

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra analytické chemie



**Optimalizace extrakce fenolických látek s využitím oxidu uhličitého**

**Diplomová práce**

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Marcela Hollá

Hradec Králové 2021

Michal Karola

## Prohlášení:

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

## Poděkování:

Mé velké poděkování patří doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za velké množství rad, připomínek, ochotu pomoci, vstřícnost a za čas, který mi věnovala. Také bych chtěl velmi poděkovat Mgr. Marcele Hollé za její ochotu pomoci, vstřícnost, praktické rady, připomínky a čas, který mi věnovala při experimentální části diplomové práce a zpracování výsledků. V neposlední řadě bych rád poděkoval doc. PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za poskytnutí sušených jablečných křížal, které byly použity pro experimentální měření.

# Abstrakt

**Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra analytické chemie**

**Kandidát:** Michal Karola

**Školitel:** doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

**Konzultant:** Mgr. Marcela Hollá

**Název diplomové práce:** Optimalizace extrakce fenolických látek s využitím oxidu uhličitého

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací extrakce fenolických látek pomocí superkritické fluidní extrakce s využitím oxidu uhličitého ze vzorku zhomogenizovaných jablečných křížal. Pro kvantifikaci a identifikaci analytů obsažených v extraktu, bylo použito 14 standardů s využitím separační metody v UHPLC systému s detektorem založeným na principu diodového pole. Při identifikaci složek extraktů bylo identifikováno 13 analytů a po jejich kvantifikaci bylo zjištěno, že majoritní zastoupení má 6 analytů. Rozdíl sumy koncentrací 6 a 13 analytů byl velmi malý, a proto byla optimalizace prováděna pro těchto 6 majoritně zastoupených analytů, kterými jsou kyselina chlorogenová, epikatechin, katechin, floridzin, kvercitrin a guaiaverin.

Optimalizace extrakce probíhala ve 4 na sebe navazujících krocích. Prvním krokem optimalizace bylo určení vlivu a významnosti obsahu  $\text{CO}_2$  v extrakčním médiu, obsahu  $\text{H}_2\text{O}$  v ethanolickém kosolventu, tlaku a teploty na výtěžnost extrakce. Nejvýznamnějším faktorem byl určen obsah  $\text{CO}_2$  v extrakčním médiu. Výtěžnost extrakce polárních fenolických látek byla zvýšena při použití vysoké koncentrace polárního rozpouštědla a nízké koncentrace  $\text{CO}_2$ , který má nepolární charakter. Použitím vysoké koncentrace kosolventu nebylo dosaženo superkritického, ale subkritického stavu extrakčního média. Dalším krokem bylo zjištění vlivu průtokové rychlosti extrakčního média a času extrakce (objemu extrakčního média) na výtěžnost extrakce. Třetím krokem bylo zjištění vlivu velikosti skleněných kuliček na výtěžnost. Skleněné kuličky vyplňují velkou část extrakční cely a ovlivňují i proudění extrakčního média v cele. Bylo zjištěno, že ve výtěžnosti není výrazný rozdíl mezi 2 a 3 mm skleněnými kuličkami. Použití 3 mm skleněných kuliček ale dosahovalo lepší opakovatelnosti.

Po provedené optimalizaci byly výsledné podmínky extrakce: 10% obsah CO<sub>2</sub> v extrakčním médiu, 20% obsah H<sub>2</sub>O v ethanolickém kosolventu, tlak 300 bar, teplota 59 °C, průtoková rychlost 3 ml/min s časem extrakce 30 min (90 ml extrakčního média), 3 mm skleněné kuličky. Mezidenní přesnost získané extrakční metody byla 11,66 %, vyjádřena jako RSD.

