

UNIVERZITA KARLOVA  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra analytické chemie



Bakalářská práce

**EXTRAKCE KVĚTU MĚSÍČKU LÉKAŘSKÉHO POMOCÍ  
EKOLOGICKY ŠETRNÝCH ROZPOUŠTĚDEL  
(EXPERIMENTÁLNÍ)**

Michaela Kopecká

Vedoucí práce: PharmDr. Veronika Pilařová, Ph.D.

Hradec Králové, 2025

## Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

**Kandidát:** Michaela Kopecká

**Školitel:** PharmDr. Veronika Pilařová, Ph.D.

**Název bakalářské práce:** Extrakce květu měsíčku lékařského pomocí ekologicky šetrných rozpouštědel (experimentální)

Cílem práce bylo optimalizovat metodu superkritické fluidní extrakce pro získání vitamínu E, významného antioxidantu, ze sušeného a drceného květu měsíčku lékařského (*Calendula officinalis* L.).

Superkritická fluidní extrakce je metoda, která využívá nadkritické tekutiny pro extrakci chtěných látek. Nejčastěji se používá čistý oxid uhličitý, který je díky svým fyzikálně chemickým vlastnostem vhodný pro extrakci nepolárních látek. Při extrakci polárnějších látek se k nadkritické tekutině přidávají polární organická rozpouštědla, modifikátory, jako je například etanol, která ovlivňují jejich vlastnosti. Teplota a tlak jsou další klíčové parametry ovlivňující výtěžnost extrakce.

Optimalizace metody pro extrakci vitamínu E z květu měsíčku probíhala v několika na sebe navazujících krocích. Nejprve se testoval vliv množství ethanolu jako organického modifikátoru v CO<sub>2</sub> v rozmezí 2-20 %. Poté se testoval vliv tlaku v rozmezí 100-300 bar, a nakonec se zkoumal vliv teploty v rozmezí 40-80 °C. Finální podmínky byly zvoleny s ohledem na nejvyšší výtěžnost vitamínu E a byly nastaveny následně: 2 % ethanolu v CO<sub>2</sub>, 300 bar a 80 °C. Opakovatelnost metody byla ověřena pro vyextrahované formy vitamínu E jako relativní směrodatná odchylka výtěžnosti (RSD, %): α-tokoferol 9,5 µg/ml, RSD 9,1 %, β-tokoferol 1,8 µg/ml, RSD 6,9 %, γ-tokoferol 1 µg/ml, RSD 4,8 %. Dodatečně se testoval vliv částic matrice. Se snižujícím se průměrem částic se zvyšovala výtěžnost látek. Nejmenší použité částice o průměru 0,018 mm poskytovaly výtěžnost pro α-tokoferol 14,2 µg/ml (RSD 0,4 %), β-tokoferol 2,1 µg/ml (RSD 5,8 %), γ-tokoferol 0,9 µg/ml, (RSD 0,1 %).

Vyvinutá metoda byla porovnána s ultrazvukem asistovanou extrakcí. Obě metody poskytovaly podobnou výtěžnost. Extrakty získané pomocí SFE vykazovaly nižší obsah balastních látek než extrakty získané pomocí UAE. Opakovatelnost SFE byla lepší než u UAE (α-tokoferol 14,5 µg/ml, RSD 10,7 %, β-tokoferol 0,5 µg/ml, RSD 9,2 %, γ-tokoferol 2,2 µg/ml, RSD 10,2 %).

## Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

**Candidate:** Michaela Kopecká

**Supervisor:** PharmDr. Veronika Pilařová, Ph.D.

**Title of the bachelor thesis:** Extraction of marigold flower using environmentally friendly solvents (experimental)

This work aimed to optimize the supercritical fluid extraction for obtaining vitamin E, an important antioxidant, from dried and crushed marigold flowers (*Calendula officinalis* L.).

Supercritical fluid extraction is a method that uses supercritical fluids to extract desired compounds. The most commonly used supercritical fluid is pure carbon dioxide, which is suitable for extracting non-polar substances due to its physicochemical properties. When extracting more polar compounds, polar organic solvents such as ethanol, i.e., modifiers, are added to the supercritical fluid to change their physicochemical properties. Temperature and pressure are other key parameters affecting the extraction yield.

The optimization of the method for vitamin E extraction from marigold flowers was carried out in several consecutive steps. First, the effect of the amount of ethanol selected as an organic modifier in CO<sub>2</sub> was tested in the range of 2–20 %. Then, the effect of pressure was examined in the range of 100–300 bar, and finally, the effect of temperature was studied in the range of 40–80 °C. The final conditions were selected in accordance with the highest extraction yield and were as follows: 2% ethanol in CO<sub>2</sub>, 300 bar, and 80 °C. The method repeatability was verified for extracted forms of vitamin E and expressed as relative standard deviation (RSD, %) of extracted amounts:  $\alpha$ -tocopherol 9.5  $\mu\text{g/mL}$ , RSD 3.0 %;  $\beta$ -tocopherol 1.8  $\mu\text{g/mL}$ , RSD 4.8 %;  $\gamma$ -tocopherol 1  $\mu\text{g/mL}$ , RSD 5.1 %. Additionally, the effect of matrix particle size was tested. A decreasing diameter of particles increased the extraction yield. The smallest particles, with an average diameter of 0.018 mm, provided the extraction yield of 14.2  $\mu\text{g/mL}$  (RSD 0.4 %) for  $\alpha$ -tocopherol, 2.1  $\mu\text{g/mL}$  (RSD 5.8 %) for  $\beta$ -tocopherol, and 0.9  $\mu\text{g/mL}$  (RSD 0.1 %) for  $\gamma$ -tocopherol.

The optimized method was compared with ultrasound-assisted extraction. Both methods achieved a similar yield. The SFE was less prone to the extraction of ballast compounds than UAE. The repeatability of SFE was also better than that of UAE ( $\alpha$ -tocopherol 14.9  $\mu\text{g/mL}$ , RSD 13.5 %;  $\beta$ -tocopherol 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , RSD 9.2 %;  $\gamma$ -tocopherol 2.2  $\mu\text{g/mL}$ , RSD 10.2 %).

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval(a) samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

Michaela Kopecká

Ráda bych poděkovala paní PharmDr. Veronice Pilařové, PhD, za její odborné vedení, vstřícný přístup a cenné rady jak během experimentální části, tak při samotném psaní práce. Velké poděkování patří také mé rodině, která mě velmi podporuje v celém mém studiu.

# OBSAH

Seznam použitých zkratk	8
Úvod	9
1. Cíl práce	10
2. Teoretická část	11
2.1. Měsíček lékařský ( <i>Calendula officinalis L.</i> )	11
2.1.1. Příprava drogy <i>Calendulae flos</i>	11
2.1.2. Léčivé účinky a použití měsíčku lékařského ( <i>Calendula officinalis L.</i> )	12
2.1.3. Obsahové látky	12
2.2. Vitamín E	13
2.2.1. Struktura vitamínu E	14
2.2.2. Biologická aktivita vitamínu E	15
2.2.3. Biologická účinnost forem vitamínu E	16
2.3. Extrakce z rostlinného materiálu	16
2.3.1. Superkritická fluidní extrakce	17
2.3.2. Nadkritické tekutiny	18
2.3.3. Nadkritický CO <sub>2</sub>	19
2.3.4. Instrumentace SFE a proces extrakce	20
3. Experimentální část	23
3.1. Použité přístrojové vybavení a pomůcky	23
3.2. Použité chemikálie	23
3.3. Příprava roztoků pro ředění standardů a odpařených extraktů	24
3.4. Příprava standardů	24
3.5. Optimalizace SFE	24
3.5.1. Příprava vzorků pro extrakci	24
3.5.2. Optimalizace podmínek extrakce	25
3.5.3. Úprava získaného extraktu	25

3.6.	SFC-MS analýza .....	26
3.7.	Hodnocení výsledků .....	27
3.7.1.	Výpočet koncentrací vzorků .....	27
3.7.2.	Směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka .....	27
4.	Výsledky .....	28
4.1.	Optimalizace základních parametrů .....	28
4.1.1	Vliv množství kosolventu v CO <sub>2</sub> .....	28
4.1.2.	Vliv tlaku .....	29
4.1.3.	Vliv teploty .....	29
4.2.	Finální podmínky a opakovatelnost extrakce .....	30
4.3.	Vliv velikosti částic .....	30
4.4.	Porovnání zoptimalizované metody s tradiční metodou extrakce pomocí organického rozpouštědla .....	31
5.	Závěr .....	35
6.	Seznam použité literatury .....	36

## Seznam použitých zkratek

BPR	Regulátor zpětného tlaku
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý
EAE	enzymová extrakce
ESI	Ionizace pomocí elektrospreje (Electrospray Ionization)
HPT	Heptan
IPA	Isopropanol
MAE	Extrakce pomocí mikrovln
P <sub>c</sub>	Kritický tlak
PEF	Extrakce pulzním elektrickým polem
PLE	Extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RNS	Reaktivní formy dusíku
RSD	Relativní směrodatná odchylka
scCO <sub>2</sub>	Nadkritický oxid uhličitý
SD	Směrodatná odchylka
SCF	Nadkritická tekutina
SFE	Superkritická fluidní extrakce
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
SIM	Mód monitorování vybraného iontu (Selected Ion Monitoring)
T <sub>c</sub>	Kritická teplota
UAE	Ultrazvukem asistovaná extrakce
ZR	Základní roztok
α-TTP	α-tokoferol transferinový protein

## Úvod

Měsíček lékařský je významná léčivá bylina, známá pro své protizánětlivé, antibakteriální a hojivé účinky. Díky těmto vlastnostem se hojně využívá ve farmacii a kosmetice, přičemž se z něj vyrábějí zejména masti nebo čaje. Jednou z účinných látek obsažených v měsíčkových květech je vitamín E, který patří do skupiny vitamínů rozpustných v tucích a je známý pro své silné antioxidační, protizánětlivé a neuroprotektivní vlastnosti. Kvůli jeho lipofilnímu charakteru, nestabilitě při vysokých teplotách, v přítomnosti světla a kyslíku je obtížně získáván klasickými extrakčními metodami.

Superkritická fluidní extrakce je moderní extrakční technika, která využívá zejména nadkritický oxid uhličitý jako extrakční médium, který má nepolární charakter, takže je velmi vhodný pro extrakci lipofilních látek. Samotná extrakce probíhá za mírných podmínek, proto je vhodná také pro extrakci látek, které jsou nestabilní například za vyšších teplot nebo ve vyšším či nižším pH. Zároveň využívá šetrná a netoxická rozpouštědla, takže se dá říci, že splňuje požadavky „zelené chemie“, která se v posledních letech preferuje stále více. Jedná se tedy o techniku, která by mohla účinně extrahovat vitamín E z květů měsíčku a která splňuje moderní trendy.

