съединения в билката.

2. Да се определи влиянието на изходните суровини, като се проследят промените в съдържанието на основни групи компоненти в зависимост от използваните надземни части, степен на цъфтеж, място на събиране и предварителна подготовка.

3. Да се проведе сравнителен анализ между традиционни методи за екстракция и екстракция, подпомогната с ултразвук по отношение на добива и чистотата на целевите компоненти.

4. Да се определи ефективността на въздействието на УЗ самостоятелно и при комбиниране с механично разбъркване и нагряване.

5. Да се изследва експериментално и моделира кинетиката на екстракция и на тази основа да се определи подходяща продължителност на процеса, фракционен състав, съотношение растителен материал/екстрагент и температурни ограничения.

6. Да се провери стабилността и безвредността на получените екстракти с подходящи за целта тестове.

III МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За експерименталните изследвания са използвани два вида суровини: готова билка, закупена от търговската мрежа (Hyperici Herba) и събрана от нас диворастяща билка от различни местообитания в периода 2017 - 2019 г., като са спазени общите правила при събиране, стандартизиране, първична преработка и съхранение. Подготвени са представителни проби от цялата надземна част (горните облистени части на 20 - 30 cm от върха) и целите съцветия (горната цъфтяща част около 6 cm), вегетативна част (листа и стебла), цветове, които се използват като билки съгласно предписанията на Европейската Фармакопея за получаване на растителни препарати.

За получаване на екстрактите се използва основно сух растителен материал, но за някои сравнителни анализи е използвана и суровина в свежо състояние, която се подлага веднага на екстракция със съответния разтворител. Непосредствено преди екстрахиране, суровините са раздробявани чрез нарязване на парчета с големина около 5 mm (свежа суровина) или смилани на лабораторна мелничка (суха суровина), като са използвани нефракционирани или фракционирани за съответния анализ.

Изследвани са различни сурови или частично пречистени екстракти - от една страна такива, препоръчвани от народната медицина и традиционната употреба, от друга – екстракти, обогатени с природния комплекс БАВ, в зависимост от природата на разтворителя. Използваните разтворители за получаване на течни екстракти са: дестилирана вода и 20–96% воден разтвор на етилов алкохол, 20–89% воден разтвор на глицерол, 9 традиционни и нетрадиционни растителни масла от различни суровини. Те бяха подбрани на база разработената методология за избор на екологични разтворители на растителна основа.

За охарактеризиране съдържанието на основните групи екстрахируеми съставки в цялата надземна част и отделни части са използвани класическите методи на мацерация (без разбъркване) и Сокслет екстракция. Те са проведени в 2 варианта: директна екстракция с водно-алкохолни екстрагенти и двустепенна екстракция: първоначална екстракция с летлив неполярен разтворител (хексан, петролеев етер, хлороформ) и последваща екстракция с водно-алкохолни екстрагенти.

Като алтернатива за интензификация на процеса е приложена екстракция, подпомогната от ултразвук, самостоятелно или в различни комбинации с разбъркване и нагряване.

Изследвано е влиянието на някои технико-технологични параметри върху добива и кинетиката на процеса, а именно съотношение на масата на суровината към обема на екстрагента (от 1:5 до 1:50), брой последователни екстракции (1-4), температура (до 75°C), метода за разбъркване, фракционен състав на билката. Конкретните параметри са представени в съответните схеми на опитите.

За отделните екстракционни процедури е използвана следната апаратура: ултразвукова вана SIEL UST 5.7-150 (входна мощност от 100 W, постоянна честота от 36 kHz, работен обем на резервоара 2.00L; нагряване: температура от +5°C над околната до 79°C; таймер: 0 - 29 min); апарат Сокслет (екстракционен обем 250 ml);

термостатична водна баня (до 100°C, обем 6L, мощност 800 W); хоризонтална клатачна машина (8 гнезда) с максимална скорост 500 rpm магнитна бъркалка с нагриване.

Фитохимичните анализи са проведени съгласно стандартни методи, описани в Европейската фармакопея (Ph. Eur. 9.0, 2017) и Монографиите на Комитета по растителни лекарствени продукти към Европейска агенция по лекарствата (ЕМА, 2019). Те включват следните показатели и методи:

- Гравиметрични методи – измерване на влагосъдържание (загуба на маса при сушене) на растителните проби (dw), общо количество екстрактивни вещества (общ извлек) в екстрактите (dE);

- Методи за количествено (спектрофотометрично) определяне на основни класове съединения:

- общи хиперицини и неговите производни чрез директно снемане на спектри - НУРs, mg /g dw;

- общи полифеноли по метода на Folin Ciocalteu - ТРС, изразено в еквиваленти на галова киселина (GAE) в 100 g суха суровина (mg GAE/100 g dw);

- общи флавоноиди по колориметричен метод с AlCl₃ - ТFC, изразено в еквиваленти кверцетин (QE) на 100 g суха суровина (mg QE/100 g dw);

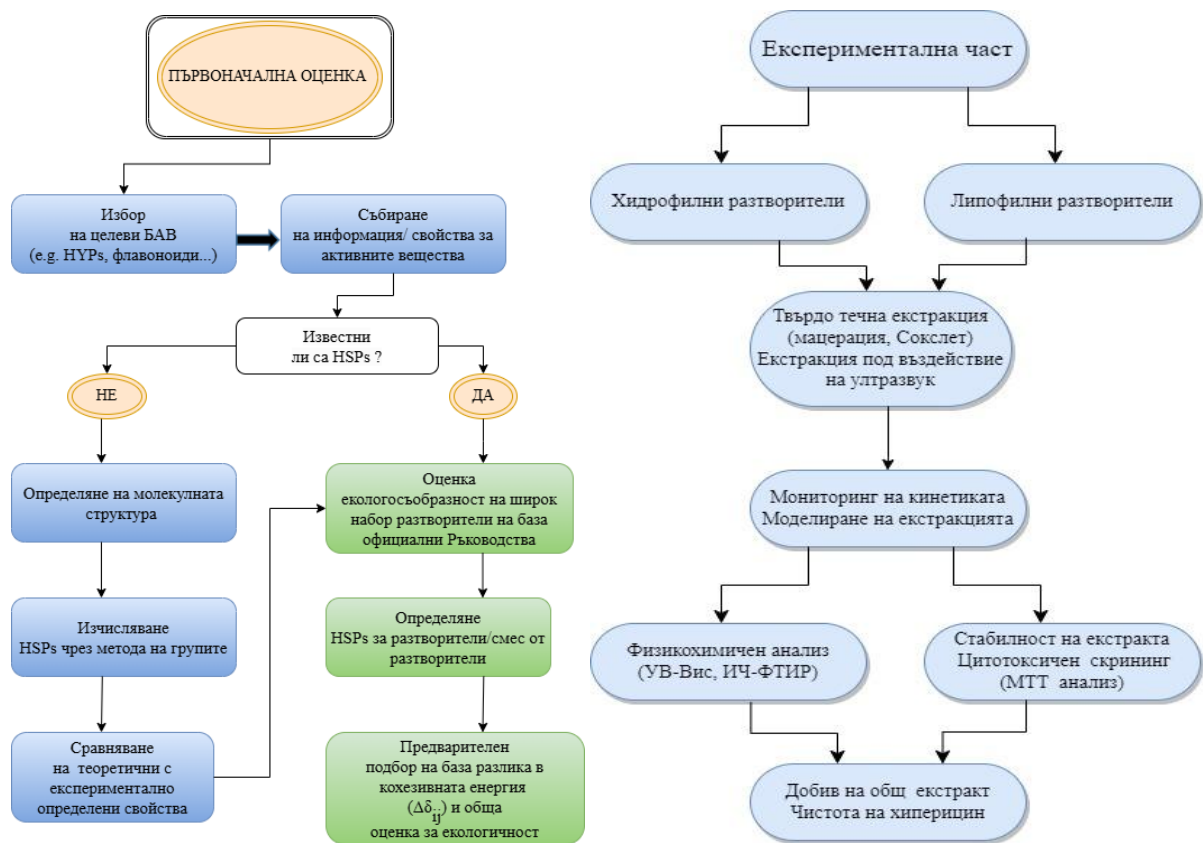
- общи хлорофилни и каротеноидни пигменти с директно измерване – TChr, съответно (TCar), mg/g dw.

Инфрачервената спектроскопия (ИЧС) е използвана за идентификация на функционалните групи на основни компоненти, подкрепяща теоретичното изследване за влиянието на молекулната структура върху разтворимостта. Комбинирана с UV-Vis, е използвана и при оценка на стабилността на активните компоненти и екстрагентите при пряко излагане на слънце (фотоокисление), при термична обработка (термоокисление) и в ултразвуково поле. Също така са направени МТТ тестове за оценка на потенциалната цитотоксична активност. Целта на тези допълнителни анализи е да се установи стабилността на получените алкохолни и маслени екстракти и тяхната безвредност, които са важни характеристики за практическото им приложение.

IV РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1 Методика на изследването

В контекста на тематиката и задачите на дисертационната работа е разработена методология за реализиране на изследванията (фиг. 4.1). Те са обособени в 3 части, отразяващи трите аспекта на изследването, а именно: 1) теоретична оценка и избор на подходящи разтворители, на растителна основа, подкрепени с експериментални изследвания за разтварящата и екстрахираща способност в различни среди; 2) установяване на характерни морфологични особености на растителната суровина с оглед осигуряване качеството на билката; 3) изследване на основни фактори, които определят избора на метод за екстракция като възпроизводимост, добив и скорост на екстракция, селективност, стабилност (при работни условия и при съхранение) и безопасност/безвредност на получените екстракти.



Фиг. 4.1 Схематично представяне на методологията

Обект на настоящото изследване е едно от доказалите се лечебни растения използвани в класическата или традиционна (алтернативна) медицина на много народи по света - жълт кантарион (*Hypericum perforatum*). Основни критерии за подбор бяха литературни данни и предишни наши изследвания за сложния и разнороден в химичен състав, което дава възможност за получаване на традиционни и нови продукти в зависимост от използваните разтворители и условия на процеса. Допълнителни критерии бяха специфичното приложение, достъпност на суровината, традиции в употребата и практическа значимост.

Основната трудност е свързана с факта, че съдържанието на активните вещества трябва да е в определени граници, за да имат терапевтичен ефект, а в същото време съдържанието им в билките варира в широки граници в зависимост от много фактори: биологични особености на вида, произход, климатични условия, фаза на развитие на растението. Затова качеството на билката се характеризира по наличието на определени вещества, регламентирани от Европейската Фармакопея, с чието присъствие се свързват специфичните терапевтични свойства на екстрактите. Особеностите на суровината и условията на екстракция се отразяват в променливото съотношение на количеството изходен материал, използван за получаване на единица екстракт (*Droguе: Extract Ratio DER*) за даден екстракционен разтворител, което също е съблюдавано като приблизителна оценка за терапевтичната еквивалентност на екстрактите.

4.2 Теоретично и експериментално определяне на разтворимостта на БАВ в различни екстракционни системи

Необходимостта от предварителен избор на подходящи разтворители в процеса на екстракция от растителни суровини е продиктувано от напредъка в разработването на нови разтворители, които се отличават с различни физико-химични и термодинамични свойства, притежават различна хидрофилност/хидрофобност, позволяват гъвкавост при избора на съставлящите компоненти и разширяват възможностите за специфични приложения.

Едно от условията за осъществяване на такъв избор е предварителна оценка и сравняване на различни възможни варианти и отчитане както на предимствата, така и на ограниченията им. За тази цел са необходими предсказващи (предиктивни) подходи и изчислителни методи, които могат да правят бързи прогнози за голям набор от съединения, представляващи интерес за конкретната система и без провеждане или с минимален брой експерименти определянето на различни характеристики на чистите и особено на смесените екстракционните системи, още на предварителния етап на разработка на технологията.

Разработената методология за ориентируващо изследване (скрининг) на разтворители, включваща комбиниране на критерии за разтваряща способност и избирателност на (еко)токсикологични показатели е пряко свързана с поставената цел в дисертацията.

- Прогнозиране на термодинамичната съвместимост разтворител-биоактивни съединения.

Теоретичният анализ се основава на триизмерните параметри на разтворимост на Hansen (Hansen Solubility parameters, HSPs), които дават количествена оценка на потенциалните междумолекулни взаимодействия между разтворителя и разтвореното вещество (природното съединение), което следва да бъде извлечено. Подходът се основава на концепцията, че плътността на кохезионната енергия, т.е. общият параметър на разтворимост (δ_t) може да се апроксимира чрез сумата от енергийните плътности, необходими за преодоляване на атомните дисперсионни сили, като например силите на Ван Дер Ваалс (δ_D), молекулярни полярни сили, произтичащи от дипол-диполни взаимодействия (δ_P) и взаимодействия, свързани с водородни връзки (обмен на електрони, донори/акцептори на протони) между молекулите (δ_H). Стойностите на HSP (d , p и h) са оценени чрез метода на приноса на групите на Van Krevelen (1990) за изчисляване на специфичната моларна енергия на дисперсионните F_d и поляризационни сили F_p и водородна връзка E_h , както и моларния обем V_m , на съответните функционални групи на базата на химичната структура на съединенията:

$$\delta_d = \frac{\sum F_d}{V_m} \quad \delta_p = \frac{\sqrt{\left(\sum F_p^2\right)}}{V_m} \quad \delta_h = \sqrt{\left(\frac{\sum E_h}{V_m}\right)} \quad (4.1)$$

При бинарни или многокомпонентни смеси за характеризирание HSPs параметрите е използвано правилото за адитивност, чрез линейна комбинация от съставлящите я компоненти (ϕ_i е обемна част от техните съставки)

$$\delta_{d,m} = \sum_{i=1}^{i=n} \delta_{di} \cdot x_i \quad \delta_{p,m} = \sum_{i=1}^{i=n} \delta_{pi} \cdot x_i \quad \delta_{h,m} = \sum_{i=1}^{i=n} \delta_{hi} \cdot x_i \quad (4.2)$$

На тази основа е изчислена относителната разтворимост на изследваните разтворители с представители на основни групи метаболити в жълтия кантарион с отчитане разликата в молекулните характеристики (молекулна структура, функционални групи, моларен обем), за да се покаже селективността на разтворителите.

- Оценка на екологичната съвместимост на разтворителите въз основа на (еко)токсикологични показатели.

В рамките на дисертацията подходът е разширен, като е съчетан с индикатори за въздействието на разтворителите върху безопасността/здравето/околната среда, които са важни за безопасното функциониране на процеса и за индустриалното му внедряване. За тази цел сме използвали публикувани данни на Ръководството за избор на устойчиви разтворители Glaxo Smith Kline (GSK). За оценка на отделните показатели и подпоказатели се използват степени (в скала от 1 до 10), които показват тежестта на (еко)токсикологичния ефект на разтворителя. За комплексна оценка сме дефинирали общ екологичен индекс (G) като средна геометрична стойност на показателите за потенциалните въздействия върху околната среда (E), човешкото здраве (H), безопасност на процеса (S) и третирането на разтворителите след употреба (W), позволяваща да се сравнят различни варианти по отношение на потенциалните им ефекти върху околната среда.

- Съчетаване на параметрите на разтворимост с (еко)токсикологични показатели.