## **Abstract**

**Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Analytical Chemistry**

**Candidate:** Michal Karola

**Supervisor:** doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

**Advisor:** Mgr. Marcela Hollá

**Title of diploma thesis:** Optimization of extraction of phenolic substances using carbon dioxide

This diploma thesis deals with the optimization of extraction of phenolic substances by supercritical fluid extraction, using carbon dioxide, from a sample of homogenized dried apple chips. To quantify and identify the analytes contained in the extract, 14 standards were analysed using a separation method in a UHPLC system with a diode array detector. In the identification of the extracts' components, 13 analytes were identified and after their quantification, 6 analytes were found to have major content. The difference in the sum of the concentrations of the 6 and 13 analytes was small, and therefore, optimization was carried out for these 6 majorly represented analytes, which are chlorogenic acid, epicatechin, catechin, phloridzin, quercitrin, and guaiaverin.

The extraction optimization was carried out in 4 successive steps. The first step of the optimization was to determine the influence and significance of CO<sub>2</sub> content in the extraction medium, H<sub>2</sub>O content in the ethanolic cosolvent, pressure and temperature on the extraction yield. The most significant factor was determined to be the CO<sub>2</sub> content of the extraction medium. The extraction yield of polar phenolic compounds was greatly enhanced when a high concentration of polar solvent and a low concentration of CO<sub>2</sub>, which is non-polar in nature, were used. By using high concentration of cosolvent, not supercritical but subcritical state of the extraction medium was achieved. The next step was to determine the effect of extraction medium flow rate and extraction time (extraction medium volume) on the extraction yield. The third step was to determine the influence of glass beads size on the yield. Glass beads fill a large part of the extraction cell and affect the flow of the extraction medium in the cell. It was found

that there is no significant difference in yield between 2 and 3 mm glass beads. However, the use of 3 mm glass beads achieved better repeatability.

After optimization, the resulting extraction conditions were: 10% CO<sub>2</sub> content in the extraction medium, 20% H<sub>2</sub>O content in the ethanolic cosolvent, pressure 300 bar, temperature 59 °C, flow rate 3 ml/min with extraction time 30 min (90 ml of extraction medium), 3 mm glass beads. The inter-day precision of the extraction method obtained was 11.66 %, expressed as RSD.

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>10</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>11</b>
<b>2 Cíl a popis zadání diplomové práce</b> .....	<b>12</b>
<b>3 Teoretická část</b> .....	<b>13</b>
3.1 Fenolické látky .....	13
3.1.1 Kyselina chlorogenová .....	14
3.1.2 Epikatechin .....	15
3.1.3 Katechin .....	16
3.1.4 Floridzin .....	17
3.1.5 Kvercitrin.....	18
3.1.6 Guaiaverin.....	19
3.2 Extrakční metody a jejich použití.....	20
3.2.1 Extrakční metody .....	20
3.2.2 Způsoby extrakce fenolických látek z různých druhů matrice.....	22
3.2.3 Superkritická fluidní extrakce .....	25
3.2.4 Superkritická tekutina.....	25
3.2.5 Kosolventy .....	27
3.2.6 Využití superkritické fluidní extrakce.....	27
<b>4 Experimentální část</b> .....	<b>33</b>
4.1 Použité chemikálie .....	33
4.2 Standardy.....	33
4.3 Přístrojové vybavení .....	34
4.4 SFE metoda .....	34
4.4.1 Příprava vzorků pro extrakci .....	34
4.4.2 Postup extrakce .....	35
4.4.3 Úprava SFE extraktů.....	36
4.4.4 Optimalizace SFE metody .....	36
4.4.5 Hodnocení vhodnosti modelu extrakčních podmínek.....	38
4.5 Příprava roztoků .....	39
4.5.1 Příprava ředícího roztoku .....	39
4.5.2 Příprava zásobních standardů .....	39

4.5.3	Příprava směsného standardu .....	39
4.5.4	Příprava mobilní fáze pro UHPLC .....	40
4.6	UHPLC-DAD metoda.....	40
4.6.1	Hodnocení UHPLC analýzy fenolických látek .....	40
4.6.2	Výpočet koncentrace analyzovaných látek.....	41
4.6.3	Směrodatná odchylka (SD) a relativní směrodatná odchylka (RSD) .....	41
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>42</b>
5.1	Plackett-Burman design .....	42
5.2	Identifikace signifikantních faktorů ovlivňujících výtěžnost extrakce .....	44
5.2.1	Vliv testovaných faktorů na výtěžnost extrakce .....	45
5.3	Vliv průtoku extrakčního média na kinetiku extrakce .....	54
5.4	Vliv velikosti skleněných kuliček na výtěžnost extrakce .....	56
5.5	Ověření opakovatelnosti optimalizované metody.....	57
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>65</b>