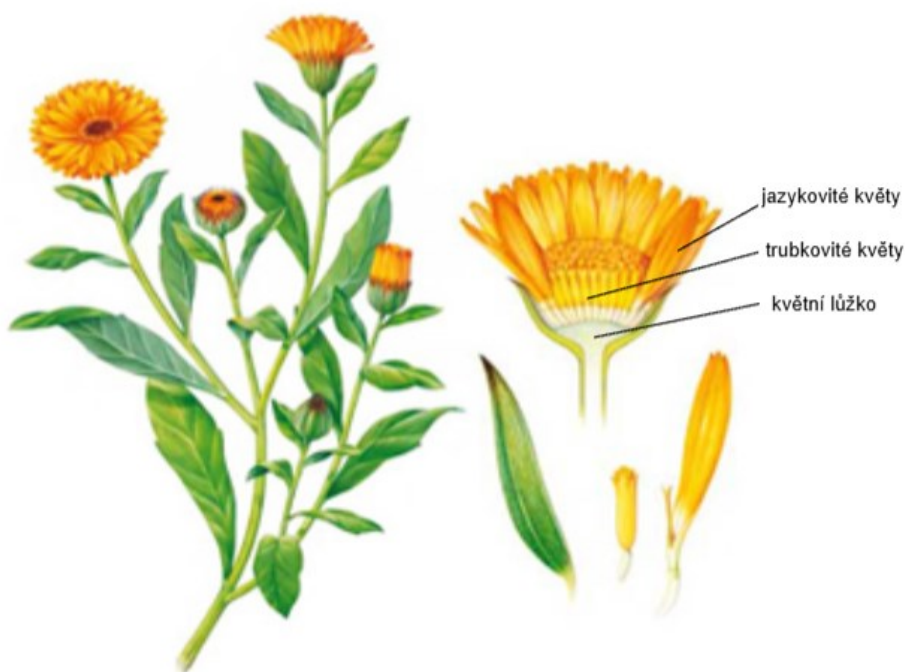
## **1. Cíl práce**

Cílem této experimentální práce bylo zjistit, zda lze vyextrahovat vitamín E z květů měsíčku lékařského pomocí superkritické fluidní extrakce. Dalším cílem bylo popsat vliv klíčových podmínek extrakce, jako je teplota, tlak a složení extrakčního média a velikosti částic matrice na výtěžnost extrakce. Dále bylo cílem určit optimální podmínky, které prioritizují maximální výtěžnost, a zjistit, zda je tento proces při zvolených podmínkách opakovatelný. Posledním cílem bylo zjistit, jak si bude tato extrakce vést v porovnání s ultrazvukem asistované extrakci za použití etanolu.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Měsíček lékařský (*Calendula officinalis* L.)

Měsíček lékařský (*Calendula officinalis* L., čeleď Asteraceae) je 1-2letá bylina s bohatě větvenou a listnatou lodyhou, která je pokryta jemnými chloupky. Spodní listy má obvejčité nebo kopist'ovité s krátkým řapíkem a horní listy má kopinaté a přisedlé. Květy mají charakteristickou žlutou až oranžovou barvu a jsou složeny jak z květů trubkovitých, tak i jazykovitých. Tyto sušené plně rozkvetlé květy plnokvětých odrůd *Calendula officinalis* L jsou v Českém lékopise 2005 uvedeny jako droga *Calendulae flos*, která je určena pro mírná zánětlivá onemocnění horních cest dýchacích, ústní dutiny a kůže [1,2].



Obr. 1: Měsíček lékařský (*Calendula officinalis* L.), převzato ze zdroje [3] a následně upraveno.

#### 2.1.1. Příprava drogy *Calendulae flos*

Měsíček kvete od června do podzimu a jeho plně rozkvetlé květy se sbírají nejlépe za suchého počasí. Květy, které začaly již opadávat, mají zhoršenou kvalitu a jsou pro sběr nevhodné. Následné sušení může probíhat venku ve stínu nebo za použití umělého sušení při teplotách do 40 °C. Květy se uchovávají ve tmě a suchu, aby se droga nezneškodila. Jelikož květy velmi snadno přijímají vzdušnou vlhkost, tak by se měly občasně přesušit. Drogu *Calendulae flos* tvoří takto usušené květy, které mají oddělené květní lůžko [2,4].

### **2.1.2. Léčivé účinky a použití měsíčku lékařského (*Calendula officinalis* L.)**

Měsíček lékařský a jeho extrakty mají mnoho prospěšných vlastností a účinků. Například ethanolové extrakty mají antibakteriální účinky a působí proti bakteriím, virům (*Herpes simplex*) a plísním (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*) [5]. Protizánětlivé účinky byly také prokázány na zvířecích modelech, kde extrakty mírnily záněty a otoky. Podával se například 70% ethanolový extrakt a extrakt získaný superkritickou fluidní extrakcí pomocí oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>). Zánět byl experimentálně vyvolán krotonovým olejem na myších uších, ethanolový extrakt ho inhiboval o 20 % a extrakt získaný pomocí CO<sub>2</sub> inhiboval zánět z 70 % a to při stejné dávce [5]. U polysacharidů obsažených v květech byly prokázány imunostimulační účinky v mnoha in vitro imunostimulačních testech [5].

Díky schopnosti podporovat regeneraci kůže pomáhá měsíček při hojení ran, zánětů kůže, špatně se hojících jizev, popálenin, a to především způsobených slunečním zářením. Může také preventivně chránit kůži před oxidativním stresem, který vyvolává sluneční záření. To je umožněno díky antioxidačním schopnostem především fenolických a flavonoidních látek. Účinnost extraktu je závislá na celkové koncentraci látek v něm [2,5]. Extrakty měsíčku jsou proto často používány ve formě mastí či krémů při léčbě kožních problémů, jako jsou opruzeniny, jizvy, praskliny nebo ekzémy [5].

Měsíček lze také užívat perorálně, ve formě odvaru, který podporuje činnost jater, žlučníku, trávicího ústrojí a pomáhá při zánětlivých onemocněních gastrointestinálního traktu jako je Crohnova choroba a ulcerózní kolitida. Je to jedna z mála léčivých rostlin, která vykazuje kancerostatický efekt i při podávání formou čaje především u rakoviny žaludku, jater, tlustého střeva, dělohy, kůže a prsu [2,5].

### **2.1.3. Obsahové látky**

Nejvíce účinných látek je obsaženo v květech, které jsou charakteristické svojí barvou způsobenou obsahem karotenoidů. Žluté odrůdy mají nejvyšší obsah luteinu, oranžové odrůdy mají více beta-karotenu. Karotenoidy jsou velmi citlivé na světlo a rychle pod jeho působením degradují. Z tohoto důvodu se nesmí měsíček sušit a uchovávat na světle [5].

Měsíček obsahuje také menší množství organických kyselin, jako jsou kyselina salicylová, kyselina askorbová, a silice, například mentol. Dále jsou v květech obsaženy pentacyklické triterpeny (saponiny, triterpendioly, triterpentrioly), steroly (cholesterol), flavonoidy a polysacharidy [2,4,5].

Další významnou látkou, která se podílí na účincích měsíčku lékařského je vitamín E, který je souhrnným názvem pro tokoferoly a tokotrienoly. Měsíček obsahuje jen  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -tokoferol a  $\gamma$ -tokoferol [6]. Hlavní obsahové látky a jejich podrobný rozpis je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1: Hlavní obsahové látky měsíčku lékařského (*Calendula officinalis* L.), převzato ze zdroje [6].

<b>Skupina látek</b>	<b>Konkrétní látky</b>
Sacharidy	12–25 % (sušina) s arabinózou a galaktózou
Lipidy	5 % (sušina) s estery mastných kyselin Hydrokarbony/parafíny/vosky – 0,015 % (čerstvé okvětní lístky)
Minerální látky	draslík – 6 %, sodík – 1,7 %, hořčík – 0,9 %, vápník – 0,5 %
Fenolové sloučeniny	Fenolová kyselina – 0,1 % (sušina), flavonoidy, třísloviny, kumarin
Steroidy a terpenoidy	Steroly a steroidy, volné a esterifikované triterpenické alkoholy (< 5 %), triterpenické glykosidy (2–10 %)
Tokoferoly	$\alpha$ -tokoferol, $\beta$ -tokoferol, $\gamma$ -tokoferol
Chinony	5-fytyltoluchinon, 6-fytyltoluchinon, $\alpha$ -tokoferolchinon
Karoteny	$\beta$ -karoten, $\zeta$ -karoten, lykopen, lutein, citroxantin, flavoxantin, volaxantin, antheraxantin, rubixantin, auroxantin, mutaxantin

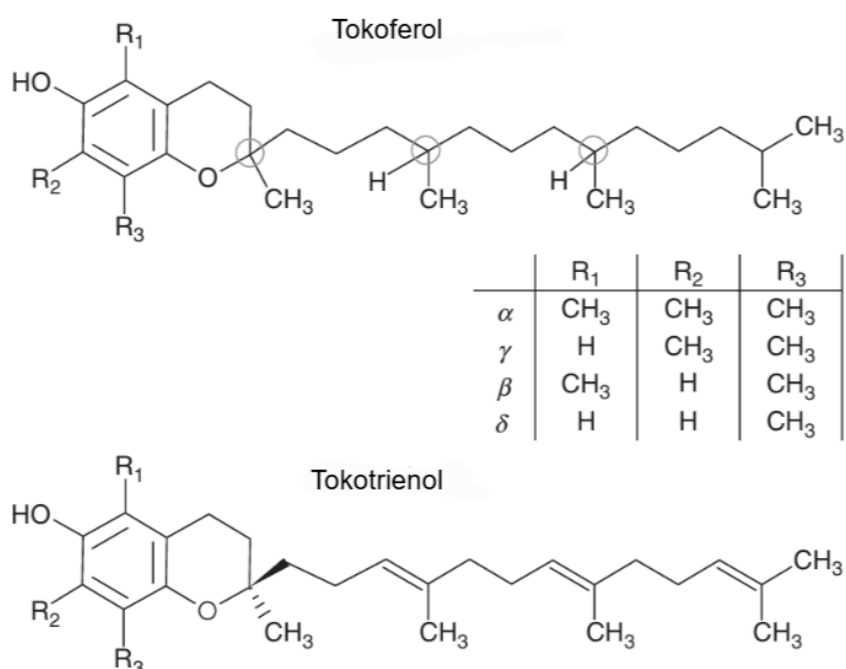
## 2.2. Vitamín E

Vitamín E souhrnně označuje skupinu osmi lipofilních látek, čtyř tokoferolů a čtyř tokotrienolů, které se označují jako  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ - [7]. Tyto látky jsou pouze syntetizovány fotosyntetizujícími rostlinami a živočichové je mohou přijmout pouze ve stravě [8]. Jejich hlavními zdroji jsou rostlinné oleje, oříšky, celozrnné obiloviny a listová zelenina [9]. Jsou to významné antioxidanty, a tak se často přidávají do mastí a krémů [4].

## 2.2.1. Struktura vitamínu E

Tokoferoly a tokotrienoly mají podobnou strukturu, která se skládá z chromanolového polárního jádra a dlouhého nepolárního řetězce. Jediným rozdílem mezi tokoferoly a tokotrienoly je nasycenost nepolárního řetězce. Tokoferoly ho mají nasycený, tzv. phytylový, zatímco tokotrienoly ho mají nenasyčený, tzv. geranylo-geranylový [4,10]. Jednotlivé formy  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ - se následně od sebe liší množstvím a pozicí methylových skupin na chromanolovém jádře.

Všechny přírodně se vyskytující tokoferoly v potravě mají na postranním řetězci stereochemii RRR, přesto je nelze v lidském těle vzájemně přeměnit, a proto jsou metabolizovány odlišně [10].



Obr. 2: Struktura tokoferolů a tokotrienolů, kroužky označují chirální místa 2, 4' a 8' u tokoferolů., převzato ze zdroje [7] a upraveno.

### 2.2.2. Biologická aktivita vitamínu E

Na rozdíl od většiny mikronutrientů nebyla u vitamínu E nalezena specifická role v nezbytných metabolických funkcích. Hlavní funkcí vitamínu E je jeho působení jako nespecifického antioxidantu, který přerušuje řetězové reakce. Přerušení této řetězové reakce zamezí vzniku nových volných radikálů. Vitamín E nejvíce chrání polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) ve fosfolipidech plazmatické membrány a v plazmatických lipoproteinech [10].