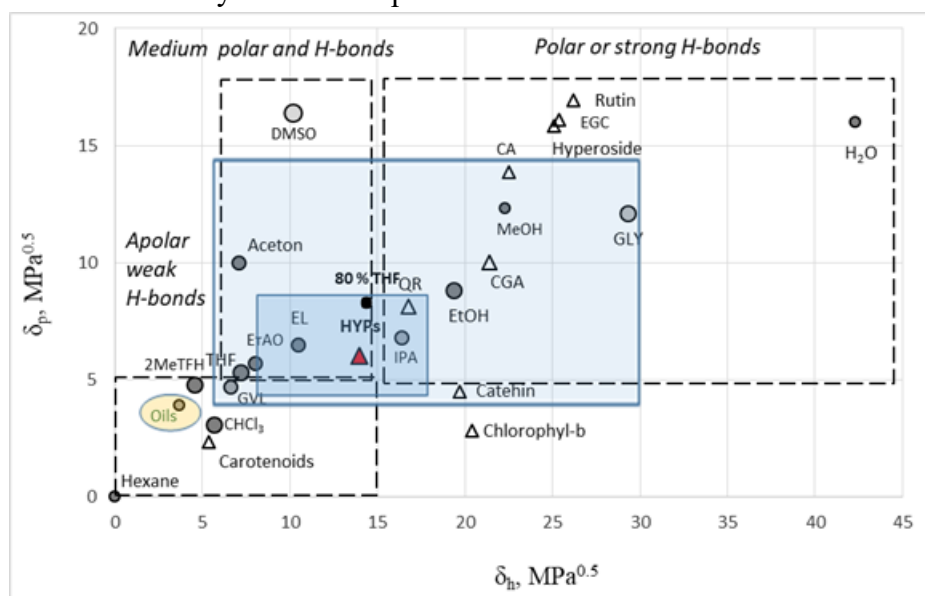
За отчитането на двата аспекта е предложена е комбинация от два критерия: (а) минимална разлика в кохезивната енергия ($\Delta\delta_{ij}$), като индикатор за съответствието (или несъответствието) между двойка компоненти разтворител-разтворител и разтворител-разтворено вещество, съчетана с максимална стойност на обобщената оценка на въздействието върху здравето и околната среда (G) на базата на GSK:

$$\Delta\delta_{ij} = ((\delta_{d_i}^i - \delta_{d_j}^j)^2 + (\delta_{p_i}^i - \delta_{p_j}^j)^2 + (\delta_{h_i}^i - \delta_{h_j}^j)^2)^{0.5} < \Delta\delta_{REF} \quad (4.3)$$

$$G = (H \cdot S \cdot E \cdot W)^{1/4} > G_{REF} \quad (4.4)$$

Първоначално насочихме вниманието си към намиране на подходящ заместител на тетраhydroфуран (THF), по-конкретно 80% THF/H₂O който се препоръчва от Европейската фармакопейна монография за *Hiperici Herba* за оценка качеството на билката и препаратите от него, но заедно с други етерни и диполярни аполярни разтворители са под все по-строги регулаторни ограничения. Пълният вариант на разработения алгоритъм и изчисления може да се види в дисертацията. При предварителната оценка за съвместимост на разтворителите с екологични характеристики са анализирани над 150 органични разтворители, Само 9 от тях изпълняват посочените критерии. Това позволява да се елиминират на ранен етап онези алтернативи, които не са достатъчно безопасни и да се изследват вещества, осигуряващи най-малък риск за околната среда и човешкото здраве.

Концепцията на метода за разглежданата конкретна система е илюстрирана на Фиг. 4.2, показваща взаимното разположение на параметрите на хиперицин и други представители на основни БАВ в жълтия кантарион и разширен набор от разтворители в 2D пространството на Хансен (δ_p , δ_h). В анализа са включени около 20 основни представители на комплекса БАВ в билката от различни химични класове и с разнообразни функционални групи. Основният акцент е поставен върху съдържанието на хиперицин, като маркер за растенията от рода и важен индикатор за качеството на билката, респективно на получените екстракти.



Фиг. 4.2 Оценка на разтворителите въз основа на HSPs параметрите за чисти разтворители (25°C, 1 atm) (големината на символа отразява стойността на δ_d)

Широкият диапазон на изменение на изчислените HSPs параметри за избраните представители на жълт кантарион ($\delta_t = 14.5 - 33.0$ MPa^{0.5}) показват ясно сложният и разнороден в химично отношение състав. Те съдържат много различни по полярност биологично активни вещества, от силно липофилни (хиперфорин, каретеноиди), липофилни (хиперицин и неговите производни, етерично масло - α -пинен и други терпени); липофилни/хидрофилни флавоноиди (гликозиди на кверцетиноподобен хиперозид, рутин, изокверцитрин, кверцитрин) до хидрофилни (процианидини и танини, хлорогенова киселина и сродни вещества).

Уникалната полициклична ароматна структура на хиперицин - хидрофобна част, включваща 8 пръстенна система, и хидрофилна част от метилови и хидроксилни функционални групи около периферията - отразява амфибилният характер на молекулата и дава основание за тестване на различни полярни протонни и апротонни или неполярни разтворители. Наложените ограничения за афинитета на разтворителя по отношение на определени компоненти дават възможност за определянето на областите, които биха били подходящи за получаване на различни фитокомплекси, съдържащи в по-голяма или по малка степен хиперицин и неговите производни (HYPs). За по-висока селективност (избирателност) спрямо определена група компоненти трябва да се даде предпочитание на разтворители, разположени около

целевото съединение ($\Delta\delta < 5 \text{ MPa}^{0.5}$). Обратно, разширявайки зоната около целевия компонент ($\Delta\delta \sim 10-15 \text{ MPa}^{0.5}$) се намалява разтворимостта и избираемостта спрямо целевия компонент, разширявайки обхвата на други потенциално разтворими съединения. Това дава основание за тестване на различни полярни протонни и апротонни или неполярни разтворители за получаване на различни стандартизирани и нестандартизирани екстракти, с различно общо съдържание и различни профили на екстрактивните вещества.

Теоретичният анализ показва редица проблеми, свързани с интегрирането на новите екологичните разтворители на растителна основа в екстракционния процес. Намирането на „зелени“ осъществима алтернатива не е рутинна задача и обикновено е трудно да се извърши пълна замяна „1 към 1“ на утвърдени разтворители за даден процес, без да се налага промяна в технологията или приложението на екстрактите. Повечето от алтернативните разтворители са насочени като замяна на неполярните летливи разтворители и бяха намерени само няколко заместители за диполярните апротични разтворители, като тетраhydroфурилов алкохол (THFA) и γ -валеролактон (GVL), без нито една да се доближава напълно до 80% THF.

Ясно е обаче, че пространството на чистите разтворители е ограничено и използването на смесени разтворители в подходяща комбинация е по-бърза и по-осъществима стратегия за целево извличане на определени компоненти или група компоненти от растителната дрога от търсенето на изцяло нов разтворител с подходящи свойства.

За да потвърдим приложимостта на описания изчислителен метод за прогнозиране ефекта при смесване и идентифициране на възможни смеси от разтворители са използвани по-широко използвани екстракционни разтворители: бинарните смеси етанол-вода и глицерол-вода. Като многокомпонентни разтворители използвахме различни растителни масла. Поради нарастващото производство на биогорива, те се предлагат в големи количества и са едни от най-евтините разтворители след водата. Освен икономически съображения, те покриват голям диапазон на полярност и могат да бъдат използвани директно за конкретното приложение.

4.2.1 Сравнителен анализ на разтварящата и екстрахираща способност в бинарни водно-алкохолни смеси

- *Определяне на оптимални области на разтворимост*

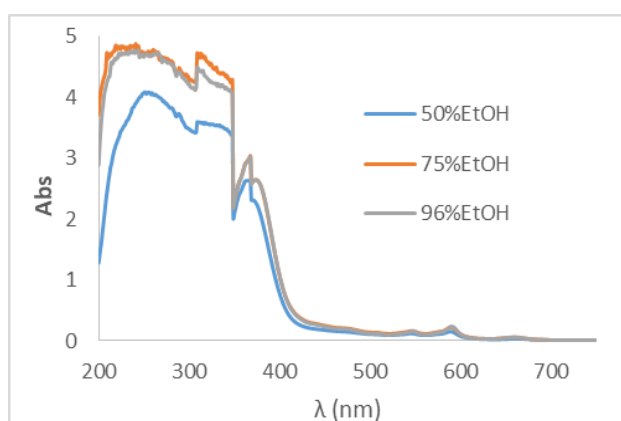
Проведени са сравнителни тестове за разтваряне на сух стандартизиран екстракт (смесен стандарт) от жълт кантарион в бинарните смеси вода-етанол и вода-глицерол. За целта е използван сертифициран сух екстракт от жълт кантарион (SJW-DE®). Той представлява прахообразна кафява субстанция с 0.037% хиперицин. В смесения стандарт се съдържат също основни флавонолови гликозиди (хиперозид, рутин, кверцитрин и изокверцитрозид) и агликони (кверцетин, биапигенин). За определяне на степента и скоростта на разтваряне е използван стандартния метод за разтваряне (“Shake-Flask”).

Както теоретичните, така и експерименталните резултати разграничават поведението при ниски и средни от тези при високи концентрации на моновалентния и тривалентния алкохол. Бинарните системи етанол-вода покриват доста широк диапазон на полярност (от етанол, 18,49 до вода, 47,86 MPa^{0.5}) и показват различна способност за свързване на водород. Използването на 75-96% води до бързо разтваряне на всички основни фенолни съединения, идентифицирани в стандарта, като при 96% е почти мигновено. С увеличаване процентното съдържание на водата над 50% степента и скоростта на разтваряне намаляват и достигат най-забавено и непълно разтваряне при водата. Затова областта 50-75%-ен етанол е определена като оптимална.

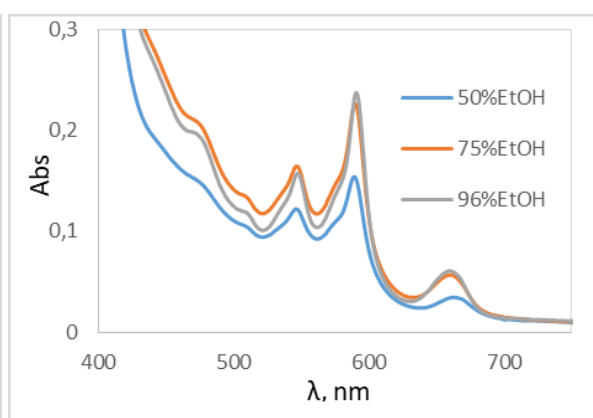
Тривалентният алкохол глицерол е със по-ограничен спектър на действие ($\delta_T = 33,35 \text{ MPa}^{0.5}$). Поради своята междинна полярност между вода и други алкохоли, има относително по-слаб капацитет за разтваряне на хиперицин, но е ефективен съ-разтворител за промяна полярността на водата, теоретично, подобрявайки извличането на полярните фенолни гликозиди като рутин и кверцетин спрямо етанол. По-концентрираните разтвори (50-89% GLY) са изключително вискозни и много трудни за обработка (разбъркване, филтруване). Затова като подходящ интервал сме предложили 20-50%-ен водно-глицеролови разтворители.

- *Влияние на екстракционния разтворител върху състава на екстракта*

За да се провери доколко добрата разтваряща способност е предпоставка и за екстрахиращата способност, са проведени опити с определения като оптимален интервал на концентрация на 50-95% етанол-вода. Екстракцията е проведена със суха растителна суровина при съотношение суровина – екстрагент 1:12.5 (12.5 gmL⁻¹; продължителност 45 min при стайна температура. На фиг. 4.3 са показани спектрите в целия интервал (200-700 nm) и на фиг. 4.4 във видимата област (400 - 700 nm), където се отчитат ясно изразените пикове при 547 nm и 590 nm, характерни за хиперицин и неговите производни.



Фиг. 4.3 УВ/Вис спектри на водно-etanoлови екстракти (50 - 96 % vol.)



Фиг. 4.4 Спектри на хиперицин във водно-etanoлови екстракти (50 - 96 % vol.)

Етанолът е признат универсален разтворител, тъй като позволява да се извлекат широк спектър вещества, но процентното съдържание зависи от вида на веществата, които ще бъдат извличани и от вида на суровината. Сходството във формата на

спектрите показва наличието на основните изследвани групи БАВ, хиперицин и неговите производни (НУРs), общи флавоноидни и нефлавоноидни фенолни компоненти (ТРС, ТФС) и общи пигменти (РGs), като се променя основно съотношението между тях.

Отклонението от теоретично определената тенденция, където разтварящата способност за НУРs нараства с концентрацията на етанол и достига максимум при 96% (100%) EtOH, отразява влиянието на взаимодействието на разтворителя със сухия растителен материал.

Важна роля в този процес изпълнява водата, която улеснява проникването на екстрагента в структурата на твърдите части и спомага за по-голяма достъпност до целевите компоненти. Освен това, дори и в малки количества, водата променя полярността на органичния разтворител и подпомага десорбцията на по-широк спектър съединения. В растенията нафтодиандроните се намират предимно под формата на соли, което определя по-лесното им извличане от растителната матрица с протонни разтворители с по-висока полярност. Обикновено изследваните групи съединения (флавоноиди, фенолни киселини, каротеноиди и хлорофили) са свързани чрез водородни връзки към растителните структури и прибавянето на вода отслабва здравината на тези връзки и улеснява извличането им.

Отчетената близка екстрахираща способност между 75% и 96% по отношение на НУРs показва, че известна степен на изменение на алкохолното съдържание в разтворителя е допустимо, без да се отразява съществено на спектъра на екстрахираните целеви компоненти. Приемливо ниво и на селективност, и на екстракционния добив се запазва до 50% EtOH. Този интервал съвпада с този, препоръчан от европейската фармакопея за добре установени или традиционни употреби на Н. Негба: течните екстракти с 45-50% етанол имат положително въздействие при по-леки неврогенни състояния като временно психическо изтощение докато екстракти с 60-80% етанол с по-висока концентрация на активни компоненти е добре установено приложение за лечение на лека до умерена депресия (EuPh).

4.2.2 Проучване на възможностите за използване на растителните масла като разтворители

Едно от най-разпространени растителни масла, получени чрез мацерация, е маслото от жълт кантарион, известно още като *Hyperici Oleum* или червено масло. То не е летливо етерично масло, а растително масло, обикновено маслинено масло, обогатено чрез мацерация с билката в свежо или сухо състояние, изложена на пряка слънчева светлина за продължителен период (от 28 до 40 дни), докато придобият интензивен червен цвят. Поради факта, че този метод е част от народната медицина на редица средиземноморски страни, първоначално сме използвали именно него за получаване на маслени екстракти.

За провеждане на изследванията са подбрани 9 масла, някои са широко използвани базови глицеридни масла, като маслинено (*Olea europaea*), сусамово семе (*Sesamum indicum*), бадемово (*Amygdalus communis*) а други са по-рядко използвани, като маслото от авокадо (*Persea americana*), пшеничен зародиш (*Wheat germ*), жожоба

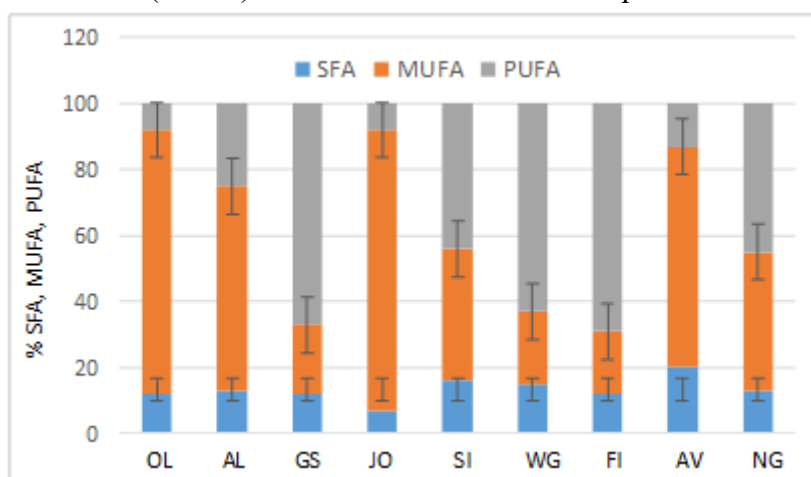
(*Simmondsia Chinensis*), гроздови семки (*Vitis vinifera*) семена от ленено семе (*Linum usitatissimum*), бял синап (*Sinapis alba*) и черно семе (*Nigella Sativa*). Те са получени чрез студено пресоване, без използването на органични разтворители или други добавки, които намират приложение за фитофармацевтични, дермато-козметични продукти и/или хранителни добавки от ядливите масла.

- *Оценка на параметрите на разтворимост с отчитане променливостта на мастнокиселинния състав*

Растителните масла са комплексни липофилни смеси, съставени основно от естери на мастни киселини и глицерол, достигащи 95-98% от общото тегло, с променлив състав, който зависи от произхода на източниците и начина на получаването им.