## Seznam zkratek

CAF – kyselina kávová (caffeic acid)

CAT – katechin (catechin)

CO<sub>2</sub> – oxid uhličitý

EPI – epikatechin

FDZ – floridzin

FLT - floretin

G – kyselina gallová

GAE – ekvivalent kyseliny gallové (gallic acid equivalent)

GUA – guaiaverin

HYP – hyperosid

H<sub>2</sub>O - voda

CH – kyselina chlorogenová

MAE – mikrovlnami asistovaná extrakce

PLE – extrakce kapalinou pod tlakem (pressurized liquid extraction)

QE – kvercetin (quercetin)

QI – kvercitrin (quercitrin)

Q3BG – hirsutrin (quercetin 3-β-D-glucoside)

REY – reynoutrin

RSD – relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)

RUT – rutin

SD – směrodatná odchylka (standard deviation)

SPE – extrakce na pevné fázi (solid phase extraction)

THC – tetrahydrokanabinol

UAE – ultrazvukem asistovaná extrakce

# 1 Úvod

Fenolické látky jsou rozsáhlá skupina chemických sloučenin, které se vyznačují aromatickým jádrem, na kterém je navázána alespoň jedna hydroxylová skupina. V rostlinách se nacházejí fenolické látky jako polyfenoly. Pro člověka je nejdůležitějším přírodním zdrojem polyfenolů ovoce a zelenina, které by měly být součástí zdravé životosprávy. Jednou z hlavních prospěšných vlastností polyfenolů je jejich antioxidační aktivita. Samozřejmě každý polyfenol má jinou strukturu, a tedy může mít i jiný účinek, např. kyselina chlorogenová současně s antioxidační aktivitou má i antikancerogenní a hepatoprotektivní účinek. Polyfenoly jsou v ovoci a zelenině obsaženy ve velkém množství a jedním z oblíbených druhů ovoce v České republice i ve světě jsou i jablka.

Superkritická fluidní extrakce (SFE) je extrakční metoda, která využívá superkritickou tekutinu jako extrakční rozpouštědlo. Látka se stává superkritickou tekutinou po překročení jejího kritického bodu tlaku a teploty. Po překročení kritického bodu nabývá superkritická tekutina vlastností plynu i kapaliny, které jsou např. vyšší hustota, vysoká difuzivita, nízká viskozita a nulové povrchové napětí, pro tyto vlastnosti se používá v SFE. Nejčastěji používanou superkritickou tekutinou je CO<sub>2</sub> pro jeho nízké kritické hodnoty tlaku a teploty. Právě použití CO<sub>2</sub> je velmi výhodné pro jeho nízkou toxicitu, nedochází ke tvorbě organického odpadu, který je nebezpečný pro životní prostředí a některé SFE systémy jsou dokonce schopny pracovat v uzavřeném systému a CO<sub>2</sub>, který byl použit jako extrakční médium, jsou schopny znovu použít. Tímto SFE technika odpovídá požadavkům tzv. zelené chemie. CO<sub>2</sub> má jednu zásadní nevýhodu, a to je jeho nepolární charakter, kvůli kterému je jeho použití převážně omezeno na extrakci nepolárních sloučenin. Pro zvýšení polarity extrakčního rozpouštědla CO<sub>2</sub> jsou používány polární sloučeniny a jsou označovány jako kosolventy. Ztrácí se tím 100 % zelená chemie, ale stále je extrakce mnohonásobně více ekologicky přijatelná než klasické extrakční metody, jako Soxhletova metoda nebo macerace.

V současné době je zatím běžné použití SFE v průmyslu při přípravě bezkofeinové kávy, extrakce aromatických látek a extrakce olejů z *Humulus lupulus*. SFE se začíná dostávat do farmaceutického průmyslu s uplatněním např. v extrakci alkaloidů z rostlinného materiálu a kanabinoidů.