Tyto antioxidantní vlastnosti má vitamín E díky hydroxylové skupině na 6. uhlíku chromanolového kruhu. Ta reaguje s reaktivními formami kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) a tím je neutralizuje. Reakce vitamínu E s ROS nebo RNS vede ke vzniku nestabilního tokoferoxylového radikálu (Vit E-O•) který může být odbourán různými způsoby. Může vytvořit dimer s dalším tokoferoxylovým radikálem, který pak již radikálovou aktivitu nemá. Může také být regenerován pomocí dalších antioxidantů jako je například kyselina askorbová. Tato regenerace byla pozorována jak in vitro, tak i in vivo [8]. Tokoferoxylový radikál může prodělat další oxidaci za vzniku tokoferylového chinonu, nebo může reagovat jako prooxidant a oxidovat jiné lipidy [10]. Tento efekt však není rovnocenný u všech isoform. Antioxidantní aktivita závisí na počtu methylových skupin na chromanolovém kruhu.  $\alpha$ -tokoferol je tedy silnějším antioxidantem než jiné isoformy a tokoferoly jsou silnější antioxidanty než tokotrienoly [8].

Kromě antioxidantních vlastností se vitamín E vyznačuje také výraznými protizánětlivými účinky, jelikož dokáže potlačit aktivitu cyklooxygenázy 2 a 5-lipoperoxidázy, přičemž  $\alpha$ -tokoferoly jsou méně účinné než jiné tokoferoly. Isoformy s nesubstituovanou 5 pozicí, jako je  $\gamma$ -tokoferol, tak mají větší protizánětlivé účinky. Proto se uvažuje o jejich potenciálním využití jako chemopreventivních látek proti rakovině [8]. Řada studií prokázala, že  $\gamma$ -tokoferol potlačil karcinogenesi u myši, kterým byla indukovaná kolitida. Kromě léčby rakovin se také studuje vliv  $\alpha$ - a  $\gamma$ -tokoferolu na zánětlivá onemocnění střeva in vitro a in vivo. Výsledky ukázaly, že  $\alpha$ - a  $\gamma$ -tokoferoly zmírnily krvácení do stolice, průjem a zvýšené hladiny interleukinu-6 [8].

Studují se také neuroprotektivní vlastnosti vitamínu E. Bylo zjištěno, že zejména  $\alpha$ -tokoferol má vysoký potenciál snižovat epileptogenezi, pokud je používán v kombinaci s dalšími terapiemi. Diskutuje se tak o preventivní roli vitamínu E při epileptických záchvatech, kdy snižuje excitotoxicitu, neurozáněty a oxidační stres [8].

### 2.2.3. Biologická účinnost forem vitamínu E

Formy vitamínu E se nedokáží v těle vzájemně přeměňovat. Jejich plazmatická koncentrace je proto závislá na afinitě k jaternímu  $\alpha$ -tokoferol transferinovému proteinu ( $\alpha$ -TTP). Současné poznatky naznačují, že počet methylových skupin a stereochemie fytylového řetězce v místě napojení na chromanolový kruh (pozice 2) určuje afinitu konkrétní formy k  $\alpha$ -TTP, a tím i její efektivní biologickou aktivitu [10].  $\alpha$ -TTP jeví nevyšší afinitu k formám co mají plně methylovaný chromanolový kruh a R konfiguraci na C-2 [8].

Je známo, že koncentrace RRR- $\alpha$ -tokoferolu jsou v lidské plazmě udržovány [10] na 26  $\mu\text{mol/l}$  [11], což však neplatí například pro syntetický SRR- $\alpha$ -tokoferol, nebo přírodní  $\gamma$ -tokoferol. Přestože jsou tyto formy efektivně absorbovány a transportovány prostřednictvím chylomikronů do jater, jsou jen minimálně začleňovány do nově vznikajících lipoproteinů určených k distribuci do periferních tkání. Z toho vyplývá, že relativní aktivita jiných forem než RRR- $\alpha$ -tokoferolu je výrazně nižší [10].

### 2.3. Extrakce z rostlinného materiálu

Samotný proces extrakce je zásadním postupem pro separaci a získávání bioaktivních látek z rostlinného materiálu. Během tohoto procesu se z rostlinné matrice připraví vzorek vhodný pro následné analytické metody. Nejstarší techniky extrakce, jako jsou macerace, infuze, digesce, odvarování (decoction) a perkolace, tvoří základ pro moderní pokročilé extrakční postupy. Mezi ně patří například Soxhletova extrakce, která byla zavedena v 18. století jako pokročilá forma digesce a odvarování. [12]

Všechny zmíněné konvenční metody však mají hlavní nevýhodu – vyžadují velké objemy rozpouštědel a dosahují relativně nízké výtěžnosti. Se zvyšující se poptávkou po rostlinných extraktech proto roste i potřeba efektivnějších, bezpečnějších a rychlejších alternativních metod. Mezi tyto moderní techniky patří například extrakce pomocí mikrovln (MAE), superkritická fluidní extrakce (SFE), extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku (PLE), ultrazvukem asistovaná extrakce (UAE), extrakce pulzním elektrickým polem (PEF) a enzymová extrakce (EAE)[12].

### 2.3.1. Superkritická fluidní extrakce

Superkritická fluidní extrakce je pokročilý extrakční systém, který nachází široké uplatnění v environmentálním, chemickém, potravinářském, zemědělském, farmaceutickém a nutraceutickém průmyslu [12].

Tato technika byla velmi populární v devadesátých letech spolu se superkritickou fluidní chromatografií (SFC), zejména v aplikacích souvisejících s lipidy. Kvůli jejich náročné technické stránce a nenaplněného očekávání bylo jejich použití omezené a komerční zařízení nebyla běžně dostupná. Jednou z velkých překážek tehdejších systémů bylo udržení konstantního tlaku při extrakci. Používaly se totiž tlakové restriktory, které se snadno ucpávaly kvůli poklesu hustoty a ochlazování CO<sub>2</sub> při jeho expanzi na plyn. To následně způsobovalo nepravidelný průtok nadkritického CO<sub>2</sub> skrz nádobu nebo kolonu, což mělo za následek špatnou opakovatelnost procesu [13]. Díky technickému pokroku tyto techniky zažívají v posledních letech rozmach, a to především díky vyvinutí regulátoru zpětného tlaku (BPR) [13,14].

Největší výhodou SFE je, že může být prováděna při nízkých teplotách snadno dosažitelných v laboratoři, což umožňuje zachování téměř všech aktivních složek v extraktu. Výsledný produkt má vysokou čistotu a vysokou výtěžnost. Ve srovnání s jinými extrakčními metodami extrakt neobsahuje vůbec nebo minimální množství reziduí organických rozpouštědel. Samotná extrakce je rychlá s jednoduchou obsluhou. Není nebezpečná z hlediska výbušnosti a hořlavosti použitých rozpouštědel a neznečišťuje životní prostředí. Díky tomu, že probíhá za nízkých teplot, je vhodná pro extrakci tepelně nestabilních složek. Rozpouštěcí vlastnosti použité nadkritické tekutiny lze snadno upravit změnou tlaku při určité teplotě. Zároveň se polarita extrakčního média dá upravit pomocí přídavku organických rozpouštědel, takzvaných modifikátorů nebo kosolventů, což umožňuje extrakci širokého spektra látek. SFE lze také on-line spojit s chromatografickými technikami, jako jsou superkritická fluidní chromatografie, plynová chromatografie či vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Takové zapojení umožňuje pro efektivní a rychlou extrakci, separaci, detekci a stanovení fytochemických látek [15].

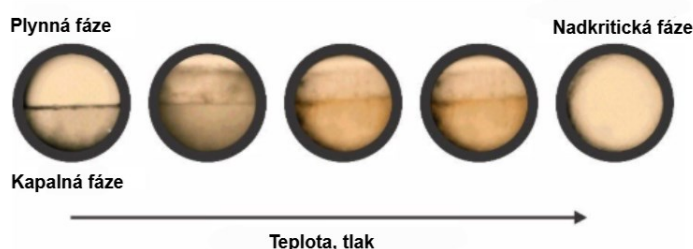
Hlavní nevýhodou SFE je vysoká pořizovací cena, náročnější údržba a čištění zařízení [15]. SFE je používána nejen ve vědeckých laboratořích, ale používá se ve velkém měřítku pro mnoho průmyslových aplikací. Využití SFE lze rozdělit na 2 základní kategorie. Techniku lze používat pro extrakci, tedy získání bioaktivních látek z rostlinného materiálu anebo k odstranění nežádoucích substancí z různých maticí. Nejrozšířenější aplikace SFE je v potravinářství, kde se používá k dekofeinizaci kávy a čaje. Dále lze SFE použít pro extrakci nikotinu z tabáku,

snížení obsahu alkoholu v nápojích (nealkoholické pivo a víno), odstranění cholesterolu z vajec. Tyto procesy používané v potravinářství vyžadují vysokou selektivitu, tak aby byly odstraněny pouze cílené látky, a byla zachována chuť, vzhled, vůně a tvar ošetřovaného surového materiálu, který představuje hlavní produkt. SFE se využívá pro získání potravinářských přísad jako jsou různá aromata, barviva, extrakty bohaté na vitamíny či specifické lipidy. SFE je vhodnou metodou pro získání biologicky aktivních látek z léčivých bylin (antioxidanty), éterických olejů (těkavé sloučeniny), nutraceutik a farmaceutik (lykopen, astaxanthin, hyperforin), olejů ze semen (tokoferoly), oleoresinů z koření a přírodních barviv (karoten, chlorofyl) [16]. Dále se SFE využívá k odstranění pesticidů z různých materiálů. Testovalo se také použití SFE k dekontaminaci půd a odstranění zbytkových rozpouštědel z farmaceutických produktů [16].

### 2.3.2. Nadkritické tekutiny

Nadkritická tekutina (SCF) vznikne překročením kritického tlaku ( $P_c$ ) a teploty ( $T_c$ ) dané látky. Teoreticky jakákoliv látka může být přivedena do nadkritického stavu. V praxi se však používá jen zlomek látek, jelikož spousta látek degraduje před dosažením nadkritického stavu, nebo není vhodná kvůli jejich toxicitě či riziku výbuchu [17].

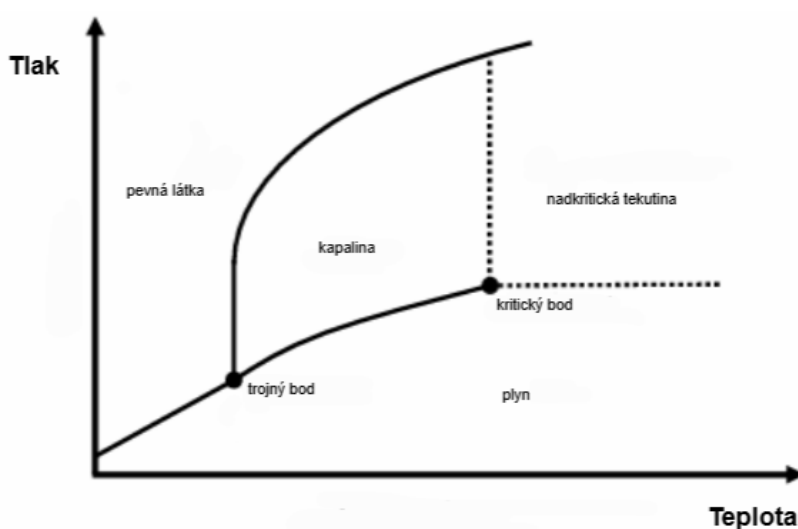
Ve stavu SCF neexistuje kapalná ani plynná fáze. Pokud je kapalná látka v uzavřené nádobě v rovnováze se svou párou a zahřeje se na teplotu vyšší než její kritická teplota, což vede k tlaku vyššímu než je její kritický tlak, rozhraní mezi oběma fázemi se ztratí a zůstane pouze jedna fáze, která vyplní celý prostor nádoby, tedy fáze SCF [18]. Vizualizace tohoto děje je na obrázku 3.



Obr. 3: Ukázka vzniku nadkritické fáze, převzato ze zdroje [19] a upraveno.