За да се обоснове теоретично афинитета на целевите компоненти с изследваните масла, бяха изчислени HSPs параметрите на разтворимост въз основа на структурата на основни мастни киселини. За тази цел е използван подхода на De La Peña-Gil (2016), според който параметрите на разтворимост на маслата могат да се апроксимират чрез мастно-киселинния състав на отделните мастни киселини. Поради преобладаващото им тегло в молекулите на триглицеридите, а също и поради това, че съдържат реактивната част на молекулите, мастните киселини оказват съществено влияние върху физикохимичните и реологични свойства на маслата.

Предвид природният произход на маслата са отчетени препоръчителните граници за състава на маслата въз основа на стандарти за растителни масла и маслопродукти на комисията Codex Alimentarius и научни публикации, когато липсват данни за някои специфични масла в стандартите. Графиката 4.5 обобщава средните стойности и стандартните отклонения за общите наситени (SFA), мононенаситени (MUFA) и полиненаситени (PUFA) киселини за изследваните растителни масла.

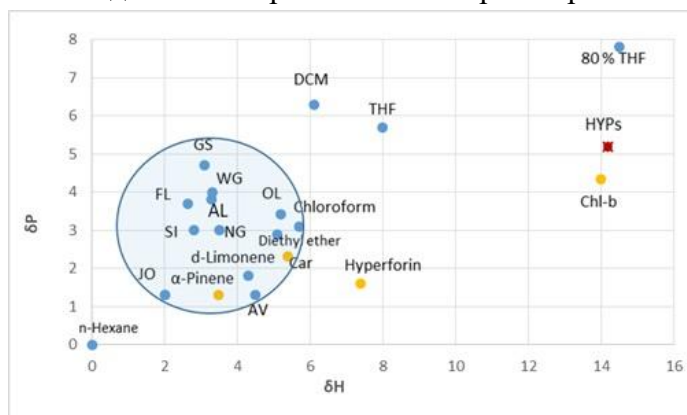


Фиг. 4.5 Съдържание на ненаситени (SFA), мононенаситени (MUFA) и полиненаситени (PUFA) мастни киселини (%) в използваните масла

В състава на маслата преобладават ненаситените киселини (средно над 85%), на които се дължи течната им консистенция на стайна температура. Ключова мононенаситена киселина е олеиновата (C18:1), а от полиненаситените - линолова

(C18:2) и линоленова (C18:3), но в различни пропорции. Могат да се разграничат 3 групи, според степента на ненаситеност. Маслата от бадем (AL), жожоба (JO) и авокадо (AV) се характеризират с по-високо съдържание (>50%) на мононенаситени в сравнение с полиненаситени и наситени мастни киселини (MUFA>PUFA>SFA), подобно на маслиновото масло (OL). Маслата от гроздови семки (GS), пшенични зародиши (WG) и ленени семена (FL) имат по-висок дял на полиненаситени спрямо мононенаситените киселини (PUFA>MUFA>SFA), характерно за състава на слънчогледовото масло. Други масла като синап (SI) и черно семе (NG) осигуряват по-балансиран спектър (около 40%) от моно- и полиненаситени киселини (MUFA~PUFA>SFA).

Тези състави са използвани като основа за прогнозиране на параметрите на разтворимост, като е приложено правилото за адитивност. За да се видят нагледно приликите и разликите в разтварящата способност с други неполярни органични разтворители, сме съпоставили графично изчислените стойности на растителните масла, и съответно някои липофилни компоненти на билката, които на база междумолекуларното взаимодействие вероятно биха се разтворили в маслата.



Фиг. 4.6 HSPs параметри на растителните масла (25°C, 1 atm)

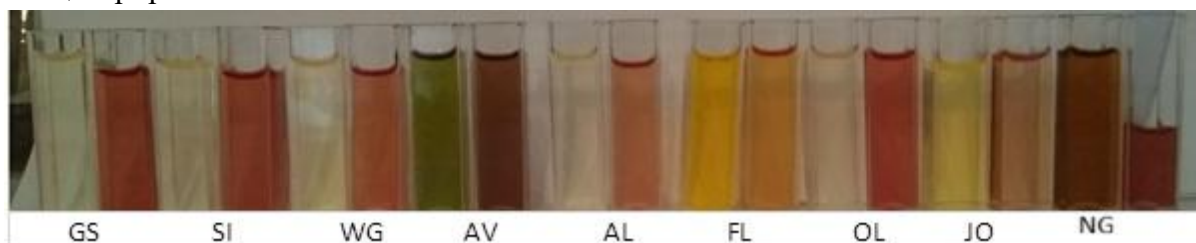
Въпреки че всяко от маслата има различно съдържание на наситени, моно- и полиненаситени киселини, числените оценки за HSPs са разположени в много ограничена зона ($\delta_d, \delta_h < 6 \text{ MPa}^{0.5}$). Това се дължи на сходството в структурата на отделните киселини, дължината на въглеводородната верига (основно C14 - C18) и моларна маса. Структурните елементи, които правят молекулата на мастните киселини частично полярна, е полярната карбоксилна група (-COOH) и в по-малка степен двойните връзки въглерод-въглерод (C=C), но определящи се явяват дългите въглеводородни вериги (CH₃-(CH₂)_n-CH₃). Това ги прави хидрофобни с доминиращи дисперсни взаимодействия ($\delta_d \gg \delta_p, \delta_h$), а полярните и H-връзките се променят малко от едно масло към друго.

Теоретично, това дава възможност за разтваряне на молекули с по-слаби полярни взаимодействия, като хиперицин, някои липофилни флавоноиди и растителни пигменти, за разлика от силно неполярни разтворители като n-хексан. Летливи органични разтворители (метиленхлорид, дихлороетан, хлороформ, етер, етанол 70%) се използват като екстрагенти за получаване на концентрати от липофилни комплекси,

които след отстраняване на разтворителя се смесват с растителното масло. Директната екстракция с растителните масла би дала възможност да се спестят тези процеси, които изискват значителна енергия и обикновено има остатъчни количества в сухите екстракти, за получаване на по-качествени и безвредни екстракти.

- *Получаване на маслени извлеци с растителни масла*

Маслените извлеци са получени след 40-дневна мацерация в съответните масла, изложени на пряка слънчева светлина. Обемът на маслото, възстановен след процеса, представлява около 80-90% от обема, въведен в началото на екстракцията, при което съотношението билка /суров екстракт (DER) е приблизително 4:1, в рамките на препоръчителния диапазон между 4-7:1 за този традиционен продукт. Такива ниски съотношения са подходящи, когато целта на процеса не е да се постигне висока степен на екстракция, а да се обогати масленият екстракт на целевите съединения, като се избягва ненужното използване на разтворител и допълнителни етапи на концентриране.

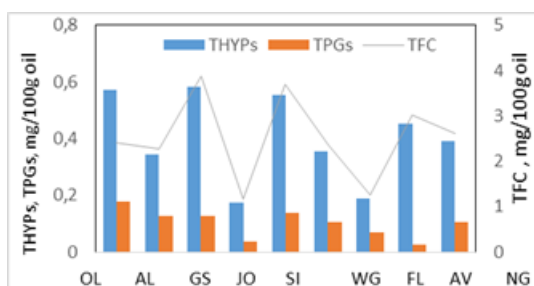


гроздови семки GS, сусамово семе SI, пшеничен зародиш– WG, авокадо AV, бадемово (AL), ленено семе (Linum usitatissimum L.)-FL, маслиново OL, жожоба JO, черно семе -(NG)

Фиг. 4.7 Изменение на цветовете характеристики на маслените екстракти

Цветът, придаден на маслата от пигментите, има важно значение за потребителските качества на продукта и промяната му може да бъде свързана с обработките, на които са били подложени, включително реакции на фоторазграждане на фоточувствителните съединения. Тъй като изходните масла са студено пресовани и нерафинирани, те съдържат известно количество пигменти и цветът варира от бледожълт (почти безцветен) до жълто-зелен и кафяво-червен в зависимост от използваната суровина за получаването им. По време на мацерацията част от мастноразтворимите съединения на билката се прехвърлят в течното масло и в края на 40-дневния период се получават екстракти с визуално различни нюанси на червения цвят. Характерното ярко червено оцветяване на Oleum се получава при първоначално слабо пигментираните масла. Маслото, което се отличава от всички останали, със силно влошените цветни характеристики е черното семе -(NG), поради силният му мирис и тъмен цвят, не считаме, че е подходящо в чист вид за разработване на маслени екстракти.

На Фиг. 4.8 са представени данните за съдържанието на общи хиперицини (HYPs) и флавоноиди (TFC), както и общи пигменти (TPGs), които са важни за качеството и стабилността на маслото.



Фиг. 4.8 Съдържание на общи хиперицини (HYPs,) флавоноиди (TFC) и общи пигменти (TPGs) в маслените извлеци

Хиперицин и неговите липофилни производни са открити във всички екстракти, но концентрациите остават ниски и не превишават 1 mg/100 g масло. Съпоставяне на получените данни с литературните може да се направи само за маслиненото масло, тъй като повечето от маслата са използвани за първи път за тази цел. Например, (Orhan et al. 2014) анализира 21 проби от традиционно приготвени и готови (търговски) мацерати и показва, че съдържанието на хиперицин варира между 0,3–2,4 $\mu\text{g g}^{-1}$, а на псевдохиперицин между 0,1–3,3 $\mu\text{g g}^{-1}$, като при някои масла преобладава псевдохиперицин, а при други хиперицин.

За да проверим зависимостта между степента на обогатяване с HYPs в получените екстракти и вида на маслото, е потърсена зависимостта между съдържанието на хиперицин в маслените извлеци и степента на ненаситеност (PUFA) като основен структурен параметър, който позволява да се разграничат моно-от полиненаситените масла с повече от една двойни връзки.



Фиг. 4.9 Зависимост между съдържанието на хиперицин в маслените извлеци и степента на полиненаситеност

Не се наблюдава никаква закономерност между повишаването на екстрахиращата способност и принадлежността на маслата към определена група. Измененията в маслено-киселинния състав води до близки по свойства HSPs и известно припокриване на областите на разтворимост. Сравнено с маслиненото масло (OL) като референт, общото съдържание на хиперицин и неговите липофилни производни при гроздовото (GS) и сусамено (SI) масло е приблизително еднакво, докато почти 2 пъти по-ниско съдържание на хиперицин се наблюдава в пробите от жожоба (JO) и ленено масло (FL) въпреки, че полиненаситеността варира от по-малко

от 1% при масло от жожоба (над 92% C20:1 и C22:1) до над 70% при ленено семе (C18:3).

Отчитайки минималната разлика в полярността на маслата (Фиг.4.6), вероятната причина за това несъответствие са различните физикохимични свойства на маслата, които се влияят от структурните характеристики в много по-висока степен от липофилността. Анализът на литературните данни показва, че има значителна разлика при вискозитета на маслата; като цяло той се покачва с повишаване степента на насищане и намалява с увеличаване дължината на веригата и броя на двойните връзки в мастните киселини. В същото време се наблюдава обратна тенденция по отношение на окислителната стабилност: окислението се извършва в двойните връзки, поради което най-бързо се окислява линоленовата киселина, следвана от линоловата и олеиновата. Очаква се полиненаситените масла като гроздовото семе (GS) да имат по-малко вискозна структура в сравнение с маслиновото (OL), което съответства на по-висок коефициент на дифузия, който може да улесни екстракцията, но и са по-податливи на окисление.

Различията могат да се обяснят и с приетото ограничение при теоретичния подход, който отчита приносите само на мастните киселини. Освен основните триглицериди, растителните масла съдържат и множество други липидни и нелипидни компоненти в малки количества, като моноглицериди, диглицериди, фосфолипиди, стероли, токофероли, багрилни вещества, восъци, някои от които са амфифилни и дори полярни. Макар и в малки количества имат важна роля за свойствата и стабилността на маслото, и съответно до различна ефикасност на екстракция и обогатяване с желаните компоненти.

Комбинираното действие на тези фактори прави всяка чисто теоретична прогноза чрез HSPs параметрите относно съвместимостта/заменяемостта на отделните видове масла само въз основа на МК състав неточна и трябва да бъде проверена експериментално с подходящи методи.

Изводи

Теоретично е възможно различни растителни масла да бъдат използвани като разтворители за получаване на маслени екстракти от жълт кантарион, но поради разлики във физико-химичните свойства и устойчивост на външни фактори (време, температура, светлина), методите и условията на екстракция трябва да бъдат адаптирани към повишаване стабилността на маслата и забавяне на реакциите на липидно окисление.

За първи път са използвани някои нетрадиционни масла за получаване на маслени извлеци по традиционната процедура. Показано е, че наред с най-използваните маслиново и слънчогледово масло, при използването на няколко други нетрадиционни масла (сусамово семе, гроздови семки, черно семе, бадеми, авокадо, бял синап, пшеничен зародиш, жожоба) при традиционната „слънчева“ мацерация е възможно да се получи мацерат, обогатен с малки количества целеви хиперидин и техните липофилни производни, едновременно с някои по-слабо полярни фенолни

антиоксиданти и растителни пигменти, за които се очаква да подобрят окислителната стабилност.

4.2.3 Предимства и ограничения при използване на параметрите на разтворимост

Определянето на параметрите на разтворимост на Хансен (HSPs) спомага да се намали емпиричният характер на избора на разтворител и да се обоснове влиянието на природата на разтворителя върху степента на разтваряне и извличане на екстрахируемите компоненти на базата на минимум първоначална информация - структурната формула на молекулите.

Подходът е полезен при предварителен избор на подходящи състави на смесени и многокомпонентни разтворители. Отклоненията между прогнозните и експериментални данни отразяват факта, че хипотезите на модела не са напълно изпълнени за изследваните реални системи, като например допускането за адитивност на междумолекулните взаимодействия при смесване. Линейна промяна може да се приеме в случай на сходни сили на взаимодействие между различните компоненти, например при растителните масла, докато е неприемливо при неидеални системи като водно-алкохолно разтвори. Освен това, те предсказват афинитета към изследваните вещества на база на чистите вещества, докато в природните суровини те съществуват под различни форми. Разтворимостта на съединения се определя не само от типа на използвания разтворител и неговата полярност, но и от взаимодействието им с други фитокомпоненти и образуването на неразтворими или разтворими комплекси. Освен това, при определяне на заменяемостта на разтворителите само сходството в HSPs не е достатъчно, тъй като често са несъвместими по своите физически свойства.

На база на проведеното теоретично и експериментално изследване, може да се обобщи, че полу-емпиричният подход на Хансен позволява с достатъчна достоверност да се разграничат разтворителите с най-високо /най-ниско сходство за дадено разделяне, което стеснява кръга на подлежащите на проверка разтворители.

При реални условия на екстракция от растителни суровини, взаимодействията на разтворителя и на разтворимото вещество с твърдата матрица значително се усложняват и високата разтворимост не винаги колерира с високата екстрахируемост, особено при прилагане на интензифициращи методи. Крайното решение следва да бъде обосновано и валидирано след експериментално изследване на екстракцията при различни условия, като се отчетат спецификите за всяка конкретна система.

4.3 Охарактеризиране на изходната суровина

Тревистите цъфтящи суровини като жълт кантарион, при които се използва цялата надземна маса (цветове, цветни пъпки, листа, стъбла, семена), предполагат сравнително не сложна предварителна обработка, но затрудненията са свързани с осигуряване качеството на билката и съгласуваността между партидите. Това е поради факта, че биосинтеза на фитокомпонентите в отделните органи и тъкани не е равномерно и не е възможно поддържането на едно и също ниво на разпределение на отделните структурни елементи.

В тази връзка е направен анализ за степента на променливост (границите на изменение) в растителната маса и съдържанието на основни вторични метаболити в отделни етапи в подготовката на суровината – сортиране, сушене, раздробяване/смилане, всеки от които трябва да осигури минимална загуба на биологично активни вещества.