## 2 Cíl a popis zadání diplomové práce

Cílem této diplomové práce je optimalizovat extrakci fenolických látek s využitím oxidu uhličitého. Extrakce fenolických látek v experimentální části práce bude probíhat za použití superkritické fluidní extrakce ze vzorku zhomogenizovaných jablečných křížal. Analýza a kvantifikace u všech extraktů i standardů proběhne pomocí UPLC systému Acquity s detektorem diodového pole. Pro design experimentu, hodnocení a optimalizaci metody bude použit software MODDE. Optimalizace extrakce bude provedena ve čtyřech na sebe navazujících krocích s cílem optimalizovat extrakci polárních fenolických látek.

Prvním krokem optimalizace bude identifikace signifikantních faktorů ovlivňujících výtěžnost extrakce pomocí Plackett-Burmann designu a softwaru MODDE. Sledovanými faktory jsou obsah CO<sub>2</sub> v extrakčním médiu, obsah H<sub>2</sub>O v ethanolickém kosolventu, tlak a teplota. Stanoví se jejich význam a vliv na výtěžnost extrakce a jejich optimální podmínky za pomoci softwaru MODDE.

Ve druhém kroku bude určen vliv průtokové rychlosti extrakčního média na kinetiku extrakce. V této experimentální části bude sledován i čas a objem extrakčního média, při kterém je vyextrahováno většinové množství fenolických látek ze vzorku. Tímto dojde i k ekologicky a ekonomicky výhodnější extrakci.

Třetím krokem bude určení vlivu velikosti skleněných kuliček na výtěžnost extrakce, které budou použity společně se vzorkem pro doplnění zbylých prostor extrakční cely a vyplňují tedy její velkou část a svým různým průměrem mohou odlišně ovlivňovat extrakci.

Čtvrtým krokem optimalizace bude testování opakovatelnosti metody ve třech po sobě jdoucích dnech (mezidenní přesnost).

### 3 Teoretická část

#### 3.1 Fenolické látky

Fenolické látky se ve velkém množství nacházejí v rostlinách - ovoci a zelenině, jako jejich sekundární metabolity ve formě polyfenolů. Mezi skupiny fenolických sloučenin, které se nacházejí v ovoci, patří fenolické kyseliny, flavonoidy, taniny, stilbeny, lignany a proanthokyanidiny. V ovoci jsou nejvíce zastoupeny skupiny fenolických kyselin a flavonoidy. Jednou z jejich hlavních prospěšných vlastností pro člověka je jejich antioxidační účinek. Jsou schopny inaktivovat a stabilizovat volné radikály pomocí donor-akceptorové vazby elektronu nebo vodíkového atomu. Jejich antioxidační aktivita je závislá na struktuře, na typu a pozici substituentů, hydroxylových skupin, aromatických jader a jejich počtu ve fenolické sloučenině. Vodíkové radikály, které jsou uvolněny z hydroxylových skupin navázaných na aromatickém jádře/aromatických jádrech, jsou poté schopny inaktivovat a stabilizovat volné kyslíkové a dusíkové radikály. Další schopností fenolických látek je i chelatace kovových iontů. Pomocí antioxidační aktivity fenolických látek dochází i ke snížení incidence chronických onemocnění, u kterých jejich rozvoj souvisí s oxidačním stresem. Mezi další vlastnosti některých fenolických látek patří např. antikancerogenní, kardioprotektivní, antibakteriální a protizánětlivý účinek [1] - [3].