SCF kombinuje vlastnosti kapalin (solvatační síla, zanedbatelné povrchové napětí) a plynů (nízká viskozita) [20]. Nízká viskozita vede k vysoké difuzivitě SCF. Díky tomu mají SCF lepší transportní vlastnosti než kapaliny, snadno tedy pronikají do pevných materiálů a tím urychlují proces extrakce [21].

Jednou z hlavních charakteristik SCF je možnost měnit její hustotu úpravou tlaku a/nebo teploty. Protože hustota ovlivňuje rozpustnost, lze změnou tlaku regulovat rozpouštěcí schopnost tekutiny [21]. Tyto vlastnosti ji dělají vhodnou k použití při extrakcích s krátkým časem a se zvýšením výtěžnosti extrahovaných látek [22]. V analytické chemii i během extrakcí se téměř exkluzivně využívá oxid uhličitý, ať už samotný nebo s příměsí [17].



Obr. 4: Příklad fázového diagramu pro čisté látky, převzato ze zdroje [17] a upraveno.

### 2.3.3. Nadkritický CO<sub>2</sub>

Nadkritický CO<sub>2</sub> (scCO<sub>2</sub>) je jednou z nejpoužívanějších nadkritických tekutin. Oproti jiným, jako je nadkritická voda, ethan, metanol aj. má scCO<sub>2</sub> mnoho výhod [21]. Je nehořlavý a levný i ve vysoké čistotě. Snadno se dá dosáhnout jeho kritického bodu (T<sub>c</sub>=31°C, P<sub>c</sub>=74 bar) v laboratorních podmínkách [18]. Je neškodný pro lidské zdraví i pro životní prostředí a splňuje kritéria udržitelnosti, která stále více určují vhodnost chemických procesů. Jeho mírná kritická teplota je klíčová pro zachování bioaktivních sloučenin v extraktech. Plynné skupenství CO<sub>2</sub> při pokojové teplotě umožňuje získat extrakt bez přídavku organických rozpouštědel a bez jakékoliv další úpravy [21].

Nevýhodou scCO<sub>2</sub> je jeho nepolární charakter, který je podobný hexanu nebo heptanu [9]. Je tak vhodný pro extrakci nepolárních látek, jako jsou například karotenoidy, triglyceridy,

mastné kyseliny aj. Není však vhodný pro extrakci polárních látek, jako jsou například fenolické sloučeniny [16].

Tento problém se řeší přidáním polárních organických rozpouštědel, kosolventů, které upravují vlastnosti samotného  $scCO_2$ . Nejčastěji se používá etanol a metanol, které zvyšují nejen polaritu  $scCO_2$ , ale i jeho solvatační sílu. Tyto kosolventy se obvykle přidávají jen v malých množstvích [16], nejčastěji v 1–20 objemových % [23].

Kosolventy lze k  $scCO_2$  přidávat různými způsoby. Nejčastěji se přidávají do čerpacího systému pomocí druhého čerpadla a míchací komory. Dají se také přidat vstříknutím modifikátoru jako kapaliny do vzorku před extrakcí. Tento způsob je ale méně vhodný, protože vede ke vzniku koncentračních gradientů uvnitř vzorku [16].

### **2.3.4. Instrumentace SFE a proces extrakce**

Hlavní součásti přístroje SFE jsou zdroj  $CO_2$ , vysokotlaké čerpadlo, vyhřívací komora (pec), ve které je umístěna extrakční nádoba, a restriktor pro udržení požadovaného tlaku.

Používají se jak injekční, tak pístová čerpadla. Injekční čerpadlo poskytuje stabilnější a plynulejší průtok díky absenci pulzace, díky tomu může probíhat extrakce při vysokých průtocích. Jedinou nevýhodou injekčních čerpadel je omezený objem stříkačky, což může způsobit přerušování extrakce kvůli nutnosti doplnění [23].

Pístová čerpadla jsou méně nákladná než injekční čerpadla, ale jejich objemové dávkování není tak přesné, zejména při nízkých průtocích, a jejich maximální průtok je omezený. Navíc pístová čerpadla vytvářejí tlak v systému, a často je potřeba delší čas k dosažení požadovaného tlaku daného zpětným regulátorem, a to zejména při nízkých průtocích. Zároveň je potřeba aby hlava čerpadla byla opatřena chladicím výměníkem, který ochlazuje kapalné  $CO_2$  a zvyšuje jeho hustotu [23].

Vyhřívací komora řídí teplotu extrakčního procesu. Komora je vybavena ventilátorem, který zajišťuje rovnoměrnou distribuci tepla. Extrakční nádoba by měla být orientována vertikálně s přívodem ve spodní části. To zlepšuje míchání vzorku a snižuje kanálkový efekt („channelling effect“) [23].

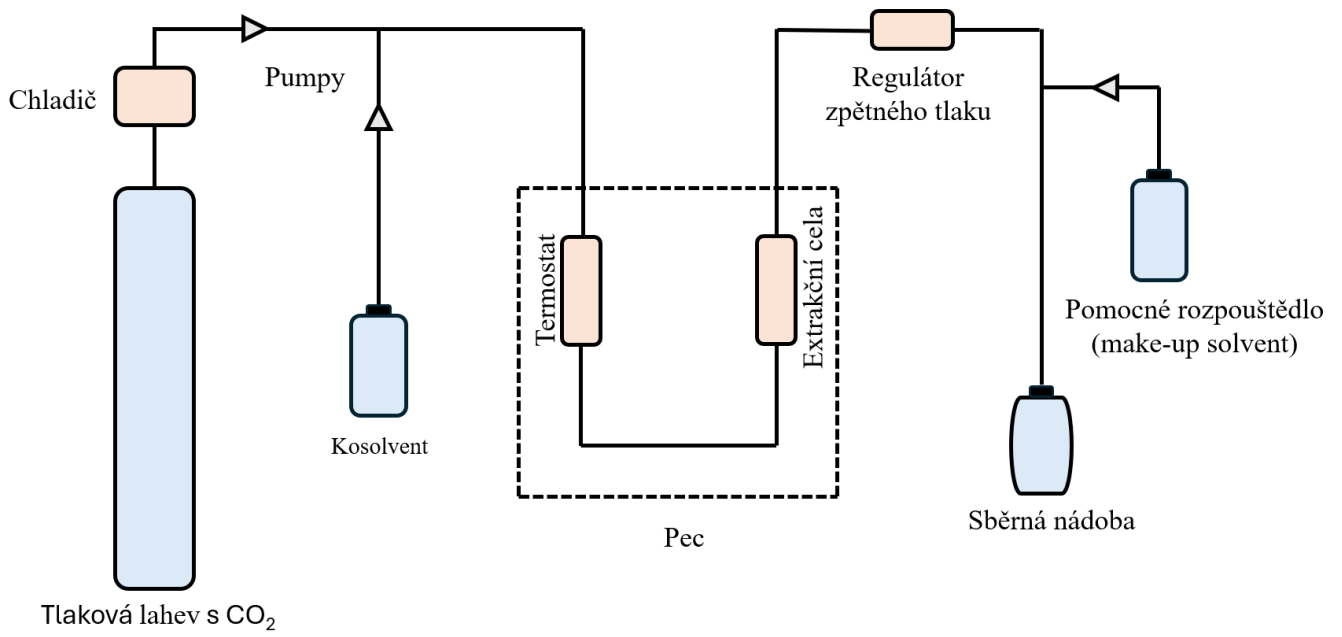
Kanálkový efekt je jev, který vzniká v důsledku rozdílu rychlostních profilů průtoku kapaliny skrze zaplněné médium, což je způsobeno nerovnoměrným hydraulickým odporem. Kapalina má tendenci proudit především skrze volné prostory (void volumes), spíše než skrze těsně naplněné oblasti uvnitř extrakční nádoby. To vede k nehomogennímu průchodu rozpouštědla vzorkem a snižuje výtěžnost extrakce. Jeho efekt se dá minimalizovat také přidáním skleněných kuliček nebo jiných disperzních materiálů, jako je například písek, které

pomáhají rovnoměrněji rozptýlit proudící kapalinu. Ke snížení efektu vede také použití homogenních sférických částic matrice [17].

Regulátor zpětného tlaku kontroluje průtok kapaliny, aby byl v extrakční nádobě udržován požadovaný tlak. Nejčastější techniky používané pro tlakové restriktory v SFE jsou jednoduchý kapilární restriktor nebo mechanický jehlový regulátor. Délka a průměr kapilární trubice určují odpor průtoku, který může být vytvořen, a tím i zpětný tlak. Kapilární restriktor je jednoduchý a levný, ale je obtížné dosáhnout reprodukovatelnosti. Také trpí ucpáváním způsobeným precipitací extraktu nebo tvorbou ledu v důsledku rychlé expanze CO<sub>2</sub>. Mechanické restriktory se naopak skládají z mechanicky nastavitelného ventilu (jehlového ventilu) a sedla. Mezera mezi jehlou a sedlem řídí tlak a průtok. Mechanický restriktor může být ovládán manuálně otáčením ventilu nebo elektronicky prostřednictvím připojení k senzoru hustoty. Tento senzor je naprogramován tak, aby měřil hustotu rozpouštědla, a podle toho řídí mezeru mezi jehlou a sedlem. BPR je připojen k termočláнку, aby byla udržována určitá teplota, což zabraňuje tvorbě ledu a precipitaci extraktu [23].

Za BPR může být v systému přes T-kus zapojeno další čerpadlo, které slouží k přidávání pomocného rozpouštědla (make-up solvent). Pomocné rozpouštědlo, nebo také přídavná kapalina, zabraňuje precipitaci extraktu po snížení tlaku v oblasti za BPR a také umožňuje efektivní převedení a sbírání extraktu v případě, že je použito malé množství kosolventu [23,24].

Průběh extrakce probíhá obvykle následujícím způsobem. Stlačený oxid uhličitý je v kapalném stavu v tlakové nádobě. Při zahájení procesu je kapalný CO<sub>2</sub> čerpán, ohříván, míchán s kosolventem v požadovaných poměrech a veden do extrakční cely, která je již naplněna extrahovaným materiálem. Poté směs scCO<sub>2</sub> a kosolventu prochází extrakční celou, opouští ji s rozpuštěnými látkami a je dekompresováno ventilem regulátoru zpětného tlaku. Rozpouštěcí schopnost výsledné směsi je ovlivněna použitým kosolventem. To může způsobovat precipitaci extraktu ve sběrné nádobě [23]. Tento popsaný postup se nazývá dynamický mód extrakce, jelikož přes celu se vzorkem neustále proudí nové rozpouštědlo. Další způsob, kterým se dá SFE provádět, je statický mód extrakce, kdy se extrakční cela naplní rozpouštědlem a vzorek se v tomto konstantním objemu rozpouštědla extrahuje požadovaný čas. Oba dva módy lze kombinovat [17].



Obr. 5: Schéma SFE instrumentace.