Фиг. 4.10 Външни морфологични белези за *Hyperici Herba* и локализация на тъмните маслени жлези (диагностичен белег) (a): общ вид - стрък и съцветие; b) лист ; (c): стъбло d): цветни пъпки e); типичен пълен цвят (f) тичинки

- *Изследване на показателите, които определят качеството на суровината*

Автентичността на събраните диворастящи растения е определена по характерните ѝ външни белези (фиг. 4.10), а при определяне качеството сме се съобразявали с действащата у нас European Pharmacopoeia 9.0. Категоризирането на билката *Hyperici herba* като фармакопейно растение е на база общо съдържание на хиперицин, което трябва да е не по-малко от 0.08 мас.% ($\geq 800 \mu\text{g/g}$ суха маса билка). Сухият екстракт, когато се използва в регистрирани билкови лекарства, трябва да съдържа общи хиперицини минимум 0.1 – 0.3% ($\geq 1000 - 3000 \mu\text{g/g}$, определени в сух екстракт) и не по-малко от 6% флавоноиди изразени като кварцетин. Тези спецификации на фитопродуктите са предназначени преди всичко да гарантират нейното качество и автентичност, а не тяхното пълно охарактеризиране. Понастоящем няма конкретни ограничения за употребата на жълт кантарион в козметични препарати и хранителни добавки, освен предупреждението, че са възможни взаимодействия с други лекарства и при излагане на слънце след приема му.

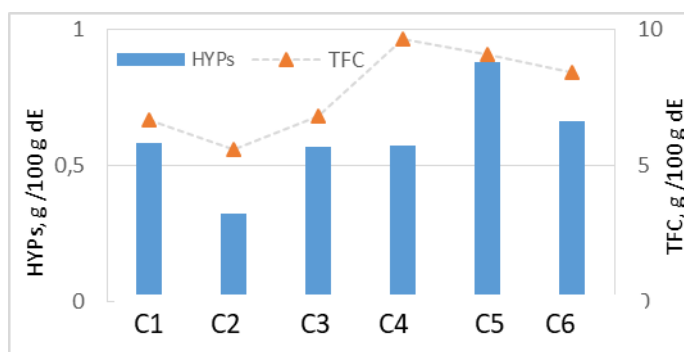
Изследвани са две групи суровини: две партии, закупени от търговската мрежа (C1-C2) и други четири (C3-C6), събрани от естествени местообитания растения с различен произход и фази на цъфтеж. Определено е съдържанието на основни метаболити в цялата надземна маса (трева) и в отделни растителни части (листа, стъбла, цветни пъпки и цветя). Показани са два ключови елемента, които допринасят за променливия количествен състав на получената билка от дадена суровина: локализацията на хиперицин в малки черни мастни жлези (100-300 μm), разположени основно в репродуктивните части и по повърхността на листата, които лесно се оронват и разпиляват на всеки етап от първичната обработка и удълженото стебло, обикновено дървесна структура в основата, което може да достигне до 60-80 cm и увеличава общата маса, без да допринася съществено за съдържанието на активните компоненти.

Важна особеност на хиперицин и неговите производни е тясната връзка между тяхната локализация и функциите, които изпълняват. За разлика от повечето природни фототоксини, които се активират предимно в увреждащото UV-B лъчение (280-320 nm), хиперицин се активира и във видимия спектър между 540 и 610 nm. Локализацията на този флуоресциращ пигмент по външната повърхност в горните

надземни части се явява защитен механизъм срещу тревопасни животни и други патогенни или насекоми.

- Сравнение между отделните растителни суровини

Началното съдържание на основни групи БАВ и общи екстрактивни вещества е определено чрез мацерация със 75% EtOH в продължение на 72 h при стайна температура, съгласно процедурата, дадена от ЕМА и препоръките на Европейската Фармакопея. Както се вижда от представените данни на Фиг. 4.11, тестваните суровини показват различия в съдържанието на двата ключови маркера.



Фиг. 4. 11 Съдържание на целевите общи хиперицини (HYPs) и флавоноиди (TFC) в изследваните суровини (спрямо сухото вещество на екстракта)

Показана е важната роля на стандартизирането на използваемата надземна част на билката, което позволява да се постигнат минималните изисквания за качеството на билката. Независимо от различията в регионалните и локални климатични условия през отделните години, и четирите събрани суровини (C3-C6), подготвени съгласно правилата и изискванията за събиране и първична преработка на билката, както и закупените (C1-C2), отговарят на фармакопейните изисквания за минимално съдържание на химичните маркери.

При спазване на изискването да се използват само цветоносни стъбла не по-дълги от 30 cm и да не присъстват повече от 3% стъбла с диаметър по-голям от 5 mm, инертният материал, който трябва да се отстрани, достига до 25% от събраната растителната маса, при което относителната част на цветната фракция в сместа се увеличава за сметка на зелената фракция. Това от своя страна води до силна зависимост на екстрахируемите компоненти от процентното участие на отделните части на растението, като цялата използвана част измества съдържанието на хиперицин и флавоноиди (в посока понижаване) и само на горните облистени части (в посока повишаване). Тази тенденция е много добре изразена в пробата C5, която количествено доминира над останалите, поради най-висок дял на цветната фракция (48%), където са разположени над 80% от активните компоненти.

По този начин фитохимичният профил може да се модулира или променя в определени граници, като предопределя по-силното или по-слабо действие на получените екстракти, и съответно тяхното приложение. Цялата надземна маса може да бъде подходяща за екстракти например за производство на козметични продукти, където е приемлива по-ниска концентрация на активни компоненти, докато ако са

предназначени за лекарствени растителни продукти, е необходимо използването на суровина с по-голям процент цветове и листна маса, за получаване на екстракти с подходящо количество целеви компоненти.

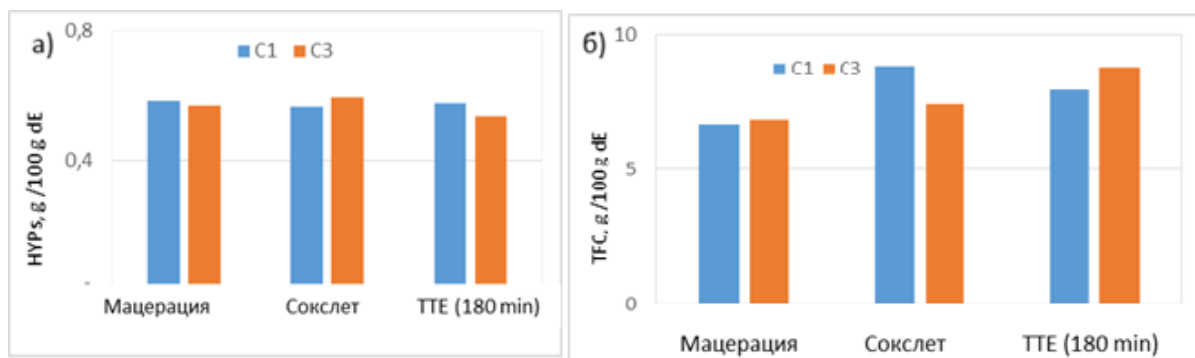
- *Влияние на начина на екстрахиране при определяне началното съдържание на комплекса БАВ в суровината.*

За оценка общото съдържание на хидрофобни (неполярни) и хидрофилни (полярни) съставки е проведена и екстракция със Сокслетов апарат с различни разтворители: хексан, 96% етанол и дестилирана вода, като екстракцията с 96% етанол е проведена директно и след отстраняване на липофилната фракция. За сравнение е проведена и твърдо-течна екстракция с разбъркване (ТТЕ) с 75% етанол при същото съотношение билка: разтворител (1:12.5) при стайна температура в продължение на 180 min. Измерените количества са сравнени при една от закупените (С1) и една прясно събрана суровина (С3).

Независимо от използваната суровина, преобладават хидрофилните съединения с умерена полярност, получени при екстракция с 96% етанол (68%), следвани от тези с по-изразена полярност (24%), които се извличат с вода, докато липофилните, които се разтварят в летливи разтворители като хексан са относително малко (8%). Хиперицин е отчетен само във водно-етаноловите екстракти, където е и по-високо съдържанието на общи нефлавоноидни и флавоноидни съединения. Сумарно полярните разтворители показват над 90% добиви, което показва наличието на много съпътстващи и баластни вещества (полизахариди, протеини, въглехидрати), които могат да се извлекат от суровината. Предварителната екстракция с неполярен разтворител позволява отстраняване на липофилната фракция (въглеводороди, восъци, смоли, мазнини, фотосинтетични пигменти), което дава възможност за концентриране на хиперицините в екстракта и намалява етапите на допълнително пречистване.

Тези традиционни методи с етанол и етанол-вода позволяват висок добив на сух екстракт между $20 \pm 8.6\%$. Сокслет екстракцията с етанол повишава добива на екстрахируемите компоненти между 15-20% спрямо мацерацията за 72 h със 75% етанол на стайна температура. Основният проблем при изолирането на БАВ при температури на кипене или близки до тях за продължително време и влошаване качеството на екстракта, дължащи се извличане на баластни вещества

Екстрактите, получени с методите за статична екстракция (съгласно изискванията на фармакопейните статии) и тези с ТТЕ за 180 мин се различават малко един от друг по отношение на съдържанието на целевите хиперицини и флавоноиди в сухия екстракт и при двете суровини, както е показано на Фиг. 4.9. Това се дължи на по-голямото количество целеви компоненти и на по-малкото количество получен екстракт.



а/ общи хиперицини (HYPs)

б/ общи флавоноиди (TFC)

Фиг. 4.12 Съдържание на целевите компоненти в екстрактите, получени с различни методи

Въпреки че извлича по-малки количества от активните вещества, мацерацията е предпочитана като по-умерен метод за определяне на началното количество на екстрахируемите вещества в суровините, а отработената суровина след еднократната екстракция може да бъде използвана за многократни цикли с един същ или различни разтворители, за да се подобри ефективното използване на растенията.

Изводи

Получените данни потвърждават становището, че променливостта в състава на специфични активни вещества в растителните екстракти само отчасти може да се отдаде на произхода и генетичната хетерогенност на изходните суровини, съставът и стабилността на получените продукти до голяма степен се дължи на различия в начина и условията за обработка на растителния материал.

Тъй като специфичната група активни вещества в жълтия кантарион е хиперицин и неговите изомери (HYPs), именно за тези вещества е препоръчително да се извърши окачествяването на суровина. Ниската концентрация и чувствителност по отношение на температурата и особено на светлината е причината за търсене на подходящи екстракционни режими, така че да се извлече възможно максимално количество от екстрахируемата компонента като същевременно се запази структурата и биологичната активност на ценните съставки непроменени.

4.4 Изследване влиянието на методите и условията на екстракция в различни екстракционни системи

Конвенционалните методи за екстракция (мацерация, Сокслет екстракция) са лесни за изпълнение и не изискват скъпо оборудване, но изискват дълъг период от време (от няколко часа до няколко седмици), тъй като се затрудняват от ниската температура и липса на разбъркване. Недостатък е ниският добив на екстрактивни и активни вещества (непълна екстракция) или висок добив на екстрактивни и нисък добив на активни вещества (неселективна екстракция). Традиционната мацерация на растителни масла при естествени условия под въздействието на променливи външни фактори (интензитет на ултравиолетовите лъчи, дневни и нощни температурни

колебания) не може със сигурност да задоволи изискванията за възпроизводимост на състава на маслените мацерати.

В тази връзка целта на проучването е да се изследват възможностите на ултразвуковата екстракция за увеличаване на добива и чистотата на хиперицин и намаляване продължителността на процеса на извличането му от спрямо конвенционалните техники.

4.4.1 Ефективност на екстракцията с водно-алкохолни разтворители

За извличане на биологично активни вещества от жълт кантарион и обогатяване на екстрактите са използвани няколко метода за екстракция, условията за които са представени в Таблица 4.1. Изследванията са проведени в 4 варианта: Вариант 1 - мацерация без разбъркване; Вариант 2 - клатачна машина при 180 разклащания/мин, Вариант 3 - електромагнитна бъркалка при 400 rpm и Вариант 4 – УЗ вана, самостоятелно или комбинирано с механично разбъркване и нагряване, в продължение на 15 до 45 min. Променяни са концентрацията на етанол (EtOH) и глицерол (GLY) и съотношението твърдо: течност ($R_{S/L}$) е варирано от 12.5 до 100 $g\text{mL}^{-1}$ (1:12.5, 1:25, 1:50, 1:100), като при повечето опити е 1:12.5 (8 g суровина на 100 ml екстракционен разтворител). Екстракцията е проведена в три различни температурни режима: стайна температура ($20\pm 2^\circ\text{C}$), умерена (45°C) и повишена температура до максималната работна температура на УЗ-вата вана ($60\text{--}75^\circ\text{C}$). Трябва да се отбележи, че лабораторната вана, използвана в настоящото изследване е с постоянна честота (36 kHz) и мощност (100 W) и температурата е единственият параметър, който може да се контролира сравнително точно чрез терморегулатора.

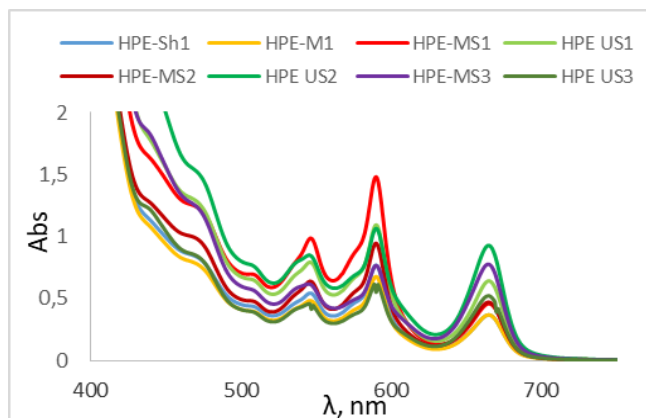
Таблица 4.1 Получени екстракти, метод на извличане и условия на процеса за получаване на водно-алкохолни екстракти (HPE)

Означение	Разтворител	Методи	Температура	Продължителност
HPE-M1	75% EtOH	Мацерация	$22\pm 3^\circ\text{C}$	45 min
HPE-M2	50% GLY	Мацерация	$22\pm 3^\circ\text{C}$	24 h
HPE-M3	20% GLY	Мацерация	$22\pm 3^\circ\text{C}$	45 min
HPE-M4	20% GLY	Мацерация	$22\pm 3^\circ\text{C}$	24 h
HPE-Sh1	75% EtOH	Клатачка	$22\pm 3^\circ\text{C}$	45 min
HPE-Sh2	20% GLY	Клатачка	$22\pm 3^\circ\text{C}$	45 min
HPE-Sh3	50% GLY	Клатачка	$22\pm 3^\circ\text{C}$	45 min
HPE-MS ₁₋₃	75% EtOH	Магн. б-ка	$22\pm 3^\circ\text{C}$	45 min
HPE-MS4	20% GLY	Магн. б-ка	$22\pm 3^\circ\text{C}$	45 min
HPE-MS5	50% GLY	Магн. б-ка	$22\pm 3^\circ\text{C}$	45 min
HPE-US ₁₋₃	75% EtOH	US+механично разб.	$25\pm 3^\circ\text{C}$	15 +30 min
HPE-US ₄₋₆	75% EtOH	US+механично разб.	$45\pm 3^\circ\text{C}$	45/30/15 min
HPE-US ₇₋₉	75% EtOH	US+механично разб.	$75\pm 3^\circ\text{C}$	45/30/15 min
HPE-US ₁₀₋₁₂	20% GLY	US+механично разб.	$25\pm 3^\circ\text{C}$	45/30/15 min
HPE-US ₁₃	50% GLY	US+механично разб.	$25\pm 3^\circ\text{C}$	45 min

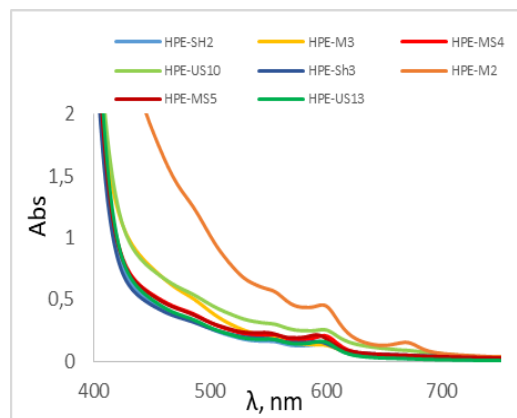
HPE (*Hyperici Herba Extract*); M (мацерация); Sh (клатачка) MS (електро-магнитна бъркалка); US (екстракция, с УЗ)

Съпоставката на спектрите на получените екстракти във видимата област показва ясно възможностите за управление на процеса чрез промяна на факторите, влияещи върху екстракцията - температура, хидродинамичен режим, интензификация чрез УЗ, както и кратността на екстракция – еднократна и многократна екстракция (Фиг. 4.13 и 4.14). В

зависимост от начин на водене на процеса, съдържанието на НУРs може да варира повече от 300%, независимо че беше премахната променливостта на суровината (една и съща партида С1).