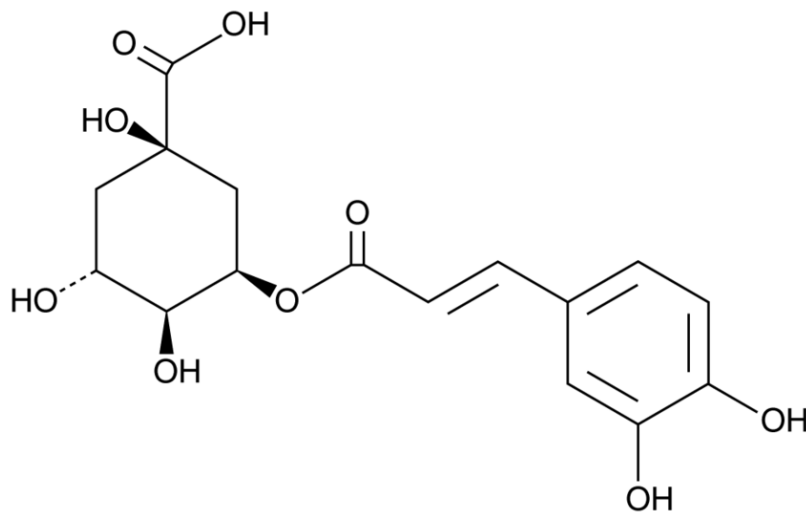
**Tabulka 1:** Hodnoty logP jednotlivých fenolických látek [4]

fenolická látka	logP
kyselina gallová	0,7
kyselina chlorogenová	-0,4
epikatechin	0,4
katechin	0,4
kyselina kávová	1,2
rutin	-1,3
kvercetin	1,5
floridzin	1,2
kvercitrin	0,9
floretin	2,6
guaiaverin	0,4
hirsutrin	0,4
hyperosid	0,4
reynoutrin	0,4

Pro odhad chování látek při extrakci nebo separaci je důležitá jejich lipofilita. LogP udává rozdělovací koeficient, čím je hodnota více nad 0, tím je látka více lipofilní a bude se lépe rozpouštět v organické fázi a naopak, čím je hodnota menší než 0, tím je více hydrofilní a bude se lépe rozpouštět ve vodné fázi. Pokud má látka hodnotu logP 0, tak se bude rozpouštět stejně ve vodné i organické fázi. Hodnoty logP pro analyzované látky jsou uvedené v Tabulce 1.

### 3.1.1 Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová patří do skupiny fenolických kyselin. Je jednou z nejvíce obsažených fenolických látek v potravinách rostlinného původu. Z chemického hlediska patří do skupiny esterů kyseliny chinové a je to ester derivátů kyseliny skořicové a kyseliny chinové. V rostlinách se nejčastěji nachází 5-O-kafeoylchinová kyselina, jedná se o ester kyseliny kávové a kyseliny chinové. Dalšími izomery kyseliny chlorogenové, které se nacházejí v rostlinách, jsou např. 3-O-kafeoylchinová kyselina a 4-O-kafeoylchinová kyselina [5].



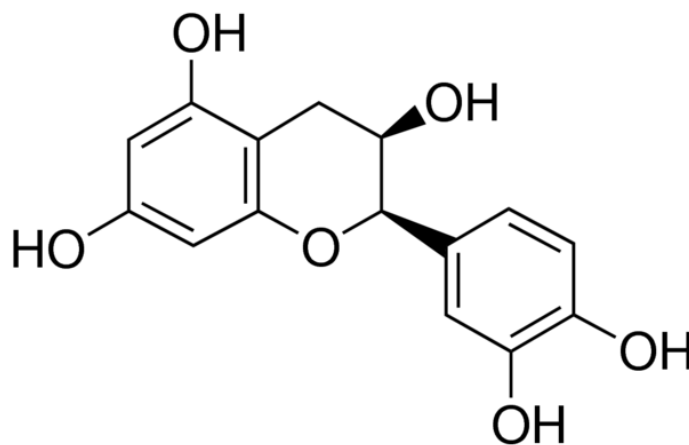
**Obrázek 1:** Kyselina chlorogenová [6]

Kyselina chlorogenová je termolabilní. Mezi její mnohé výhodné vlastnosti na lidský organismus patří např. antioxidační, antibakteriální aktivita, protizánětlivý, hepatoprotektivní a antikancerogenní účinek. Dalším významným účinkem kyseliny chlorogenové je např. ovlivnění glukózového a lipidového metabolismu. Pravidelné užívání kyseliny chlorogenové např. v podobě bezkofeinové kávy snížilo riziko rozvoje diabetu mellitu 2. typu až o 30 %. Mezi její antidiabetický účinek patří např. zvyšování citlivosti na inzulín, snižování hladin glukózy v krvi a zvyšování sekrece inzulínu [7]. Hodnota logP pro 5-O-kafeoylchinovou kyselinu je -0,4, která udává, že je více

hydrofilní než lipofilní. LogP je stejný pro všechny tři uvedené izomery esteru kyseliny kávové a kyseliny chinové.