### 3. Experimentální část

#### 3.1. Použité přístrojové vybavení a pomůcky

- Mlýnek IKA A11 basic (Fischer scientific, Česká republika)
- Síta (Stavební strojírenství n.p. Brno, závod Ivančice, Československo)
- Skleněné kuličky (Waters, Česká republika)
- Ultrazvuková lázeň DU-32 (Argo Lab, Itálie)
- Analytické váhy HR-120 (A&D company, Japonsko)
- Systém SFE MV-10 (Waters, USA)
- Vakuová odparka Concentrator plus 5305 (Eppendorf, Česká republika)
- Centrifuga MIKRO 220R (Hettich, Německo)
- Vortex IKA Genius 3 (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Automatické pipety se špičkami (Eppendorf, Česká republika)
- Injekční jednorázové stříkačky HSW HENKE-JECT (Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Německo)
- injekční jehly Medoject, 1,2 mm x 40 mm (Chirana T. Injecta, a.s.; Stará Turá, Slovensko)
- Stříkačkové filtry FilterPure, PTFE/L, 0,22  $\mu\text{m}$  (Chromservis, Praha, Česká republika)
- Skleněné vialky s uzávěrem (Chromservis, Česká republika)
- Systém SFC Acquity UPC<sup>2</sup> s detektorem Acquity QDa (Waters, Milford, MA, USA)
- Kolona Acquity UPC<sup>2</sup> BEH 2-EP (Bridge ethylen hybrid 2-ethyl pyridine) 3x100mm, 1,7  $\mu\text{m}$  (Waters, Milford, MA, USA)
- Software Empower 3 (Waters, Praha, Česká republika)

#### 3.2. Použité chemikálie

- Etanol absolutní, čistota > 99,7 % (VWR International s.r.o., Česká republika)
- Metanol Optima LC/MS Grade, čistota  $\geq 99,9$  % (Fisher Chemical, Česká republika)
- Oxid uhličitý čistota > 99,995 % (Messer, Česká republika)
- Heptan (HPT) Chromasolv, pro HPLC, čistota  $\geq 99$  % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- Propan-2-ol (IPA):  $\geq 99,9\%$  (Honeywell, Německo)

- Standardy forem vitamínu E :
  - $\alpha$ -tokoferol ( $\alpha$ T; 100 mg/ml, čistota 99,9 %),  $\beta$ -tokoferol ( $\beta$ T; 50 mg/ml, čistota 99,0 %),  $\gamma$ -tokoferol ( $\gamma$ T; 1 mg/ml, čistota 97,3 %) a  $\delta$ -tokoferol ( $\delta$ T; 100 mg/ml, čistota 95,5 %) v hexanu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
  - $\alpha$ -tokotrienol ( $\alpha$ T3; 25 mg/ml, čistota 98 %),  $\beta$ -tokotrienol ( $\beta$ T3; 25 mg/ml, čistota 98 %),  $\gamma$ -tokotrienol ( $\gamma$ T3; 25 mg/ml, čistota 98 %) a  $\delta$ -tokotrienol ( $\delta$ T3; 25 mg/ml, čistota 98 %) v etanolu (Larodan Fine Chemicals, Malmö, Švédsko)

### 3.3. Příprava roztoků pro ředění standardů a odpařených extraktů

Pro ředění standardu, rozpouštění a ředění odpařených extraktů byla použita směs heptanu a isopropanolu v objemovém poměru 9/1.

### 3.4. Příprava standardů

Základní roztok (ZR) byl připraven ze standardů jednotlivých forem vitamínu E tak, aby výsledná koncentrace ZR byla 100  $\mu$ g/ml. Z tohoto roztoku byly připravovány standardy používané pro analýzu. Připravené pracovní roztoky standardů obsahovaly 0,1  $\mu$ g/ml, 0,5  $\mu$ g/ml a 1  $\mu$ g/ml jednotlivých forem vitamínu E.

První standard byl připraven smícháním 10  $\mu$ l ZR a 990  $\mu$ l směsi HPT/IPA.

Druhý standard byl připraven smícháním 5  $\mu$ l ZR a 995  $\mu$ l HPT/IPA.

Třetí standard byl připraven smícháním 100  $\mu$ l prvního standardu a 900  $\mu$ l HPT/IPA.

### 3.5. Optimalizace SFE

#### 3.5.1. Příprava vzorků pro extrakci

Jako vzorek byly použity sušené květy měsíčku lékařského (*Calendula officinalis* L., čeleď Asteraceae), Měsíčkový květ, značky Megafyt Pharma, který byl zakoupen v lékárně. Tyto květy byly nejprve rozemlety pomocí mlýnku IKA A11 basic a následně prosety přes síta s různými velikostmi ok. Tím vznikly skupiny vzorků s různými průměry částic: 0,630 mm, 0,315 mm, 0,018 mm a 0,008 mm. Nejvíce částic bylo ve skupině částic o velikosti 0,315 mm, celková hmotnost této části činila 16,5 g. Proto byla tato skupina vybrána jako hlavní vzorek pro následující experimenty.

Navážka vzorku pro extrakci byla 0,50 g. Vzorek byl následně přesypán do 5ml extrakční ocelové cely mezi vrstvu skleněných kuliček o průměru 3 mm, které vyplňovaly zbývající objem cely. Extrakční cely byla následně zapojena do systému pomocí kovových kapilár tak, aby rozpouštědlo vstupovalo zespodu a vystupovalo vrchním otvorem.

Při UAE byla použita z nedostatku materiálu jedna 0,5 g navážka 0,315 mm částic a pět 0,5 g navážek 0,018 mm částic. Ty byly vsypány do 15ml plastových zkumavek a zality 10 ml etanolu a takto připravený vzorek se nechal extrahovat 15 min při 40 °C v ultrazvuku.

### **3.5.2. Optimalizace podmínek extrakce**

Během optimalizace byl testován vliv množství kosolventu v CO<sub>2</sub>, tlaku a teploty, které patří mezi klíčové parametry SFE. Průtok extrakčního činidla byl udržován konstantní na hodnotě 2 ml/min a extrakce probíhala vždy po dobu 15 minut. Po každé extrakci byl systém propláchnut směsí CO<sub>2</sub>/etanol a následně čistým CO<sub>2</sub>. Extrakční cely byly rozebrány, omyty destilovanou vodou a etanolem. Těsnění byla při větším zanesení matricí očištěna kartáčem a následně čištěna pomocí ultrazvukové lázně.

Byly testovány následující objemové poměry CO<sub>2</sub> a etanolu použitého jako kosolvent: 98/2; 90/10; 80/20. Pokud extrakční rozpouštědlo obsahovalo 2 % etanolu, byl extrakt smísen s pomocnou kapalinou, etanolem, o průtoku 0,6 ml/min. Vliv tlaku byl testován při hodnotách 100 bar, 200 bar a 300 bar a vliv teploty při 40 °C, 60 °C a 80 °C. Pro každý parametr byly provedeny dvě extrakce, celkem bylo provedeno 18 extrakcí. Na základě těchto experimentů byly určeny optimální podmínky pro extrakci.

Následně byla ověřována opakovatelnost extrakce. Bylo provedeno celkem 9 extrakcí ve 3 následujících dnech, z nichž byly vyhodnoceny výsledky.

V posledním kroku se testoval vliv velikosti částic vzorku na extrakci za optimalizovaných podmínek. Porovnávaly se částice o velikostech 0,630 mm, 0,315 mm a 0,018 mm, pro každou velikost byly provedeny dvě extrakce.

### **3.5.3. Úprava získaného extraktu**

Získaný extrakt byl sbírán do 15ml plastových zkumavek a následně byl odpařen pomocí vakuové odparky při teplotě 60 °C. Odpaření extraktů bylo nezbytné pro zajištění porovnatelnosti výsledných koncentrací analytů z důvodu odlišných objemů jednotlivých extraktů. Odpařené extrakty byly skladovány v mrazícím boxu při -20 °C.

Před analýzou byly odpařené extrakty rozpuštěny v 1 ml směsi HPT/IPA v objemovém poměru 9/1 a přefiltrovány přes injekční stříkačku vybavenou filtrem o velikosti pórů 0,2 μm. Přefiltrovaný extrakt byl následně 10× naředěn směsí HPT/IPA v objemovém poměru 9/1, aby se jeho koncentrace blížila připraveným standardům. Takto připravené vzorky byly následně analyzovány.

Vzorky pro UAE byly po extrakci centrifugovány a následný supernatant byl převeden do nové zkumavky, odpařen, zpracován a analyzován stejným způsobem, jako vzorky u SFE.

### 3.6. SFC-MS analýza

Pro analýzu extraktu byla zvolena metoda, která je publikována v odborném článku [9]. Podmínky analýzy jsou stručně shrnuty.

Analýzy byly provedeny na superkritickém fluidním chromatografickém systému Acquity UPC<sup>2</sup>, který se skládal z binárního čerpadla, automatického dávkovače vzorků, kolonového termostatu, regulátoru zpětného tlaku a detektoru s diodovým polem. Systém byl spojen s hmotnostním spektrometrem typu jednoduchého kvadrupólu s ionizací elektrosprejem (ESI). Separace probíhala na koloně Acquity UPC<sup>2</sup> BEH 2-EP za použití isokratické eluce. Jako mobilní fáze byla použita směs CO<sub>2</sub> a metanolu s 10 mmol/l mravenčanem amonným v objemovém poměru 95/5 a průtoku 1,5 ml/min. Teplota kolony a tlak na BPR byly nastaveny na 50 °C a 130 bar.

Detekce pomocí hmotnostního spektrometru byla provedena v pozitivním módu ESI. Parametry iontového zdroje byly nastaveny následovně: napětí na kapiláře 0,80kV, teplota iontového zdroje 120 °C, teplota sondy 600 °C, napětí extrakčního kuželu bylo nastaveno pro každý analyt zvlášť ( $\alpha T$ ,  $\alpha T3 = 10$  V;  $\beta T$ ,  $\gamma T$ ,  $\delta T$ ,  $\beta T3$ ,  $\gamma T3$ ,  $\delta T3 = 5$  V).

Analýza byla prováděna v módu SIM (monitorování vybraného iontu) experimentu, kdy byly sledovány prekurzory  $[M+H]^+$ :  $\alpha T = 431,0$ ;  $\beta T$ ,  $\gamma T = 417,0$ ;  $\delta T = 403,0$ ;  $\alpha T3 = 425,3$ ;  $\beta T3$ ,  $\gamma T3 = 411,3$ ;  $\delta T3 = 397,3$  [9].

Pro spuštění analýzy, kontrolu probíhající analýzy a pro úpravu (integraci píků) nashromážděných dat byl použit software Empower 3.6.0.

### 3.7. Hodnocení výsledků

#### 3.1. Výpočet koncentrací vzorků

Naměřená data byla zpracována pomocí softwaru Empower, kde byly získány plochy píků (A) analyzovaných vzorků a standardů. Každý vzorek byl nastříknut na kolonu třikrát, pro výpočet byly použity vypočítané průměry.

Koncentrace jednotlivých isoformů vitamínu E ve vzorku byla počítána podle vzorce:

$$c = \left( \frac{A_{vz} \cdot c_{st}}{A_{st}} \right) \cdot 10$$

$A_{vz}$  vyjadřuje plochu píku ve vzorku,  $A_{st}$  představuje plochu standardu. Koncentrace standardu použitá pro výpočet byla 1  $\mu\text{g/ml}$ . Číslo 10 představuje zředění extraktu.

#### 3.2. Směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka

Důležitými nástroji při hodnocení výsledků byl výpočet směrodatné odchylky SD a relativní směrodatné odchylky RSD.

SD vyjadřuje průměrnou odchylku od průměru, říká, jak moc jsou data rozptýlená. Vypočítá se následujícím vzorcem.:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$N$  představuje počet měření,  $x_i$  naměřené hodnoty,  $\bar{x}$  aritmetický průměr naměřených hodnot.