Фиг.4.13 UV-Vis спектри на екстракти със 75% етанол при различни условия на водене на процеса



Фиг.4.14 UV-Vis спектри на екстракти в системата 20-50% глицерол при различни условия на водене на процеса

За да се интерпретира по-добре въздействието и ефектите на основните фактори, които могат да повлияят върху добива и селективността на екстракцията, бяха проведени сравнителни изследвания и анализ на експерименталната кинетика.

- *Кинетично изследване върху твърдо-течна екстракция*

Проведени са кинетични експерименти и са показани особеностите на кинетичните характеристики при различни екстракционни условия. Получените опитни данни са описани с модела на So and Macdonald, отчитащ два етапа в кинетиката на екстракция:

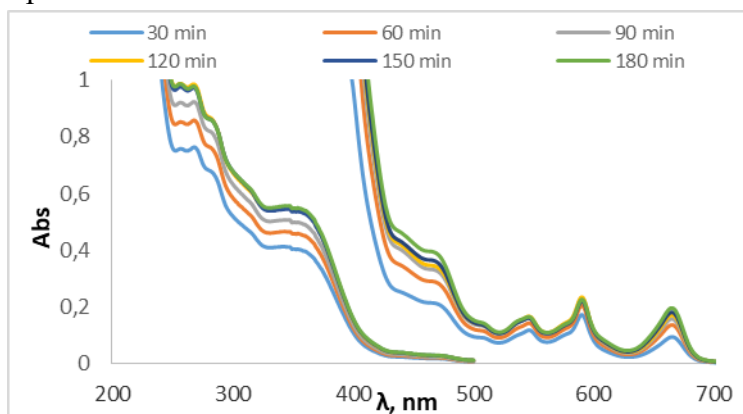
$$Y(t) = 1 - [F \exp^{-k_w t} - (1 - F) \exp^{-k_d t}] \quad (4.5)$$

където $Y(t)$ е количеството екстрахируема компонента, извлечена от твърдата фаза за време t спрямо началното съдържание в суровината, F е фракцията на леснодостъпните за екстракция компоненти, t е времето за екстракция, k_w и k_d - скоростни константи от първи род, описващи бързо и бавно освобождаваната фракция (min^{-1}). В дисертацията в таблици са обобщени съответните параметри на линейна регресия за изследваните варианти на екстракция.

- *Влияние на продължителността на екстракция върху степента на извличане на целевите и съпътстващи компоненти*

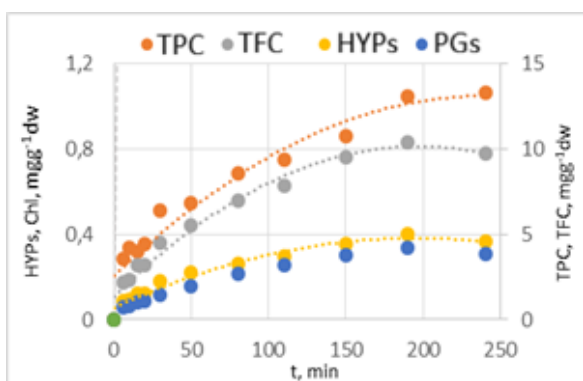
Поради многокомпонентния характер на екстрактите, съдържащи компоненти с много ниско и такива с високо съдържание, е проследено изменението на концентрацията на основните групи съединения в екстракта с течение на времето и отделно общото количество екстрахируеми компоненти (ТЕС). Като пример е посочена екстракцията, проведена на клатачна машина при следните условия: суровина със среден размер 1.25-2.00 mm; разтворител – 75 % EtOH; хидромодул 12.5 ml.g^{-1} (8 g билка на 100 ml екстрагент), температура $22 \pm 2^\circ\text{C}$, продължителност до 4 h. Проби от анализиранияте разтвори на определени времеви интервали (0, 30, 60, 90, 120 и 180 min)

са снети и са записани съответните UV/Vis спектри. На Фиг. 4.15 са представени абсорбционните спектри, снети при разреждане DF 1:160 и 1:10 съответно в УВ и във видимата спектрални области.

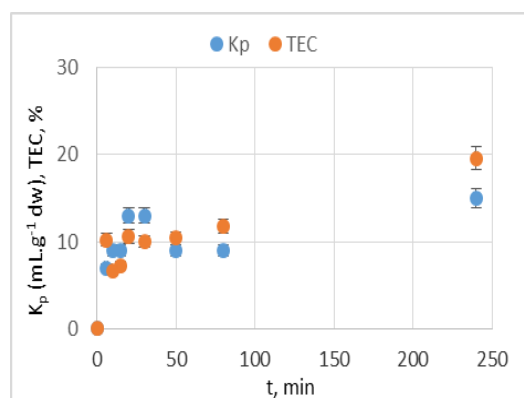


Фигура 4.15 UV-Vis спектри на екстракти с 75% етанол като функция на времето
($d_p = 1.25-2.00$ mm; $R_{S/L} = 12.5$ g.mL⁻¹; T=22±2°C)

Кинетичните криви на отделните изследвани класове, общи хиперицини (HYPs) полифеноли (TPC), флавоноиди (TFC) и пигменти (PGs), както и изменението във времето на пропития разтворител от единица маса суровина (K_p) и на общите екстрахируеми компоненти (ТЕС) са представени на Фиг. 4.16 и 4.17.



Фигура 4.16 Изменение на съдържанието на основни групи БАВ с увеличаване на времето



Фигура 4.17 Изменение на степента на пропитване на разтворителя (K_p) и общия екстракт (ТЕС) с увеличаване на времето

В хода на изследването се сблъскахме с високата хигроскопичност на изсушения растителен материал. Отчетено е, че част от течността (10-15%) след екстракция винаги се задържа от растителния материал и нараства в приблизително еднакви граници с количеството ТЕС, което води до постепенно намаляване на стойността на съотношението суровина-разтворител $R_{S/L}$. Това е нежелателно, тъй като загубата на активни съставки е пропорционална на количеството течност, останала в суровината. Чрез изстискване на обработената суровина тези загуби могат да бъдат донякъде намалени, но не могат да бъдат напълно елиминирани, тъй като под въздействието на капилярните сили част от екстракта винаги остава в растителния материал.

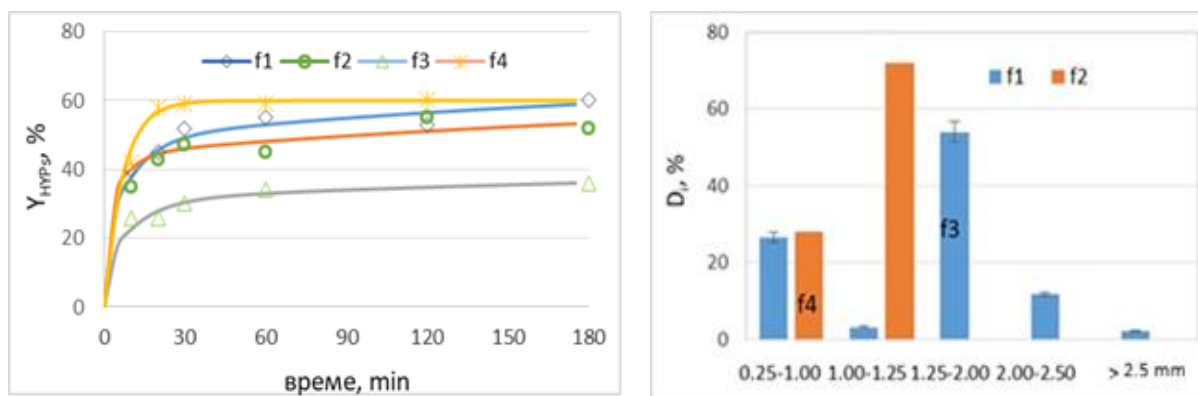
В същото време отделните групи съединения показват различна кинетика на екстракция в зависимост от тяхната разтворимост в екстракционния разтворител и колко силно са адсорбирани или физически свързани в матрицата на пробата. Установено е, че за полифенолите (ТРС), които присъстват в значителни количества, се наблюдава нарастване на концентрация с увеличаване на времето, а за други това не води до значително увеличение на добива. Към втората група се отнесат общите хиперицини, за които увеличение на времето след около 60 min води не повече от 20% повишение на концентрация, дори намалява към края на процеса. Може да се предположи наличие на обратен процес - десорбция на вече извлечените компоненти от стеблената фаза, която има само следи от хиперицин.

Повишаването на добива $Y_{НУРС}$ чрез увеличение времето на екстракция не считаме за нецелесъобразно, защото по-краткотрайно екстрахиране дава възможност до известна степен да се контролира съотношението между отделните групи БАВ и да се осигури по-добра селективност по отношение на нискомолекулните компоненти. Следователно при тези условия 60 до 90 min контакт е достатъчното време за екстракция, което осигурява максимално добро извличане на целевите компоненти при минимален тотален екстракт.

- *Влияние на фракционния състав на суровината*

В следващата серия експерименти е изследвано влиянието на смилането и пресяването на изходната суровина върху скоростта и степента на екстракция. За тази цел закупената грубо смляна суровина (С1) беше разделена чрез ситов анализ на фракции с размери в интервала между 0.25 и 3.0 mm и е определено разпределението по размери. За получаване на по-еднородна смес, фракциите на по-едрите частици над сито 1.25 mm бяха подложени допълнително двукратно последователно смилане и пресяване. Така са обособени две фракции с размери 1.00-1.25 mm и 0.25-1.00 mm, в съотношение около 80% и 20%. Събирането на отделените смилани пресявки в обща фракция съответства на нормите за много груба прах (1 mm сито съгласно Ph.Eur).

Сравнени са четири кинетики при различен гранулометричен състав: f1: закупената нефракционирана билка с размери в интервала между 0.25-3.00 mm; f2: смес от цялата надземна част, получена при допълнителното смилане/пресяване; f3: фракцията 1.00 -1.25 mm с максимално присъствие в нераздробената билка (~55%); f4: фракция 0.25-1.00 mm с най-малък размер. Кинетичните криви, получени с 75% EtOH при стайна температура, R_{SL} от 12.5 gml⁻¹ и продължителност до 3 h са представени на Фиг. 4.22.



Фиг. 4.18 Кинетични криви при екстракция на хиперицин за нефракционирана и фракционирана суровина

След стръмния начален ход кривите се разделят и достигат до различни стойности за Y_{HYPs} при различни времена, в зависимост дали се използва фракционирана или нефракционирана суровина. Положителният ефект от намаляване размера на твърдата фаза при постоянство на останалите параметри обикновено се свързва с увеличаване на контактна повърхност, скъсяване на пътя на дифузия и частично разрушаване на клетъчните структури, което улеснява достъпа на екстрагента, ускорява разтварянето на целевите компоненти и повишава добива.

Наблюдаваните ефекти в този случаи са свързани до голяма степен с нееднородността на растителния материал както по размер, форма и структура, така и по съдържание на екстрахируеми вещества. Това води до диференцирано разпределение на биоактивните компоненти в зависимост от размера на частиците. Фините частици, преминаващи през сито $< 1,00$ mm, представляват основно груби прахове на листата и цветовете на жълтия кантарион, докато при по-грубата степен на раздробяване във фракцията попадат раздробени стебла, които са бедни откъм съдържание на целевите компоненти. Така използвайки материал от едно сито (фракция с определен размер), може да се получат проби със завишено съдържание на целевите компоненти (при малките частици) или занижено (при по-големите частици).

Най-нисък добив е получен с преобладаващата фракция от ситовия анализ (f3), докато при фракцията с най-малките частички (f4) степента на екстракция се е увеличила над 60 %, което отговаря на $0.732 \text{ mg g}^{-1} \text{ dw}$, като изисква не повече от 30 min. Това показва, че при пресяването основното количество HYPs е концентрирано в прахообразната фракция f4, съставена предимно листа и цветове с малките тъмни жлези с хиперицин. Тя би могла да се използва за получаване за концентриране на хиперицин в екстрактите, но това би нарушило естественото съотношение на отделните съставки, присъщо на изходната суровина.

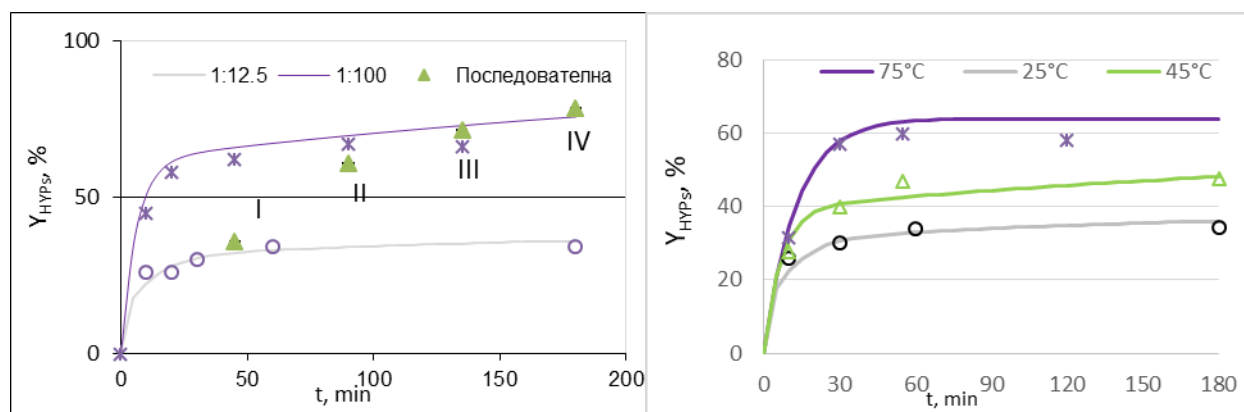
За да се избегне това, е необходимо да се използва цялата надземна маса, по-грубо или по-fino раздробена. Двете смесени фракции, въпреки че имат еднакъв среден размер от около 1.0 mm, но различно разпределение на частиците по размер, показват различна кинетична ефективност. По-стръмният характер в началото и по-разлетият ход в края на кинетичната крива доказва бързи дифузионни процеси в началото, със сходни скоростни константи и бавно достигане на равновесие. За

нееднородни системи с различни по размер и форма частици (фракция f3) е необходимо по-дълъг период на екстракция.

Често за аналитични цели даден растителен продукт, подложен на екстракция, е подложен на фино смилане, за да се осигури възможно най-ефективно извличане. На практика това затруднява филтруването и увеличава извличането на баластни вещества. В промишлени условия обикновено се използва по-грубо раздробена суровина с доста по-широки интервали на размерите с цел по-пълно оползотворяване на суровината, избягване на прекалена употреба на енергия и разпрашаване при смилане на растителните суровини.

- *Влияние на работните параметри на екстракция*

Следващите експерименти са проведени при промяна на съотношенията твърдо вещество към разтворител ($R_{S/L}$) и на температурата, като основни параметри, които могат да повлияят на скоростта и степента на извличане. На Фиг. 4.19 и 4.20 са сравнени кинетичните криви, получени при следните условия: фракционирана суровина със среден размер 1.25-2.00 mm; разтворител – 75 % етилов алкохол, продължителност до 3 h.