### 3.1.2 Epikatechin

Epikatechin patří do skupiny flavonoidů. Z chemického hlediska patří do skupiny flavanolů se základní strukturou flavan-3-ol. Hodnota logP pro (-)-epikatechin je 0,4. Pozitivní hodnota logP udává, že látka je více lipofilní než hydrofilní.

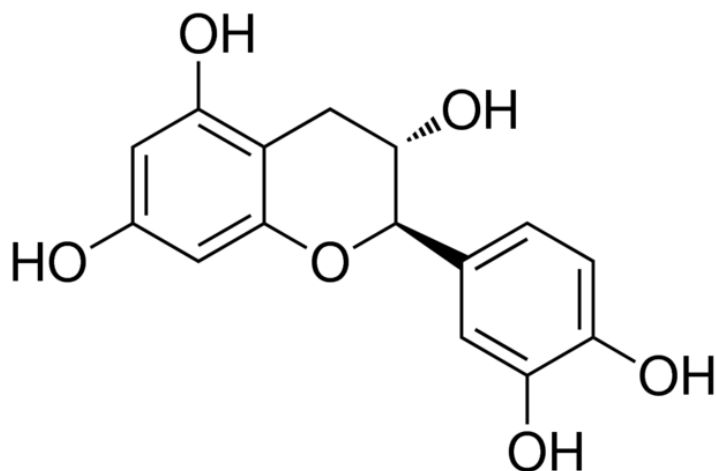


**Obrázek 2:** (-)-epikatechin [8]

Nejčastěji se vyskytuje ve formě stereoizomeru (-)-epikatechinu, např. v plodech kakaovníku a kakaových produktech. Jde o stereoisomer katechinů. Jedna z hlavních prospěšných vlastností je u epikatechinu antioxidační aktivita. Mezi jeho další významné vlastnosti patří protizánětlivý, antikancerogenní a kardioprotektivní účinek [9].

### 3.1.3 Katechin

Společně s epikatechinem patří do skupiny flavonoidů. Stejně jako epikatechin patří do skupiny flavanolů se základní strukturou flavan-3-ol. Hodnota logP pro (+)-katechin je 0,4. Pozitivní hodnota logP udává, že látka je spíše lipofilní než hydrofilní.

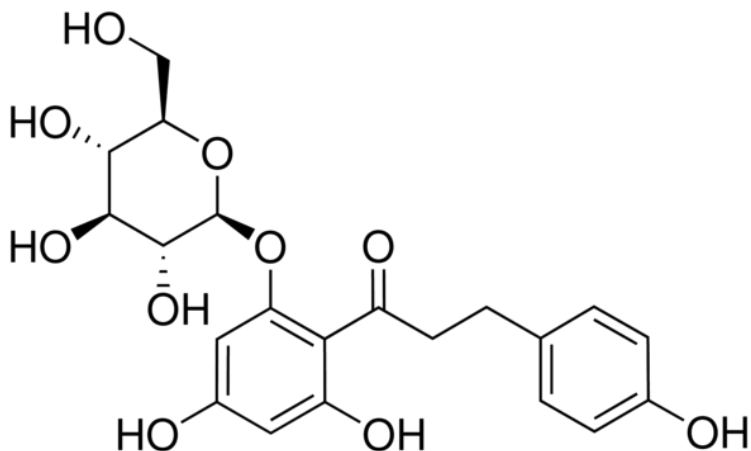


**Obrázek 3:** (+)-katechin [10]

Nejčastěji se vyskytuje jako (+)-katechin, např. společně s epikatechinem v zeleném čaji, jako jedny z nejzastoupenějších flavonoidů. Jedná se o stereoisomer katechinů. S epikatechinem mají podobné prospěšné vlastnosti na lidský organismus. Mezi jeho hlavní účinek patří antioxidační aktivita. Dalšími významnými účinky, kterými ovlivňuje lidské zdraví, jsou protizánětlivý, antialergický, antikancerogenní, antibakteriální a kardioprotektivní účinek [11].