RSD vyjadřuje, kolik procent z průměru tvoří směrodatná odchylka neboli, jak velká je variabilita hodnot v porovnání s jejich průměrnou hodnotou. Vypočítá se podle následujícího vzorce:

$$RSD = \left( \frac{SD}{\bar{x}} \right) \cdot 100$$

## 4. Výsledky

### 4.1. Optimalizace základních parametrů

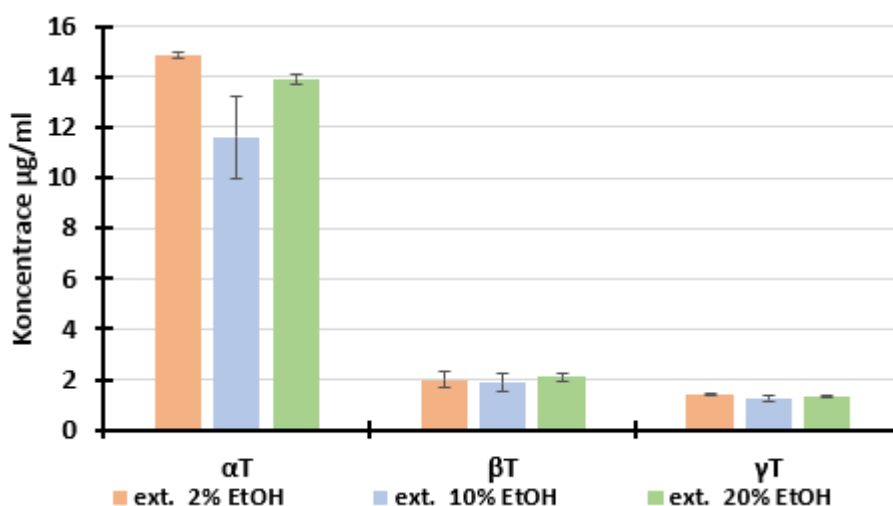
Byly optimalizovány 3 klíčové parametry. Jako první se zkoumalo množství kosolventu v extrakčním rozpouštědle. Dále se pokračovalo s testováním tlaku a nakonec teploty.

Jako vedlejší parametr se po optimalizaci klíčových parametrů zjišťoval vliv velikosti částic matrice.

#### 4.1.1 Vliv množství kosolventu v CO<sub>2</sub>

V prvním kroku se testovalo množství kosolventu v extrakčním rozpouštědle. Extrakční rozpouštědlo bylo složeno ze směsi oxidu uhličitého a etanolu o objemových poměrech 98/2, 90/10, 80/20. Etanol byl jako kosolvent vybrán kvůli jeho dobré mísitelnosti s CO<sub>2</sub>, schopnosti rozpouštět vitamín E a ekologické nezávadnosti.

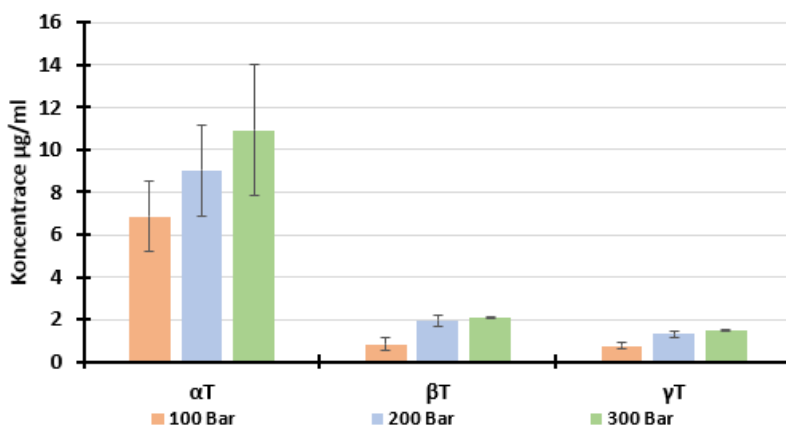
Nejvyšší výtěžnosti, tedy získaná množství 3 forem vitamínu E, tj.  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -tokoferolu, byly získány s 2 % přídavkem etanolu, jak jde vidět na grafu (Obr.4). Tento výsledek byl očekáván především z důvodu nižší polaritě vitamínu E, který je dobře rozpustný v nepolárním CO<sub>2</sub>. Vyšší přídavek polárnějšího etanolu výtěžnost extrakce nezlepšil, naopak byl pozorován pokles. Proto bylo použito při testování dalších parametrů extrakční rozpouštědlo o složení 2 % etanolu a 98 % CO<sub>2</sub>.



Obr. 6 Graf závislosti koncentrace isoform vit. E na množství přidaného etanolu.

### 4.1.2. Vliv tlaku

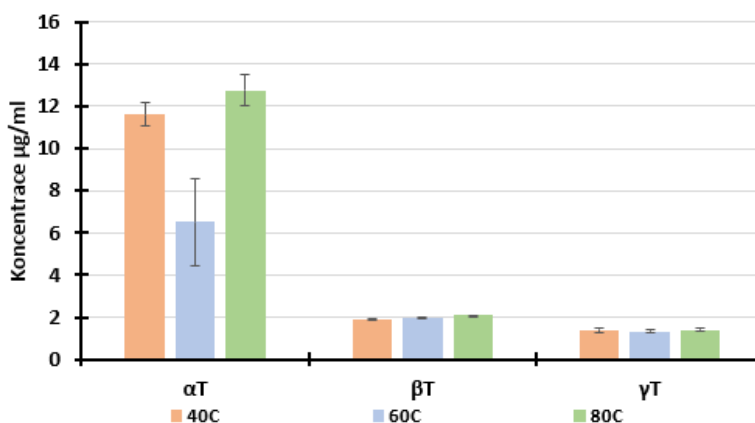
Postupné zvyšování tlaku z nižších hodnot na vyšších, tedy ze 100 bar, na 200 bar a 300 bar, vedlo ke zvýšení extrakční výtěžnosti. Nejvyšší výtěžnost, zejména alfa-tokoferolu, byla při 300 bar. Tlak totiž ovlivňuje vlastnosti nadkritické kapaliny tak, že s rostoucím tlakem stoupá její hustota. To má za následek zvýšení rozpouštěcí schopnosti  $\text{scCO}_2$  a zvyšuje se tedy účinnost extrakce. Hodnota 300 bar byla tedy zvolena pro následující experimenty.



Obr. 7 Graf závislosti koncentrace isoformů vit. E na použitém tlaku při extrakci.

### 4.1.3. Vliv teploty

Zvyšující se teplota také vedla ke zvýšení výtěžnosti extrakce. Největší výtěžnost tedy byla pozorována při 80 °C. Teplota ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti nadkritické tekutiny tak, že zvyšuje její difuzi a tím pádem rychleji proniká mezi částice vzorku a lépe uvolňuje látky z matrice. Zároveň také vyšší teplota snižuje viskozitu a tím také napomáhá snadnějšímu pronikání do matrice. Hodnota 80 °C byla tedy vybrána jako nejlepší pro následující experimenty.



Obr. 8 Graf závislosti koncentrace isoformů vit. E na použité teplotě při extrakci.

## 4.2. Finální podmínky a opakovatelnost extrakce

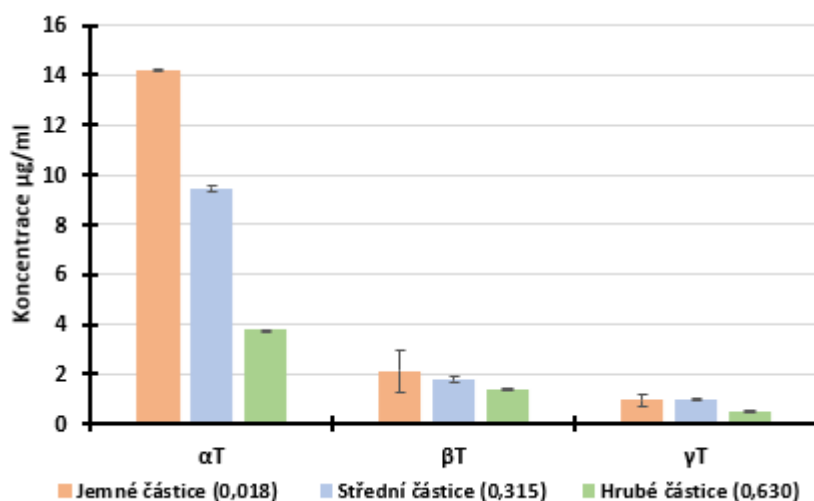
Jako optimální parametry pro extrakci vitamínu E z měsíčku byly zvoleny následující: přidavek etanolu 2 %, tlak 300 bar a teplota 80 °C.

Za těchto podmínek byla ověřena opakovatelnost na celkem 9 extrakcích, které byly prováděny ve třech následujících dnech (3 extrakce/den). Získané extrakty vždy obsahovaly  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -tokoferol. V extraktech bylo obsaženo 9,5  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -tokoferolu, RSD 9,1 %, 1,8  $\mu\text{g/ml}$   $\beta$ -tokoferolu, RSD 6,9 %, a 1  $\mu\text{g/ml}$   $\gamma$ -tokoferolu, RSD 4,8 %.

## 4.3. Vliv velikosti částic

Pro všechny předchozí experimenty byl použitý částice homogenizovaného květu měsíčku o průměru 0,315mm. Protože k dispozici byly větší částice o průměru 0,630mm i menší částice o průměru 0,018mm, byl testován vliv jejich velikosti na extrahované množství látek. Jak vyplývá z grafu na Obr. 8, výtěžnost byla nejvyšší u nejmenších částic. Průměrně se z nich získalo 14,2  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -tokoferolu, RSD 0,4 %, 2,1  $\mu\text{g/ml}$   $\beta$ -tokoferolu, RSD 5,8 % a 0,9  $\mu\text{g/ml}$   $\gamma$ -tokoferolu, RSD 0,1. Největší částice vykazovaly nejnižší výtěžnosti s průměrným ziskem 3,8  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -tokoferolu, RSD 6,0 %, 1,4  $\mu\text{g/ml}$   $\beta$ -tokoferolu, RSD 3,5 %, a 0,5  $\mu\text{g/ml}$   $\gamma$ -tokoferolu, RSD 8,0 %.

Předpokládáme, že v tomto jevu hraje roli kanálkový efekt (channeling effect), kdy menší částičky umožňují lepší kontakt s rozpouštědlem a poskytují větší plochu pro samotnou extrakci. Přidané kuličky mezi částicemi tento kontakt dále podporují a pomáhají zajistit rovnoměrnější průchod rozpouštědla, minimalizují vznik nežádoucích kanálků a zlepšují efektivitu extrakce.



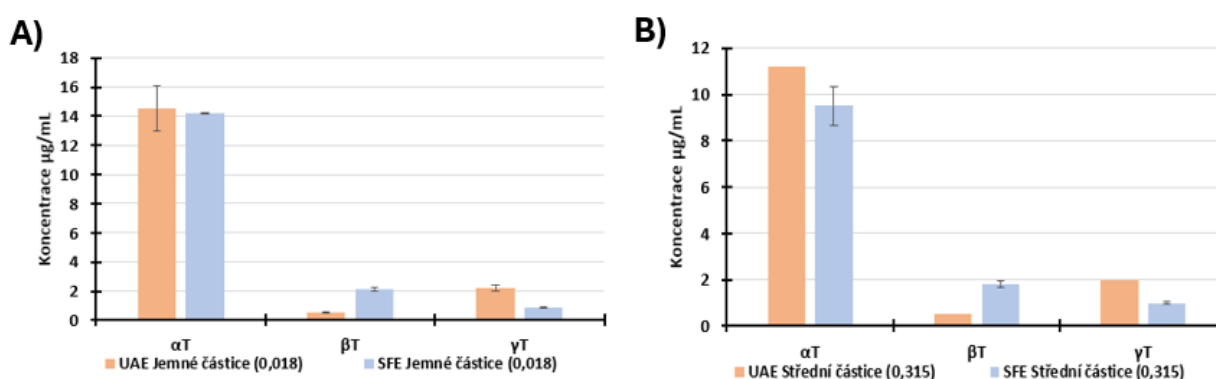
Obr. 9 Graf závislosti koncentrace isoformů vit. E na velikosti částic měsíčku lékařského.

#### 4.4. Porovnání zoptimalizované metody s tradiční metodou extrakce pomocí organického rozpouštědla

Metoda UAE byla provedena podle článku [25]. Vzorek byl extrahován v 6 replikátech. Z důvodu nedostatku materiálu obsahoval jeden vzorek částice o velikosti 0,315 mm a zbylých 5 vzorků obsahovalo částice o velikosti 0,018 mm.