Фиг. 4.19 Влияние на съотношението билка:разтворител и последователна екстракция **Фиг. 4.20** Влияние на температурата

За да се наблюдава влиянието на промяната в градиента на концентрацията с увеличаване на съотношението билка към разтворител, са проведени опити при съотношение от 1:12.5 до 1:100, при който съгласно предварителните експерименти се получава максимална степен на екстракция на хиперицин. Тези кинетични криви са сравнени с последователна екстракция (I - IV етап), като разтворителят се сменя на всеки 45 min, без междинно изсушаване на суровината, което води до изразен степенен характер на натрупване на НУРs в екстракта. При съотношение суровина-разтворител 1:12.5 са необходими поне 3-4 последователни екстракции за постигане на 99% добив спрямо разреждане 1:100. Както се вижда, още на III-та екстракция (1:37.5) вече се получават сходни резултати, а двустепенната екстракция (1:25) може да се счита за приемлива от гледна точка на разхода на разтворител.

Съотношения над 1:50-100, макар и приемливо за аналитични цели, е неподходящо за екстрахиране на целевите компоненти в по-големи количества. В промишлени условия екстракция се извършва при по-ниски съотношения (1 : 6-7), за

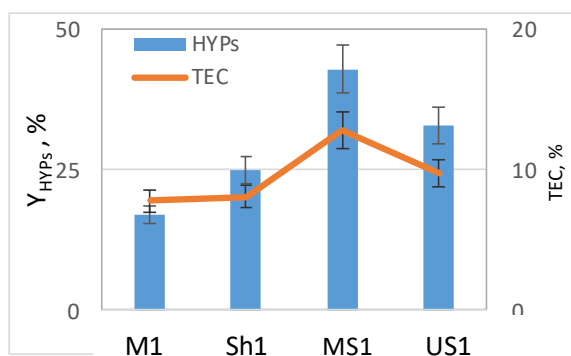
да се избегне значителното разреждане. Затова е запазено съотношението R_{SL} от 1:12-13 g суровина/ml разтворител), което е подходящо за получаване на обогатени на хиперицин екстракти при по-ограничен обем на екстрагента.

От представените кинетични криви на Фиг. 4.20 ясно се вижда положителният ефект от повишаване на температурата за съкращаване екстракционните времена и консумацията на екстрагент. При провеждане на екстракцията при 60°C на края на линейния етап на кинетичната крива при около 45 min се получава близо 50% увеличение на степента на екстракция. Наблюдаваните зависимости могат да се обяснят от една страна с ефекта на температурата върху разтворимостта на целевото съединение, и от друга – с увеличаването на дифузионния коефициент. При по-високи температури (> 60°C) се създава предпоставка за разпадане на някои нестабилни компоненти и включването на допълнителни технологични стъпки по тяхното пречистване.

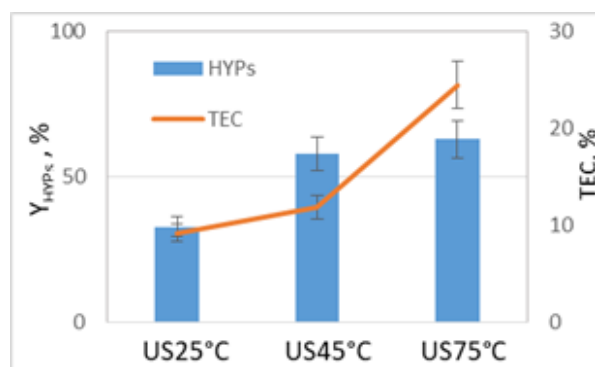
Въпреки, че при повечето експерименти е отчетен втори етап на бавна екстракция, продължителност на екстракцията между 45-60 мин, температура от 45-60°C при използване на цялата суровина с по-тясно или по-широко разпределени среден размер около 1 мм може да се считат за подходящи условия за провеждане на процеса. При това раздробяване ще се запази клетъчната структура на суровината, извличането ще се забави, но полученият екстракт ще съдържа по-малко примеси и ще се пречиства по-лесно.

- Сравнение на ефективността на ултразвуковата и традиционна екстракция

За да се оцени влиянието на ултразвуковата обработка като фактор за интензификация на екстракцията, са сравнени няколко варианта при използване на различни източници за внасяне на енергия - механично разбъркване, загряване и УЗ-ва енергия. Проследена е зависимостта на добива хиперицин (Y_{HYPs}) и общи екстрактивни вещества (ТЕС) при следните параметри на процеса: време за екстракция 45 минути, съотношение твърда фаза към разтворител 1:12.5. Получените обобщени резултати са показани на Фиг. 4.21 и 4.22.



Фигура 4.21 Степен на извличане на хиперицин (Y_{HYPs}) и общ екстракт ТЕС (%) при различни методи



Фигура 4.22 Степен на извличане на хиперицин (Y_{HYPs}) и общ екстракт ТЕС (%) при комбиниране на УЗ и нагряване

Резултатите ясно демонстрират значението на начина и интензивността на разбъркване върху степента на извличане на хиперицин и другите екстрактивни вещества. Степента на екстракция на хиперицин УНУРs с ултразвук при стайна температура (US1) нараства с 20-30% спрямо мацерацията (M1) и разбъркване с клатачка (Sh1), но остава по-ниска (~36%) в сравнение с разбъркването с магнитна бъркалка (MS1). Предварително е установено, че увеличаването на скоростта на разбъркване при MS1 над 400 rpm не води до съществено увеличение на добивите, външното дифузионно съпротивление може да се пренебрегне и следователно разтворителят (75% етанол) дифундира много бързо към растителните частици. Подобрените условия на масопренос в течната фаза при MS1 обаче улеснява извличането на нецелеви съединения и това слабо намалява чистотата на НУРs в екстракта (4.17mg g⁻¹ dE) спрямо тази при US1 (4.43 mg g⁻¹ dE).

Комбинирането на УЗ-вото въздействие с повишена температура също има противоположен ефект върху общата ефективност на процеса (Фиг.5.10). Степента на извличане на НУРs при 45°C нараства с 78.7% спрямо 25°C, но при 75°C тоталният екстракт рязко нараства почти два пъти при по-малко от 10% увеличение съдържанието на хиперицин. В резултат чистотата на екстракта при 75°C (3.19 mg g⁻¹ dE) намалява спрямо тази при 45° (6.05 mg g⁻¹ dE), но пък добивът е по-нисък. В конкретния случай на жълт кантарион, подобрената селективност под въздействието на УЗ при 45°C може да се свърже с ерозията на маслени жлези, разположени по повърхността на цветовете и листата, където е локализиран хиперицин и неговите производни. Това подобрява достъпа на разтворителя до хиперицин и разтварянето и извличането му протича по-бързо спрямо другите компоненти.

При провеждане на екстракцията само под УЗ- въздействие, се наблюдава повишаване, но не и значима промяна на добива и не оправдава първоначалните ни предположения, че ще подобри ефективността и селективността на екстракция. Нарастването на добива на екстрахираните НУР е под 10%, когато системата се нагрява до 45°C : $Y_{НУРs}$ се повишава с 58% спрямо 53% без прилагане на ултразвук.

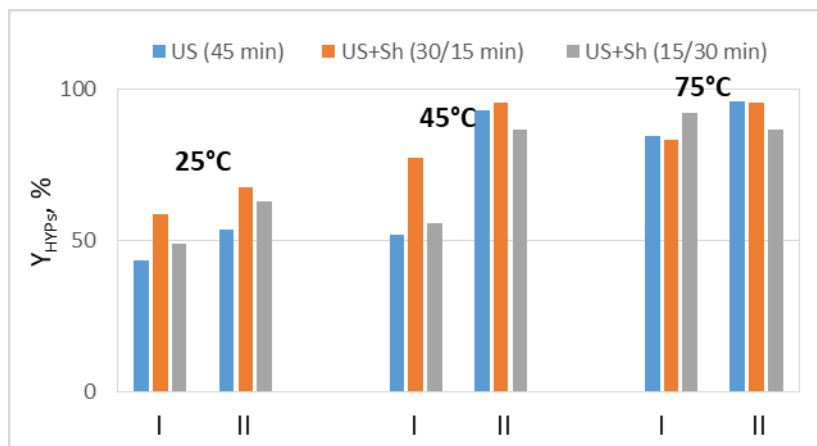
Причини за този умерен ефект могат да бъдат:

- Недостатъчно смесване на фазите и затихване на УЗ поле поради високото присъствие на дисперсната твърда фаза ($R_{S/L} < 1$: 10-12);
- Ниската интензивност на ултразвуковата енергия в използваната УЗ вана, в която кавитационният ефект не е достатъчно разрушителен и действа само върху повърхностния слой на растителната матрица.

Забелязва се, че хомогенизирането се усложнява поради нееднородния състав на билката, съдържаща различни части на растението с различна плътност. По-леките части (листа, цветове) изплуват на повърхността, а по-тежките се наслояват на дъното на центрофужните епруветки и част от материала е извън активните зони на УЗ-вото поле. Наблюдава се по-плътено сбиване на частиците и блокиране на тяхната повърхност с други частици. Това показва, че смесителните ефекти, генерирани от разпространението на УЗ в течната среда не са достатъчни и е необходимо допълнително разбъркване за интензификация на масообмена.

- *Комбиниране на УЗ екстракция с механично разбъркване и нагряване*

Изследвахме възможността за по-краткотрайно приложение на УЗ и нагряване в началото на процеса (15-30 min) като предварителна обработка за улесняване скоростта на пропиване и последващ конвенционален метод за разбъркване. На Фиг. 4.23 са представени резултатите за степента на екстракция (Y_{HYPs}) с обща продължителност от 45 min само с ултразвук (HPE-US1) и комбинацията УЗ (30 min)+15 min разбъркване (HPE-US2) и 15 min УЗ + 30 min разбъркване (HPE-US3). Направено е и сравнение с ре-екстракция при температури от 25-45-75°C.

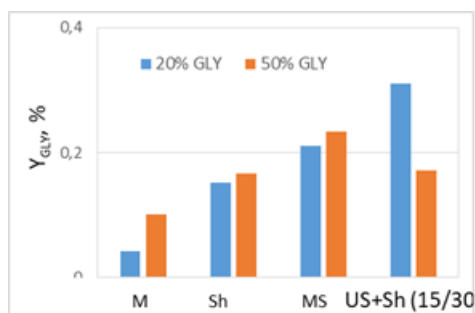


Фиг. 4.23 Комбиниране на УЗ екстракция с механично разбъркване при различна продължителност на ултразвуковото въздействие при 2 последователни екстракции

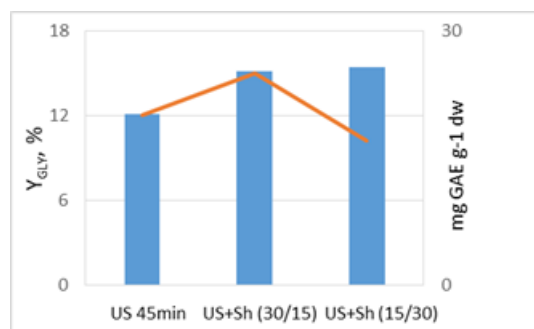
Комбинирането на етапите при изследваните варианти води до променливи резултати в зависимост от температурата, като комбинацията от US+Sh, 15/30 min показва подобрене на добивите. Може да се предположи, че приносът на УЗ към цялостния процес на екстракция е по-благоприятен в началото на процеса, подобрявайки проникването на разтворителя в клетъчните структури, последвано от разтваряне на по-достъпните съединения (ефект на измиване). Вероятно поради доброто пропиване на разтворителя, комбинираният ефект на УЗ с механично разбъркване и умерена температура при ре-екстракция (2 x 45 min) осигурява съпоставим с фармакопейния вариант за мацерация за 72 часа.

Потвърдено е, че повишаването на температурата над 45°C при използване на УЗ поле дори и при краткотрайно прилагане от 15 min не води до подобряване на добива. Повишаването на температурата може да има както положителен ефект – повишаване на дифузията и разтворимостта, така и отрицателен ефект – намаляване въздействието на УЗ поле поради намалената електро-акустична конверсия.

Влиянието на ефективността на метода на екстракция при смяна на разтворителя е показано при използване на 20 и 50% глицерол. Степента на екстракция е изчислена спрямо мацерация за 72 h с 20% и 50% глицерол. Резултатите при различни условия са представени на Фиг. 4.24 и 4.25.



Фиг. 4.24 Сравнение на различни методи екстракция с 20-50 % GLY



Фиг. 4.25 Резултати с 20% GLY в УЗ вана с механично разбъркване при 25°C

Резултатите за степента на извличане на НУРPs потвърждават тенденцията, че разбъркването на системата е важно за осигуряване на по-добър контакт между фазите и елиминиране градиентите на концентрацията и температурата. Дори ниски скорости на разклащане (180 rpm) при клатачната машина позволява да се увеличи добива. Относителното подобряването на екстракцията на хиперицин и неговите производни при преминаване от 20% до 50% глицерол при конвенционалните методи на разбъркване може да се дължи на намаляване полярността на разтворителя, но в същото време нараства вискозитета на сместа, което възпрепятства не само дифузионния масопренос, но и въздействието на ултразвуковото поле. С това може да се обясни и намаляването на добива при 50% спрямо 20% при използване на комбинацията (US+Sh, 15/30 min). Замяната на вида на едновалентния алкохол (етанол) с тривалентния глицерол, води до повишаване на хидрофилността на извлечените компоненти. Както се вижда от Фиг. 4.13 и 4.14, формата на спектрите на екстрактите с 75% етанол се различава съществено от този на водно-глицероловите екстракти със значително по-високото съдържание на нафтодиандроновите (590 ± 2 nm) и други съпътстващи пигменти (~ 640 nm). Като по-полярен разтворител от етанола, водно-глицероловите смеси извличат з по-полярните феноли и флавоноиди, които достигат над $20 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ dw}$ при 20% глицерол, но е по-инертен по отношение на липофилната фаза.

Въпреки отчетеното подобрене върху екстрахиращата способност на водно-глицероловите екстрагенти при някои условия на водене на процеса, то не може да компенсира разликата в относителната полярност спрямо хиперицин и много малки количества се прехвърлят в екстракта в сравнение с 75% етанол.

4.4.2. Ефективност на екстракцията с растителни масла

Екстракцията за извличане на липофилната фракция с растителни масла беше проведена при сходни условия, представени в Таблица 4.2. Използвани са съцветията от суровината С5, с най-високо съдържание на активни вещества. При експериментите сме спазвали ограничен достъп до светлина на екстрактите, като само за сравнение е показан и масленият екстракт, получен при традиционната мацерация на слънце (НРО-S). Опитите са проведени с масло от гроздови семки (GS), като представител на

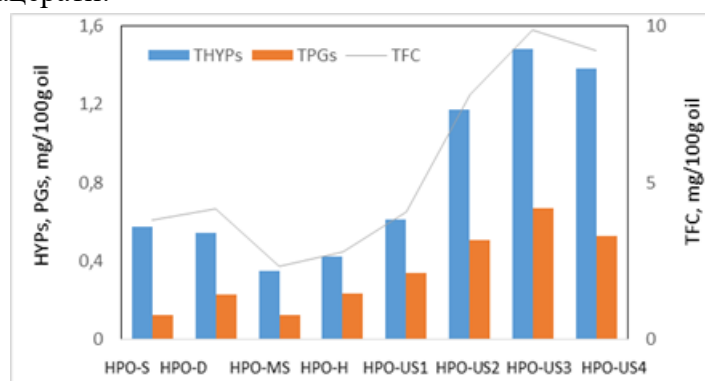
полиненаситените масла от линоловата група (с линово съдържание над 50%) с цел тестване на устойчивостта му към нежелателни реакции при различни условия.

Таблица 4.2. Условия и маслени екстракти (НРО) получени чрез различни методи

Означение	Материал	Методи	Температура	Продължителност
НРО-S	свежа	Сл. светлина, пер. разклащане	20-35°C	40 дни
НРО-D	свежа	Липса на светлина	22±3°C	40 дни
НРО-MS	изсушена	Разбъркване, 400 rpm	30 ±2°C	4 часа
НРО-Н	изсушена	Разбъркване +подгръване	30 ±5°C	4 часа
НРО-US1	изсушена	УЗ	30 ±5°C	4 часа
НРО-US2	изсушена	УЗ	45 ±5°C	4 часа
НРО-US3	изсушена	УЗ	75 ±5°C	4 часа
НРО-US4	изсушена	УЗ, на кисване с 75%EtOH	45 ±5°C	4 часа

- Сравнение на ефективността на ултразвуковата и традиционна екстракция

Резултатите от различните процедури за приготвяне на *Oleum hyperici* са представени на Фиг.4.26. Определено е съдържанието на общи хиперицини (НУР), флавоноиди (ТФС) и фотосинтетични пигменти (ТРС), които присъстват в различна степен във всички мацерати.