### 3.1.4 Floridzin

Je dalším zástupcem flavonoidů. Jedná se o glykosid floretinu. Patří do skupiny dihydrochalkonů a na základním skeletu je navázán monosacharid beta-D-glukopyranosyl. Hodnota logP pro floridzin je 1,2. Z hodnoty logP bylo zjištěno, že je spíše lipofilního charakteru.

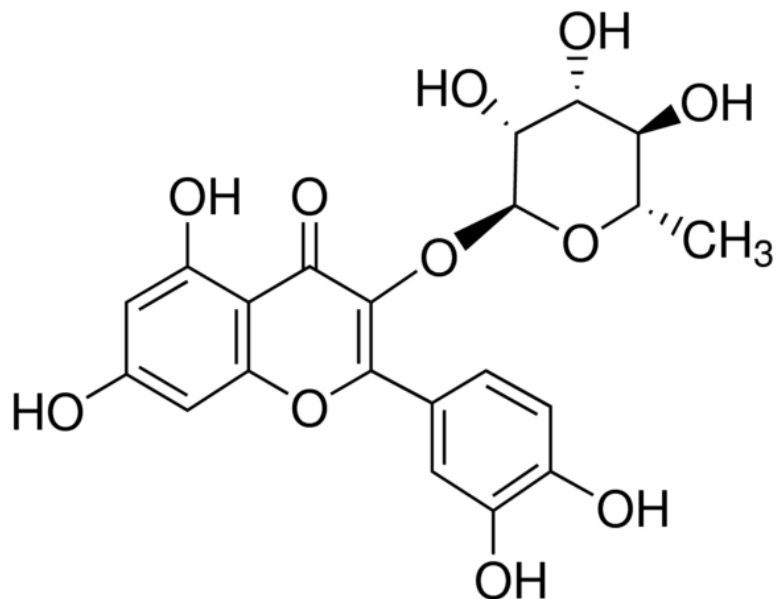


**Obrázek 4:** Floridzin [12]

Floridzin je ve vyšším množství převážně obsažen v rostlinách rodu *Malus* (Jabloň). Mezi jeho výhodné vlastnosti patří např. antioxidační a antibakteriální účinek (*S. Aureus*) [13]. Vykazuje inhibiční účinek na SGLT1 a SGLT2, což jsou sodíkovo-glukózoové kotransportéry, a tím vykazuje i antidiabetický účinek u streptozotocinem indukovaných diabetických krys. U diabetických krys bylo pozorováno snížení krevních lipidů a zvýšení HDL. Dalším účinkem bylo např. snížení váhy u diabetických krys [14].

### 3.1.5 Kvercitrin

Patří do skupiny flavonoidů. Jedná se o derivát kvercetinu, na jehož strukturu je navázán alpha-L-ramnosyl. Hodnota logP pro kvercitrin je 0,9. Z hodnoty logP bylo zjištěno, že je spíše lipofilního charakteru.