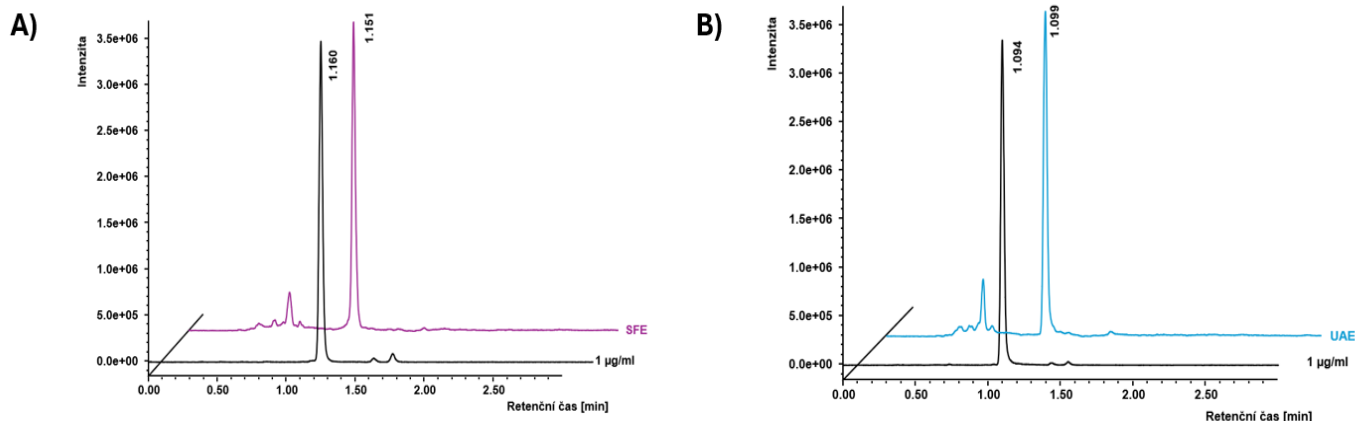
Z extraktu s většími částicemi bylo získáno průměrně 11,2  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -tokoferolu, 1,4  $\mu\text{g/ml}$   $\beta$ -tokoferolu a 2,0  $\mu\text{g/ml}$   $\gamma$ -tokoferolu. Z jemných částic bylo získáno 14,5  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -tokoferolu, RSD 10,7 %, 0,5  $\mu\text{g/ml}$   $\beta$ -tokoferolu, RSD 9,2 %, a 2,1  $\mu\text{g/ml}$   $\gamma$ -tokoferolu, RSD 10,2 %.

Z hodnot uvedených výše a z grafu na obrázku č 9. je patrné, že UAE má lehce větší výtěžnost než SFE, ale má horší opakovatelnost.

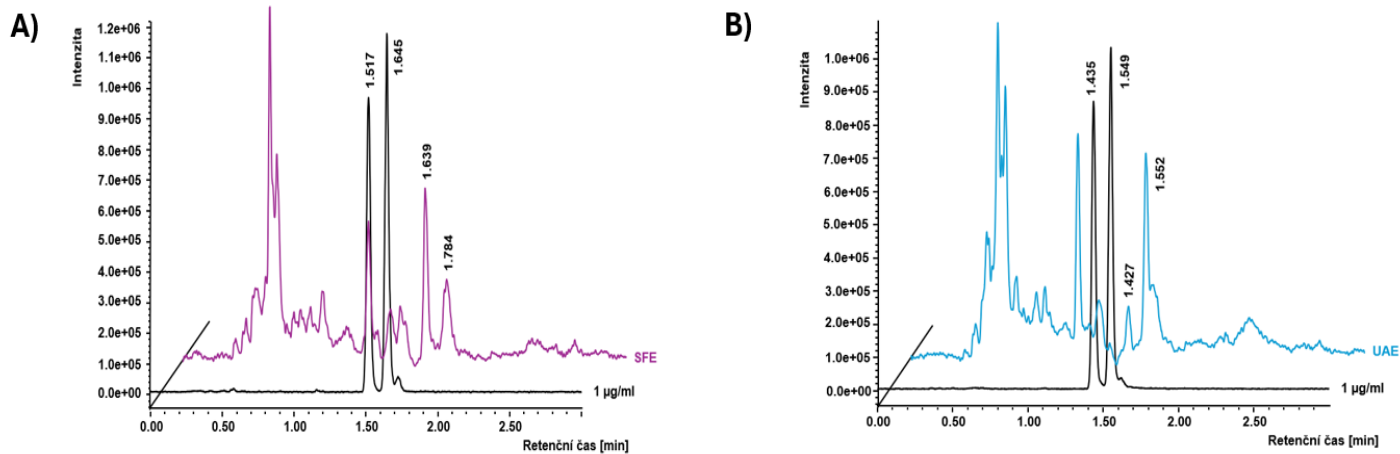


Obr. 10 Grafické znázornění výtěžnosti UAE a SFE u menších (A) a větších částic (B).

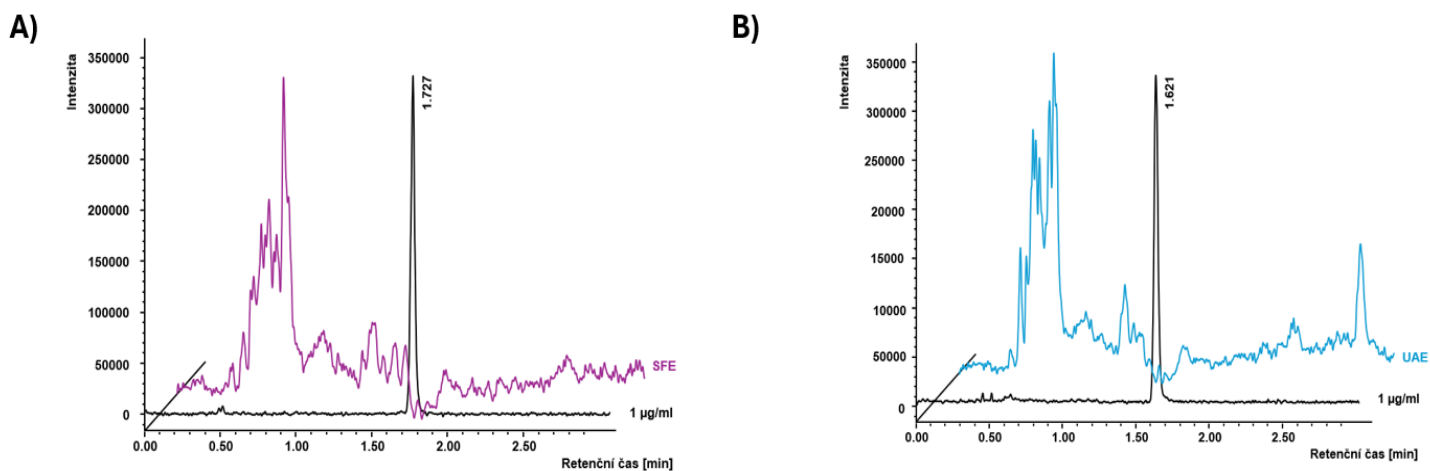
Z následujících chromatogramů na obrázcích č. 12 až 16 je vidět, že extrakty získané pomocí SFE jsou méně zatíženy příspěvkem matrice, v záznamu je tedy patrné méně píků balastních látek, což umožňuje lepší integraci píků a zlepšuje reprodukovatelnost výsledků analýz. Toto poukazuje na lepší přečištění extraktu pomocí SFE. Pro ilustraci jsou znázorněna data také pro analyty, které nebyly v extraktech detekovány, tedy pro  $\delta$ -tokoferol a  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ -tokotrienol.



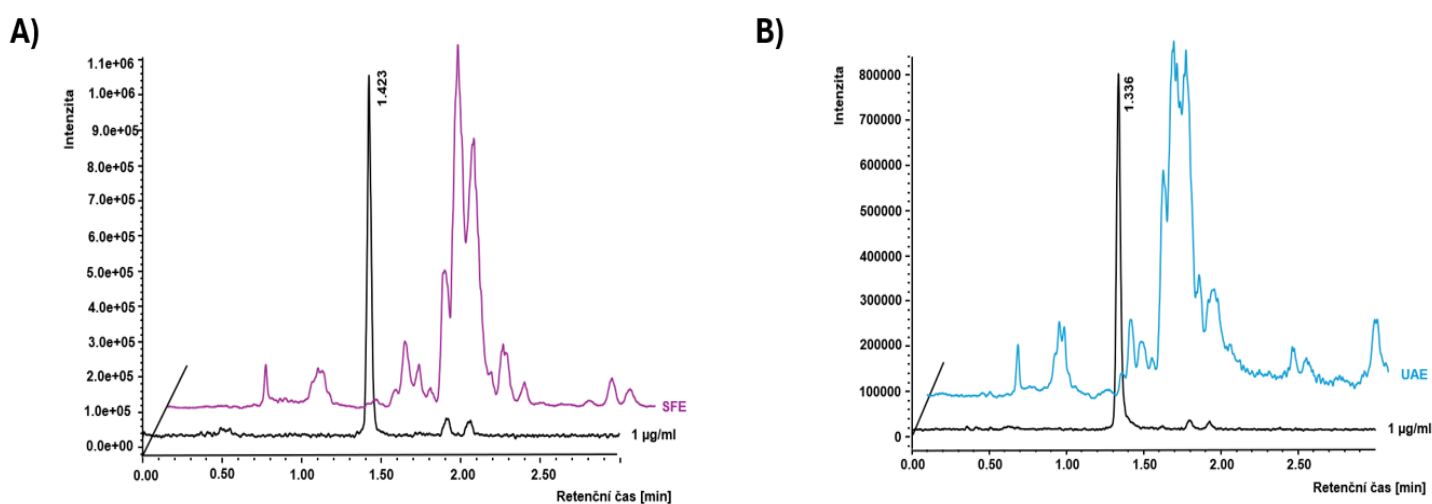
Obr. 11 Chromatogram  $\alpha$ -tokoferolu extrahovaného pomocí SFE (A) a UAE (B), chromatogram obsahuje záznam standardu (černě) a extraktu (růžový-SFE a modrý-UAE). Obě separace probíhaly při isokratické eluci za těchto podmínek: mobilní fáze – směs  $\text{CO}_2$  a metanolu s 10 mmol/l mravenčanem amonným v objemovém poměru 95/5, průtok 1,5 ml/min, teplota kolony 50 °C, tlak BPR 130 bar.



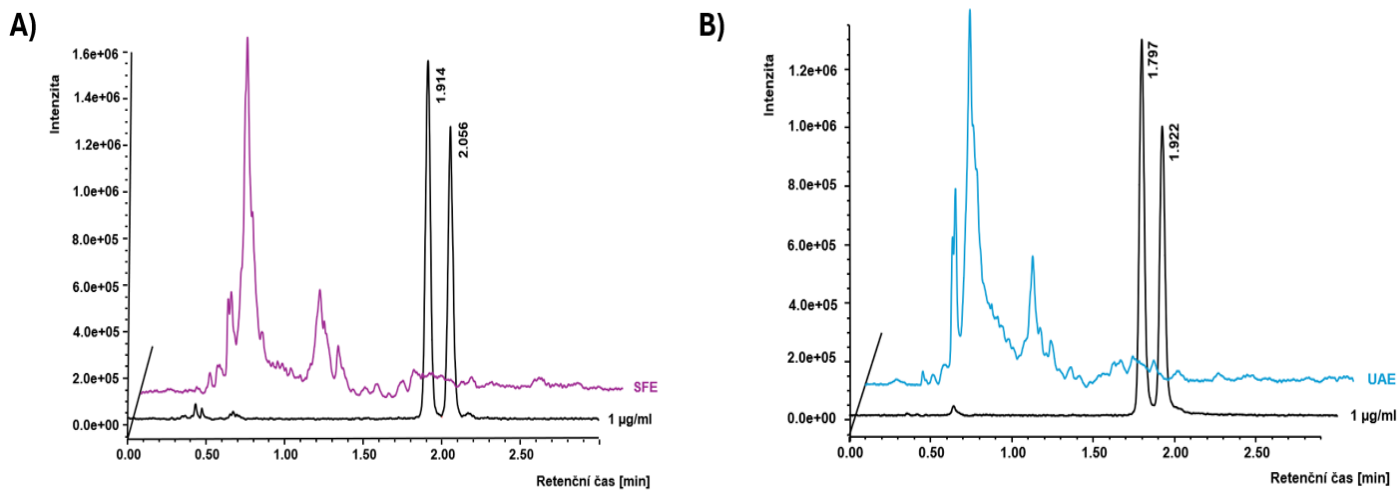
Obr. 12 Chromatogram  $\beta$ -tokoferolu a  $\gamma$ -tokoferolu extrahovaného pomocí SFE (A) a UAE (B), chromatogram obsahuje záznam standardu (černě) a extraktu (růžový-SFE a modrý-UAE). Separace probíhala za stejných podmínek, jako je popsáno u obrázku 11.