Фиг. 4.26 Общо съдържание на хиперицин (THYPs), пигменти (TPGs) и флавоноиди (TFC) в маслени екстракти, получени при различни условия

Интересното е, че не беше открита съществена разлика в съдържанието на НУР при мацерация на слънце (НРО-S) и на тъмно (НРО-D) при спектрофотометричното му определяне при 590 nm. Екстрактите обаче не са едни и същи, тъй като както беше описано по-рано, при излагане на слънце се образуват липофилни производни на хиперицин в резултат на фотолиза/фотоокисление, докато при мацерацията на тъмно хиперицинът е получен в естествената си форма при по-ниска температура. Отчетеното по-високо с около 10% съдържание в екстракта (0.57 mg на 100 g масло) може да се дължи на по-високата степен на екстракция при повишена температура, която компенсира реакциите на разграждане на хиперицин и неговите производни.

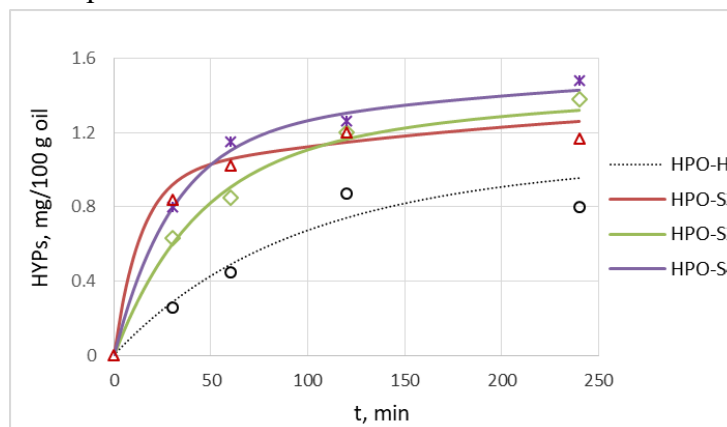
Растителните масла извличат в малки количества слабополярните флавоноиди (ТФС), между 3.8-4.18 mg QE/100 g oil при мацерацията. Както беше показано, по-голяма част от фенолите проявяват по-висок афинитет към полярни разтворители, обяснявайки получените ниски стойности. Слънчевата светлина може да доведе до

тяхното бързо разграждане след извличането им, но и до структурни промени за някои от свързаните съединения в свободни, активни форми, повишавайки съдържанието им и допринасяйки за антиоксидантната активност на екстракта. Най-съществена е промяната в съдържанието на хлорофилите, които губят цвета си и се разграждат - до 76% спрямо мацерацията на тъмно, което показва тяхната чувствителност на тъмно.

Прилагането на УЗ драстично ускорява процеса, като в рамките на 240 мин са получени съпоставими резултати с мацерацията за 40 дни. Отчетено е 32% и 16% увеличение на ефективността на екстракцията в пробите, подложени на ултразвукова екстракция спрямо тези с конвенционално разбъркване и загряване. Най-ниското съдържание на НУРs е при мацерация чрез нагряване във водна баня при 30°C (НРО-Н), докато най-високите количества са открити при комбиниране на УЗ с увеличаване на температурата до 75°C (НРО-US3). Растителните масла извличат слабополярните полифеноли (ТРС) и флавоноиди (ТФС), съответно между 6.12 - 9.79 mg GAE/100 g oil 2.8-5.13 mg QE/100 g oil. Както беше показано при системата вода-алкохол, по-голяма част от фенолите проявяват по-висок афинитет към полярни разтворители, в сравнение с неполярни и хидрофобни, обяснявайки получените по-ниски стойности. Въпреки това, те остават по-високи от тези, получени при Соклет екстракцията с хексан. Резултатите с НРО-US4 показваха целесъобразността от предварително накисване на суровината с 75%-ен етанол. Установено бе, че етанолът, като съ-разтворител, макар и в малки количества допринася за по-бързото пропиване на маслото и по-добро разтваряне на НУР от сухия растителен материал, което води до съпоставими добиви при по-ниска температура от 45°C.

- *Кинетика на обогатяване с хиперицин при ултразвукова екстракция*

Фиг. 4.27 представя опитните данни за екстракцията, подпомагана от УЗ в температурния интервал от 45 до 75°C в продължение на четири часа, а непрекъснатите линии е описанието с двустепенния кинетичен модел. За разлика от конвенционалната твърдо-течна екстракция с разбъркване (НРО-Н), посочена като сравнение, кинетичните криви при прилагане на ултразвук (НРО-S2-S4) се характеризират с по-висок начален наклон, последван от експоненциална форма в изследвания интервал от време.



Фиг.4.27 Сравнение между експерименталните кинетики и кинетиките, прогнозирани от модела

Най-ниската скорост е при 30°C (НРО-Н) без прилагане на УЗ, като при нея екстракцията не е завършена след 240 минути и трябва да се предвидят по-дълги периоди на екстракция, за да се наблюдава етапът на бавна дифузия. Ултразвуковата обработка с повишаване на температурата в един сравнително тесен температурен интервал от 30°C до 45°C (НРО-US2) ускорява кинетиката и времето, необходимо за достигане на псевдоравновесието е в рамките на 240 min. Повишаването на температурата до 75°C поле има по-слабо изразен ефект върху нарастването на степента на обогатяване с хиперицин (с 10%), без това да предизвика намаляване на добива, въпреки продължителното въздействие на УЗ. Това не изключва процеси на извличане и трансформация в получения екстракт да протичат едновременно.

Основният ефект от едновременното прилагане на УЗ и нагряване вероятно е свързан с намаляване на вискозитета на маслото. Те могат физически да деформират стените на порите което може да промени омокряемостта на материала и да увеличи ефективната пропускливост на маслената фаза през порестите среди. Този резултат може да е свързан с неподходящите характеристики на ултразвуковото поле (честота и интензитет). По-ефективното приложение на УЗ може да изисква и по-ниска стойност за съотношението билка: масло ($R_{L/S}$), но при тези условия се постигат фармакопейните изисквания за DER (1:4-7) за маслените извлеци.

4.4.3. Сравняване въздействията на УЗ при различните разтворители

1. Екстракция, подпомогната от ултразвук може да бъде успешно приложена независимо от типа на използвания екстракционен разтворител, но кинетиката и ефективността на екстракцията е различна в следствие на различните им физични свойства, като вискозитет, повърхностно напрежение, парно налягане и акустично съпротивление, които влияят върху на прага на кавитация и кавитационните ефекти.

2. Като цяло, значително намаляване на времето за екстракция при умерени температури (45-50°C) и известно подобряване на селективността са установените предимства в сравнение с конвенционалните процеси.

3. Оптимално извличане на химичните маркери - общи хиперицин и флавоноиди - се постига с 75% етанол при умерени условия (до 45 min, 40°C, частици със среден размер около 1 mm), при стойности на съотношението DER за този тип екстракти в допустимите граници. Използването на глицерол е оправдано, ако целта е извличане на по-полярните фенолни молекули.

4. Кинетиката на процеса на екстракция и в трите системи се повлиява в значителна степен от температурата на процеса, което вероятно се дължи на отчетената ниска разтворимост и трудната достъпност до хиперицин в капсулираната структура на черните жлези с едно- или двуслойна защитна обвивка, централното ядро в които е основното място за синтезиране и съхранение на НУРs.

На фона на общо проявената тенденция на нарастване на добива с повишаване на температурата, заслужава да отбележим, че това е оправдано главно в случаи, когато с повишение на температурата значително се подобрява масопреноса (при растителните масла) или се повишава разтворимостта.

5. За разлика от екстракцията с масла, която е селективна и извлича само част от малкото присъстващи в растителната суровина липофилни компоненти, липсата на селективност при екстракция с полярни разтворители налага да се прекъсне при достигане на степен на екстракция под 50% за да се ограничи присъствието на съпътстващи на баластни вещества.

4.5. Стабилност на екстрактите при екстракция и съхранение

4.5.1 Влияние на ултразвуковата и термична обработка върху екстрактите и суровината

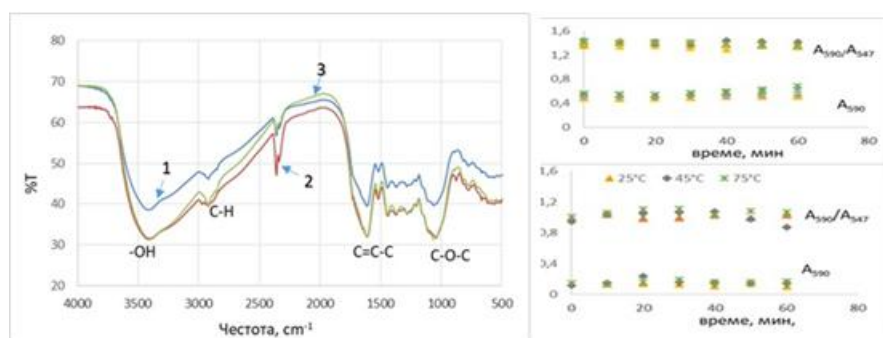
Важен аспект от изследването на лечебните растения е оценката на степента на разграждане на компоненти, които са нестабилни по време на екстракция от растителни проби под въздействието на различни фактори и/или при съхранение.

Тестовите за стабилност са осъществени по следния начин:

- сравнителен анализ на ИЧ спектрите на изходната суровина и на отработена суровина след конвенционална мацерация с нагряване и комбинирано приложение с ултразвук;

- изследване спектралните характеристики на водно-алкохолни моделни разтвори на референтния сух екстракт (SJW-DE®) и на екстракти от жълт кантарион с 75% вода-етанол и 50% вода-глицерол, при повишена температура в термостат на водна баня или в среда на ултразвук при три различни 25, 45, 75°C в продължение на 60 min.

На фиг. 4.28 са показани наложените спектри, представляващи зависимостите между пропускането (%T) и честотата в (cm^{-1}) на изходната суровината преди (спектр 1) и при температурно въздействие от 45°C в отсъствие (спектр 2) и присъствие на УЗ (спектр 3). Незначителните отклонения в ширината и интензитета на лентите показват че избраните оптимални параметри на УЗ обработката (45°C, плътност на УЗ-вата мощност 15-29 W L^{-1} и продължителност 45 min) не води до разграждане на присъстващите в растителни суровини съединения. Общият профил на ИЧ спектъра на екстрактите е почти еднакъв, следователно можем да говорим за сходни функционални групи първични и вторични съединения, съдържащи се в тези проби, които не претърпяват изменения в процеса на обработка: 3420 (ОН), 3350 (ОН), , 2930 (СН), 1725 (C=O), 1655 (C=C), 1620, 1612, 1520, 1070 (C-O).



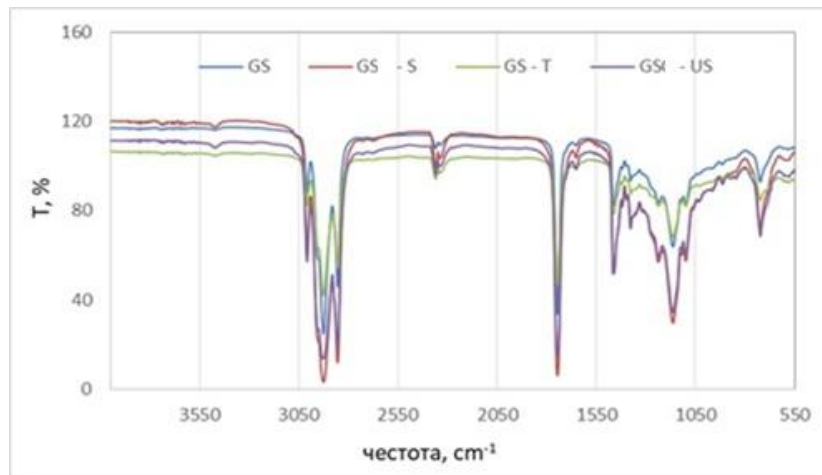
Фиг. 4.28. ИЧ спектри на суровината преди (спектр 1) и след топлинно въздействие (спектр 2) и при комбиниране с УЗ обработка (спектр 3)

Това заключение се подкрепя и от стабилността на хиперицин и неговите производни под влияние на УЗ поле и повишена температура чрез изследване съотношението на интензитета на абсорбция при двете характеристични дължини за хиперицин (Abs_{590}/Abs_{546}), което дава представа за протичане на нежелани реакции – трансформация на хиперицин при процеса в три различни позиции в УЗ вана. Не се наблюдават значими разлики между стойностите в началото и в края на теста и при трите температури. Това дава основание да се предположи, че УЗ-вото въздействие не води до структурни изменения в молекулата на хиперицин, доколкото може да се определи със спектралните методи. Отклоненията в стойностите на абсорбция ($\pm 15\%$) може да се свърже с временните и пространствени колебания в интензитета на акустичната мощност и температурата в ултразвуковата вана, като флукуациите са най-големи в пространството над трансдюсерите и прогресивно затихват с отдалечаване от тях.

Известно е, че активните вещества са по-нестабилни в среда на разтворител, отколкото в състава на растителната суровина, където различни взаимодействия с твърдата матрица ги предпазва от разграждане. В процеса на съхранение на течните водно-алкохолни екстракти, във всички случаи се наблюдава постепенно намаляване съдържанието на общите хиперицини, като по-силно този процес е изразен в пробата, обработена с ултразвук. Отчетена е голямата разлика ($\sim 20\%$) между резултатите в моделните разтвори, подлагани на УЗ и повишена температура до 1 h, но без достъп на светлина и тези, изложени на дневна светлина за по-продължителен период. Само при контролната необработена с УЗ проба, съхранявана на тъмно и при ниска температура (4°C), относително отклонение след продължително съхранение от 5 месеца е в рамките на приемливата граница на изменение от $\pm 10\%$ спрямо началната проба. Това показва, че УЗ трябва да се използва внимателно при чувствителни материали.

4.5.2 Проследяване чрез ИЧ спектроскопия измененията в маслените извлекци при различни начини на екстракция

Известно е, че по време на технологичния процес, могат да настъпят процеси на окислително, термично и фоторазлагане (фотолиза) в растителните масла. За да се изследва вероятността за протичането на тези процеси, са снети ИЧ спектрите на екстрактите, получени с три алтернативни източника на енергия: пряка слънчева светлина в продължение на 40 дни, а при вариантите на тъмно - третиране с ултразвук при 75°C и конвенционално нагряване при 75°C за 4 h (Фиг.4.29).



Фиг. 4.29 Сравняване на ИЧ спектъра на маслени извлекци с гроздово масло (GS) при мацерация на слънце (GS-S), при конвенционално нагряване (GS-T) и при УЗ с нагряване до 75°C (GS-US)

Разположението и формата на пиковете в ИЧ спектрите визуално са близки до този на базовото масло от гроздови семки и не се установяват съществени изменения при прилаганите режими на обработка, с малки изменения в специфични области на спектъра, от порядъка на резолюцията на апарата (2 cm^{-1}).

За растителните масла една от основните ИЧ области, характерни за липидното разлагане, се намира в края на по-високата честота на спектъра, между 3070 и 3800 cm^{-1} , свързан с образуването на пероксиди и хидропероксиди ($-\text{OOH}$) в ненаситени мазнини, инициирани от разкъсване на двойни връзки. Те са нестабилни и бързо се трансформират в кетони и алдехиди като вторични продукти на окислението. Изследваните проби от гроздово масло показаха много слабо поглъщане в тази област. Това може да се дължи на ниската степен на окисление, или ако тези съединения се образуват, те се разграждат много и не се натрупват в маслото през изследвания период. Потенциалните продукти от разграждането им не са изследвани на този етап.