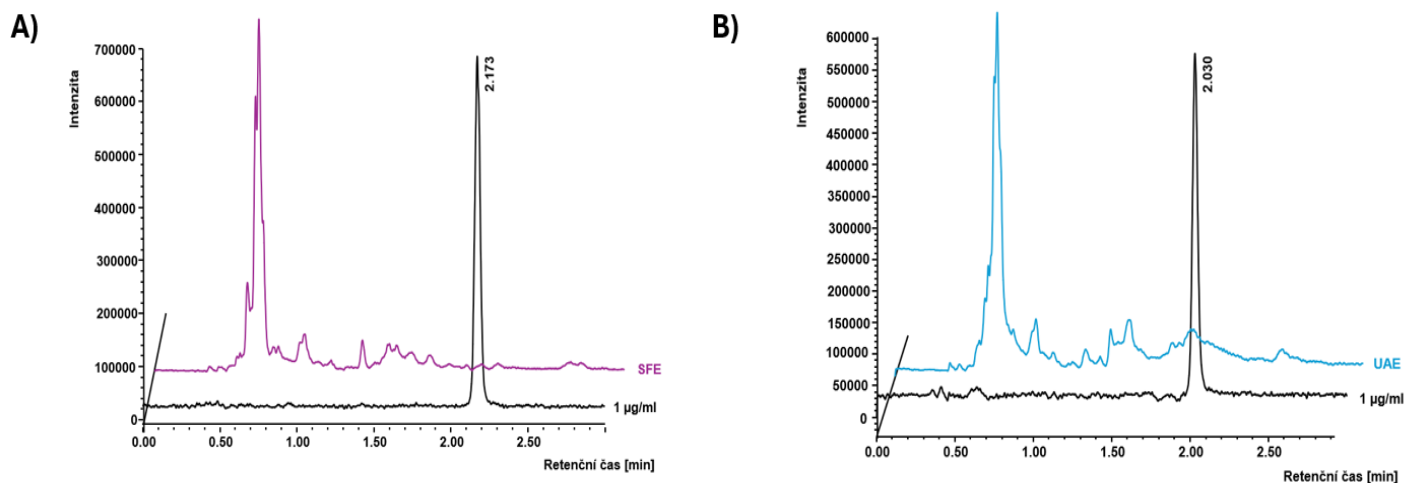
Obr. 13 Chromatogram  $\delta$ -tokoferolu extrahovaného pomocí SFE (A) a UAE (B), chromatogram obsahuje záznam standardu (černě) a extraktu (růžový-SFE a modrý-UAE). Separace probíhala za stejných podmínek, jako je popsáno u obrázku 11.



Obr. 14 Chromatogram  $\alpha$ -tokotrienolu extrahovaného pomocí SFE (A) a UAE (B), chromatogram obsahuje záznam standardu (černě) a extraktu (růžový-SFE a modrý-UAE). Separace probíhala za stejných podmínek, jako je popsáno u obrázku 11.



Obr. 15 Chromatogram  $\beta$ -tokotrienolu a  $\gamma$ -tokotrienolu extrahovaného pomocí SFE (A) a UAE (B), chromatogram obsahuje záznam standardu (černě) a extraktu (růžový-SFE a modrý-UAE). Separace probíhala za stejných podmínek, jako je popsáno u obrázku 11.



Obr. 16 Chromatogram  $\delta$ -tokotrienolu extrahovaného pomocí SFE (A) a UAE (B), chromatogram obsahuje záznam standardu (černě) a extraktu (růžový-SFE a modrý-UAE). Separace probíhala stejných podmínek, jako je popsáno u obrázku 11.

## 5. Závěr

Bylo potvrzeno, že vitamín E lze úspěšně extrahovat pomocí superkritické fluidní extrakce. Zjistili jsme, že s rostoucí teplotou i tlakem se zvyšuje množství vyextrahovaných tokoferolů, zatímco vyšší podíl polární složky v extrakčním médiu výtěžnost snižuje. Dále se ukázalo, že čím menší jsou částice matrice, tím vyšší je výtěžnost tokoferolů.

Optimální podmínky extrakce byly stanoveny na teplotu 80 °C, tlak 300 bar a přídavek etanolu v množství 2 %. Za těchto podmínek byla dosažena maximální výtěžnost 9,5 µg/ml  $\alpha$ -tokoferolu s relativní směrodatnou odchylkou (RSD) 3,0 %, 1,8 µg/ml  $\beta$ -tokoferolu (RSD 4,8 %) a 1,0 µg/ml  $\gamma$ -tokoferolu (RSD 5,1 %). Při použití nejmenších částic o velikosti 0,018 mm se průměrná výtěžnost ještě zvýšila na 14,2 µg/ml  $\alpha$ -tokoferolu, 2,1 µg/ml  $\beta$ -tokoferolu a 0,9 µg/ml  $\gamma$ -tokoferolu, což potvrzuje, že menší velikost částic vede k efektivnější extrakci.

Z hodnot relativní směrodatné odchylky vyplývá, že metoda vykazuje dobrou opakovatelnost. Při srovnání SFE s ultrazvukovou asistovanou extrakcí bylo zjištěno, že SFE má o něco nižší výtěžnost, avšak její extrakty obsahují méně balastních látek a samotný proces je opakovatelnější. Pokud je tedy cílem získat čistší extrakt se stabilnějšími koncentracemi cílových látek, představuje SFE vhodnější volbu.

## 6. Seznam použité literatury

- [1] Jahodář Luděk, Farmaceuticky významné semenné rostliny, Charles University in Prague, Karolinum Press, 2022, 2022.
- [2] P.M. Kašparová, Měsíček lékařský-významné lokální antiflogistikum, n.d. <https://farmaciepropraxi.cz/pdfs/lek/2008/04/10.pdf> (accessed October 9, 2024).
- [3] Měsíček lékařský, (n.d.). <https://www.otehotneni.cz/a/mesicek-lekarsky> (accessed January 5, 2025).
- [4] D. Herbsová, Superkritická fluidní extrakce pro izolaci biologicky aktivních látek z rostlinného materiálu (rešeržní práce), Hradec Králové, 2020. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/117415> (accessed January 5, 2025).
- [5] D. Sikora, Analýza vybraných látek z rostliny *Calendula officinalis* L., Zlín, 2010.
- [6] B. Chitrakar, M. Zhang, B. Bhandari, Edible flowers with the common name “marigold”: Their therapeutic values and processing, *Trends Food Sci Technol* 89 (2019) 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.008>.
- [7] D.J. Mustacich, R.S. Bruno, M.G. Traber, Vitamin E, *Vitam Horm* 76 (2007) 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(07\)76001-6](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(07)76001-6).
- [8] F. Zaaboul, Y.F. Liu, Vitamin E in foodstuff: Nutritional, analytical, and food technology aspects, *Compr Rev Food Sci Food Saf* 21 (2022) 964–998. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12924>.
- [9] V. Pilařová, T. Gottvald, P. Svoboda, O. Novák, K. Benešová, S. Běláková, L. Nováková, Development and optimization of ultra-high performance supercritical fluid chromatography mass spectrometry method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum, *Anal Chim Acta* 934 (2016) 252–265. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.008>.
- [10] Dietary reference intakes : for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids, National Academy Press, 2000. <https://doi.org/10.17226/9810>.
- [11] P. Borel, M. Moussa, E. Reboul, B. Lyan, C. Defoort, S. Vincent-Baudry, M. Maillot, M. Gastaldi, M. Darmon, H. Portugal, R. Planells, D. Lairon, Human Plasma Levels of Vitamin E and Carotenoids Are Associated with Genetic Polymorphisms in Genes Involved in Lipid Metabolism 1-3, 2007.
- [12] T. Belwal, S.M. Ezzat, L. Rastrelli, I.D. Bhatt, M. Daglia, A. Baldi, H.P. Devkota, I.E. Orhan, J.K. Patra, G. Das, C. Anandharamakrishnan, L. Gomez-Gomez, S.F. Nabavi,

- S.M. Nabavi, A.G. Atanasov, A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 100 (2018) 82–102. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.018>.
- [13] C. Turner, From supercritical carbon dioxide to gas expanded liquids in extraction and chromatography of lipids, *Lipid Technol* 27 (2015) 275–277. <https://doi.org/10.1002/lite.201500060>.
- [14] The Promise of Supercritical Fluid Extraction and Chromatography: What You Need to Know to Advance Your Product Research, n.d.
- [15] W. Feng, M. Li, Z. Hao, J. Zhang, Analytical Methods of Isolation and Identification, in: *Phytochemicals in Human Health*, IntechOpen, 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88122>.
- [16] M. Cvjetko Bubalo, S. Vidović, I. Radojčić Redovniković, S. Jokić, New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents, *Food and Bioproducts Processing* 109 (2018) 52–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001>.
- [17] V. Abrahamsson, *Fundamental research on supercritical fluid extraction kinetics: From on-line measurements to inverse modeling*, Lud University, 2016. ISBN: 978-91-7422-486-3 (pdf).
- [18] L.P. Cunico, C. Turner, *Supercritical Fluids and Gas-Expanded Liquids, The Application of Green Solvents in Separation Processes*, in: *The Application of Green Solvents in Separation Processes*, Elsevier Inc., 2017: pp. 155–214. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805297-6.00007-3>.
- [19] *Supercritical extraction throughout history*, (n.d.). <https://sk-skrj.com/en/supercritical-extraction-throughout-history> (accessed January 11, 2025).
- [20] M. Cvjetko Bubalo, S. Vidović, I. Radojčić Redovniković, S. Jokić, New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents, *Food and Bioproducts Processing* 109 (2018) 52–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001>.
- [21] R.P.F.F. da Silva, T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Supercritical fluid extraction of bioactive compounds, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016) 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>.
- [22] J. Azmir, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M.H.A. Jahurul, K. Ghafoor, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials, *J Food Eng* 117 (2013) 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.

- [23] Said Al-Hamimi, *Extraction and Chromatography of Bio-active Compounds in Complex Samples using Supercritical CO<sub>2</sub> Technology*, Lund university, 2018. ISBN 978-91-7422-594-5 (Digital).
- [24] SFE 500: Super Critical Fluid Extraction, n.d. [https://www.youtube.com/watch?v=LQfVJ0MvqEo&ab\\_channel=MatteBraidic](https://www.youtube.com/watch?v=LQfVJ0MvqEo&ab_channel=MatteBraidic) (accessed January 14, 2025).
- [25] V. Pilařová, K. Plachká, D. Herbsová, Š. Kosturko, F. Svec, L. Nováková, Comprehensive two-step supercritical fluid extraction for green isolation of volatiles and phenolic compounds from plant material, *Green Chemistry* 26 (2024) 6480–6489. <https://doi.org/10.1039/d4gc00371c>.