По-подробното сравняване на спектрите с помощта на някои отношения на максимумите на интензитета на абсорбция в областите на основните характеристични пика показва, че използването на различни външни енергии има различно влияние върху степента на ненаситеност, дължина и разклонеността на веригата.

Традиционният процес на мацерация (НРО-S) води до относително слабо изразени структурни промени в маслото, въпреки продължителното излагане на слънчева светлина, колебанията в температурите на околната среда между 20 - 35°C и следи от вода от свежия растителен материал. Фоторазлагането (фотолиза) в растителните масла се свързва със съдържанието на фотосенсибилизаторите в матрицата. Фотосинтетични хлорофилни пигменти притежават особеността да действат като прооксиданти на светлина, което означава, че могат да ускорят окислението, особено в масла, чрез генериране на свободни радикали или засилване на липидната пероксидация, в контраст с тяхната роля като антиоксиданти при липса на светлина. Следователно, техният ефект върху качеството и стабилността на маслените извлекци може да бъде двупосочен, в зависимост от това дали са получени и съхранявани на тъмно или на светло. Една хипотеза, която може да обясни относителната стабилност на мацератите, е, че тъй като хлорофилите са много

нестабилни съединения, те се разграждат много бързо и имат незначително присъствие в мацерата ($< 0.2 \text{ mg}/100 \text{ g}$). По този начин, при умерената температура и липсата на кислород в затворения съд, антиоксидантният ефект на фенолните и други антиоксиданти в маслото преобладава над този на прооксидантите и следователно излагането на екстракционната смес на слънчева светлина може да се разглежда като някакъв „процес на рафиниране“ на пигментите.

По-сериозен риск от възможни неблагоприятни ефекти е показана при пробите, подложени на високата температура от 75°C , особено когато са комбинирани с ултразвук. Измененията се изразяват в рязко повишаване на степента на ненаситеност. Химичният ефект на ултразвука теоретично се свързва с екстремните температури и налягания в „локалните горещи точки“ в маслото, предизвикани от кавитацията. Разтворителите с висок вискозитет или високо повърхностно напрежение изискват по-високи прагове на акустична мощност, за да иницирират кавитацията, но генерират по-високи локални температури и налягания, след като тя започне. Тогава е много вероятно тази висока температура да произведе достатъчно енергия, за да разкъса ковалентните C-C или C-H връзки и да образува различни липидни радикали, които след това могат да започнат верижни реакции на окисление не само на мастните киселини, но и да модифицират различните антиоксиданти, присъстващи в екстрактите, което минимизира ефекта на общата антиоксидантна активност. Тези възможни процеси са зависими от времето на въздействие на УЗ, затова продължителната обработка при високи температури не е препоръчителна.

Тези резултати потвърждават едно от предимствата на обработката с УЗ вана спрямо директната обработка с УЗ сонда, а именно, че ултразвуковите преобразователи /трансдюсери/ не са в директен контакт с екстракционната смес и въпреки загубите на част от акустичната мощност, умерената плътност на мощността на акустичната енергия в лабораторната вана ($15\text{-}20 \text{ W L}^{-1}$) предотвратява или отслабва разрушителното действие на кавитацията и нежеланото високо загряване. Като важен недостатък трябва да се отбележи отчетената нееднородност в температурното и силово поле, което възпрепятства и мащабирането на процеса при променени обем и геометрия на акустичното поле и физикохимичните свойства на средата.

Показано е и функционалното значение на добавянето на растителните екстракти – подобряване стабилността и цвета при продължително съхранение на тъмно на маслените извлеци. Получените маслени извлеци, съхранявани в непрозрачни (светлоустойчиви) пластмасови контейнери, напълнени максимално, така че да се сведе до минимум свободното пространство и наличният кислород, запазват консистенцията и цвета си в продължение на 6 месеца.

4. 6. Изследвания върху безвредността на екстрактите

Общоприето е, че билковите препарати са безвредни, защото са природни продукти. Билковите екстракти обаче, заедно с полезните съставки могат да съдържат някои съединения, първоначално присъстващи в растенията или получени в резултат на обработката, които проявяват цитотоксични ефекти. Такъв е хиперицинът,

фитотоксин, които може да предизвиква „хиперицизм“. Затова анализът на безвредността на тези екстракти е важен за тяхното приложение.

За проверка безопасността на получените екстракти, обогатени на активни съединения, е определена максималната поносима концентрация (МТС) със стандартен МТТ-тест. Използвани са три нетуморогенни НаСаТ (трансформирани кератиноцити), НЕК-293 (трансформирани ембрионални бъбречни клетки), ССL⁻¹ (трансформирани миши фибробласти), и една туморна клетъчна линия НЕРG₂ (чернодробен карцином). Съгласно насоките на Националния институт по рака на САЩ (NCI), критичните концентрационни граници за категоризиране на цитотоксичността на растителните екстракти са: силно активни ($IC_{50} \leq 20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), умерено активни ($IC_{50} > 20 - 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), слабо активни ($IC_{50} > 100 - 500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) и неактивни ($IC_{50} > 500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

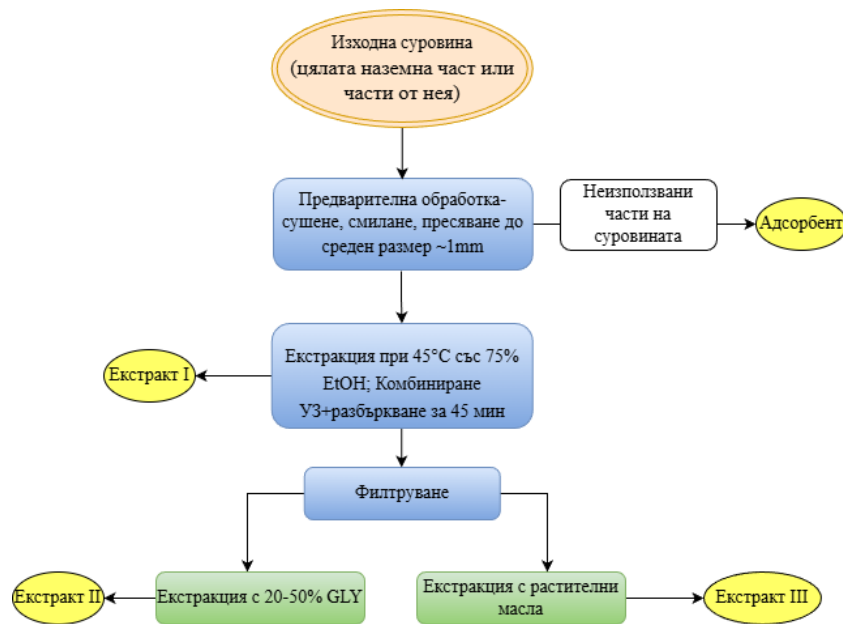
Поради разнообразието от вещества, които се откриват в различните части на билката и които притежават различна степен на разтворимост при различни условия, е изследвана цитотоксичната активност на екстракти, получени с полярен разтворител (вода) и по-слабо полярните водно-етанолови смеси (20-96%), така и неполярен (хлороформ). Екстрактите са получени чрез мацерация за 48 ч при стайна температура, твърдо-течна екстракция с разбъркване и с УЗ въздействие.

Първоначалният скрининг на 10 екстракта срещу 4-те клетъчни линии показва ниска или липса на цитотоксичност на водните и водно-етанолни екстракти, за разлика от екстракта, получен с хлороформ, въпреки че не съдържа хиперицин. Виждат се недостатъците, когато като екстрагент на липофилните вещества се използва токсичен органичен разтворител, в случая хлороформ. Известна цитотоксична активност е отчетена при екстракта от черните жлези с висока концентрация на хиперицин ($>100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) който може да бъде по-силен, ако е активиран под действие на светлината. Пречистването на етаноловия екстракт от липофилните и високо-молекулни съставки също има тенденция за по-силна токсичност, но са необходими допълнителни изследвания, за да бъде потвърдена.

Тези наблюдения предполагат, че при комплексни смеси от вещества, каквито са тоталните, неразделени растителни екстракти, взаимното влияние на наличните вещества води до синергично действие не само по отношение на разтворимостта на изследваните вещества, но и за тяхната активност и безвредност.

4.7. Схема за получаване на различни хиперицин-съдържащи екстракти

На основата на проведения сравнителен анализ може да бъде предложена схема за лесен за изпълнение и щадящ околната среда метод за екстракция, която позволява рационалното и комплексно използване на суровината и поетапно получаване на три типа екстракти с различни свойства и предназначение.



Фиг. 4.30. Схема за получаване на екстракти, обогатени на различни по полярност групи биологично активни вещества

На първия етап, екстракцията с 75% EtOH като амфифилен разтворител с умерена полярност осигурява получаването на богат на хиперицин и флавоноиди течен или сух екстракт, който отговаря на спецификациите за растителни лекарствени средства. Комбинирането на УЗ екстракция с конвенционално разбъркване (45 min) при умерени температури (до 45°C) спрямо традиционната мацерация позволява да се намалят оперативните разходи, при максимално запазване на ценните вещества в получените екстракти.

Полярната и липидна фракция остават неизползвани, затова отработена суровина може да бъде подложена на следваща екстракция, съответно с глицерол в подходящо съотношение с вода и/или с растителни масла (или смес от растителни масла). Получените обогатени на фенолни съединения глицеролови екстракти са подходящи като изходна суровина за производството на фармацевтични продукти, като назални и офталмологични средства за локално приложение, където директното влагане на етанолови екстракти е проблемно. Директното обогатяване на растителните масла със специфични биоактивни съединения и антиоксиданти засилва здравословните характеристики на базовото масло, а също така допринася и за намаляване на нежелани окислителни процеси. Като растително масло може да се използва масло от гроздови семки, страничен продукт, който остава след преработката на грозде, с много полезни компоненти (проантоцианидини, витамин Е, фенолни антиоксиданти), които предпазват от ултравиолетовите лъчи и предотвратяват развитието на рак на кожата.

Освен това, неизползваемата част от стеблата, отстранена при първичната подготовка на билката, би могла да бъде оползотворена за природен адсорбент, тъй като беше показано свойството ѝ да поглъща природни багрила.

ИЗВОДИ

Направените изследвания позволяват да формулираме следните по-съществени резултати:

1. Разработен е изчислителен протокол (алгоритъм) на базата на триразмерните параметри на разтворимост на Хансен за теоретична оценка на междумолекулните взаимодействия и афинитета между разтворители и разтворими вещества ;

2. Разработената процедура е приложена за търсене на алтернативни разтворители на растителна основа на тетраhydroфуран, традиционно използван като екстракционен разтворител при определяне качеството на билката и получените екстракти;

3. Подбрани са разтворители за целева екстракция на комплекса полезни съставки в билката с умерена до висока полярност (вода - етанол и вода - глицерол) и неполярни съставки (растителни масла);

4. Установени са зависимости при екстракцията на флавоноидите и фенолните киселини от растителен материал: Екстрагентът 75% етанол вода (1:1) (v/v) показва относителна селективност по отношение на флавоноидите рутин и кемпферол-3-рутинозид и фенолните киселини. Извличат се напълно флавоноидите, докато от ХИП се извличат само 36%.

5. Теоретично е обоснована и експериментално е доказана възможността за директна екстракция с растителни масла с повишено съдържание на полиненаситени мастни киселини;

6. Установени са основни закономерности и особености при получаване на кинетичните характеристики на екстракцията по отношение на факторите, повлияващи екстракция: степен на смилане, съотношение твърда/течна фаза, температура, време и брой етапи на екстракция

7. Показано е въздействие на ултразвук с плътност на акустичната мощност от 10-20 WL^{-1} при комбиниране с температура при 45°C за ускоряване на процесите на масопренос и увеличаване на добива при водно-алкохолни смеси и особено при растителни масла.

8. Показано е, че двустепенният кинетичен модел дава добро описание на кинетиката при екстракция от суровини с полидисперсен характер при различни условия на водене на процеса.

9. Проверена е стабилността и безвредността на екстракти и маслени извлекци, получени при различни условия.

Научно-приложни приноси

- Предложена е оригинална методология за първоначална оценка приложимостта на разтворители за екстракция на комплекса БАВ от растителни суровини чрез комбиниране на параметрите на разтворимост на Хансен и (еко)токсикологични показатели.

- Показани са ограниченията на модела на Хансен при прогнозиране кой тип разтворител може да бъде подходящ за конкретен процес в бинарни и многокомпонентни системи в широк диапазон на полярност.

Практическа приложимост

- Независимо от установените вариации в зависимост от местата и периода на събиране на изследваните суровини е доказано високото съдържание на хиперицин и флавоноиди, надхвърлящо стандарта, което показва високото качество на българските билки.

- Направената оценка за количествените и качествените промени в различни части на растението и в различни периоди от цъфтежа могат да се ползват при отчитане на подходящите условия за събиране и привеждане в стандартно състояние на растителната суровина.

- Предложена е схема за комплексно използване на суровината и поетапно получаване на три типа екстракти с различни свойства и предназначение, които биха могли да намерят приложение самостоятелно или като съставка в натурална козметика и растителни лекарства.

Необходим е по-детайлен анализ на химическия състав на билката за потвърждаване на нивото на безопасност (цитотоксичност и фототоксичност) и терапевтичния потенциал на получените екстракти.

Научни публикации, които са реферирани и индексирани в световни вторични литературни източници

- Maria Boykova, Ilonka Saykova, Iliyan Trayanov, Solubilities of bioactive compounds from *Hyperici herba* in aqueous alcoholic solvent mixtures, *Scientific Works of UFT–Plovdiv*, 2019, v. 66 (1).

- Saykova^{1*}, I. Trayanov^{1,2} M. Boykova¹, N. Stoilova³, M. Funeva-Peycheva³, Organic solvent nanofiltration of extracts from *Hypericum Perforatum L.*: effect of variable feed composition on rejection and flux decline, Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemical and System Engineering, University of Chemich, 2020, Volume 52, Issue (pp. 525-531), София.

Доклади в научни форуми

- Maria Boykova, Ilonka Saykova, Piiyan Trayanov, Solubilities of bioactive compounds from *Hyperici herba* in aqueous alcoholic solvent mixtures, 66-та научна конференция с международно участие „Хранителна наука, техника и технологии – 2019“, 11-12 октомври 2019, Пловдив.
- Maria Boykova, Ilonka Saykova, Intensification of ultrasonic extraction of active compounds from *hypericum perforatum* using bio-solvents, III-Национална студентска конференция по фармацевтични и химични науки, 5-6 октомври 2022 година, София.
- Mariya Mondashka, Enrichment of vegetable oils with valuable compounds from *Hypericum Rerforatum* through traditional and ultrasound-assisted maceration: Differences in extraction capabilities and stability, 71-ва научна конференция с международно участие „Хранителна наука, техника и технологии – 2024“, 24-25 октомври 2024, Пловдив.

Постерни доклади

- М. Мондашка, И. Съйкова, И. Траянов „Изследване на потока и задържащата способност при нанофилтруване на екстракти от жълт кантарион”/”Study of flow and attenuation in the nanofiltration extract *Hypericum Perforatum*”, XIII Научна постерна сесия за млади докторанти и учени, 20 май 2016.
- М. Boykova, I. Trayanov, A. Slavchova, I. Saykova, Моделиране разтворимостта на активни фитоконпоненти в биоразтворители чрез параметрите на разтворимост на Хансен/ Modeling the Solubility of active phytocompounds in bio-based solvents using Hansen Solubility Parameters, XV Научна постерна сесия за млади докторанти и учени, 23 май 2018.
- I. Trayanov, M. Boykova, B. Marchev, I. Saykova, A diffusion limited extraction kinetics model with polydispersity in size and shape of vegetable raw materials/Моделиране кинетиката на екстракция при полидисперсност по размер и форма на растителните суровини, XV Научна постерна сесия за млади докторанти и учени, 23 май 2018
- М. Boykova, I. Saykova, Impact of ultrasound power on the recovery of valuable compounds from *hyperici herba* and their stability in ultrasonic fields, XVII Научна постерна сесия за млади докторанти и учени, 26 юни 2020.