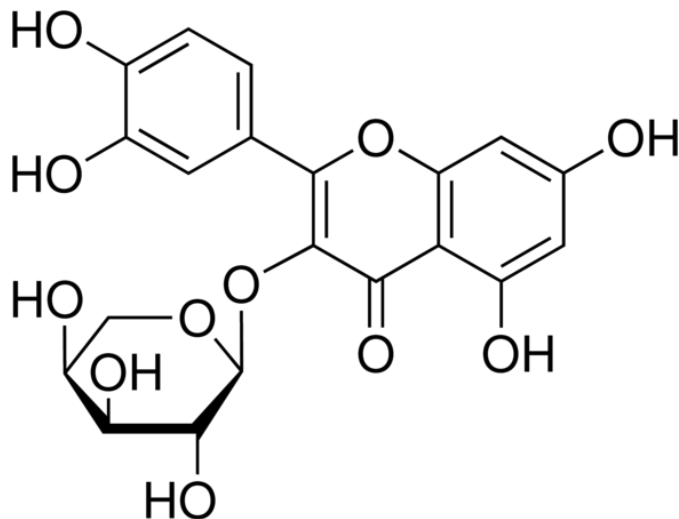


**Obrázek 5:** Kvercitrin [15]

Mezi jeho výhodné vlastnosti, které byly pozorovány u streptozotocinem indukovaných diabetických krys při podávání kvercitrinu, patří např. antioxidační aktivita, snižování hladiny plazmatické glukózy, zvyšování hladiny plazmatického inzulinu a snížení poškození tkáně způsobené streptozotocinem [16].

### 3.1.6 Guaiaverin

Patří do skupiny flavonoidů. Jedná se o derivát kvercetinu, na jehož strukturu je navázán alpha-L-arabinopyranosa. Hodnota logP pro guaiaverin je 0,4. Z hodnoty logP bylo zjištěno, že je o něco více lipofilní než hydrofilní.



**Obrázek 6:** Guaiaverin [17]

Je obsažen např. v *Psidium guajava* (Kvajáva hrušková). Mezi jeho výhodné vlastnosti patří např. účinek proti zubnímu plaku (*Streptococcus mutans*) - bakteriostatický účinek, snižování produkce kyselin *S. mutans*, snížení hydrofobicity a přilnavosti *S. mutans* [18].

## 3.2 Extrakční metody a jejich použití

Macerace a Soxhletova metoda jsou jedny z nejstarších a nejpoužívanějších extrakčních metod. V současné době již tyto metody nejsou nejvýhodnější kvůli jejich ekologickému zatížení velkou spotřebou toxických extrakčních rozpouštědel, relativně nízké výtěžnosti, vysoké spotřebě energie a času extrakce. V současné době vstupují do popředí extrakční metody jako ultrazvukem asistovaná extrakce, mikrovlnami asistovaná extrakce, extrakce kapalinou pod tlakem a superkritická fluidní extrakce. Mezi výhodné vlastnosti těchto extrakčních metod patří kratší extrakční doba, vyšší výtěžnost, nižší ekologické zatížení spotřebou nižšího množství toxických extrakčních rozpouštědel, nebo použití méně toxických extrakčních rozpouštědel.

### 3.2.1 Extrakční metody

#### Soxhletova metoda

Jedná se o jednu z nejvíce používaných běžných extrakčních metod (extrakce pevná látka – kapalina) u přírodních produktů. Pro tuto metodu se používá Soxhletův extraktor. Jedná se o spojení několika skleněných trubic, na kterém je z horní části připojen chladič a ze spodní destilační baňka s extrakčním rozpouštědlem. Princip této metody spočívá v tom, že extrakční rozpouštědlo je zahříváno k bodu varu a vypařuje se, v horní části aparátu se dostává do chladiče, kde kondenzuje a skapává do patrony, kde je připravena matrice, zde dochází k extrakci. Extrakt putuje zpátky do destilační baňky a tento princip pokračuje po celou dobu extrakce. Mezi nevýhody této metody patří křehkost skleněné aparatury, čas extrakce v řádu hodin i dnů, extrahované látky jsou po jejich extrakci z matrice v destilační baňce po celý zbytek extrakce a jsou tedy vystavovány teplotám potřebným pro bod varu extrakčního rozpouštědla, což není vhodné pro termolabilní sloučeniny. Mezi další nevýhody patří spotřeba velkého množství rozpouštědla a vysoká spotřeba energie pro udržení bodu varu extrakčního rozpouštědla po celou dobu extrakce. Jedná se o referenční postup pro extrakci tuků a olejů [19].

#### Macerace

Jedná se o jednu ze základních extrakčních metod. Pro maceraci je potřeba pouze extrakční rozpouštědlo, matrice, ze které probíhá extrakce, a extrakční nádoba. Z důvodu toho, že nedochází k žádným vnějším mechanickým vlivům, je i extrakce velmi dlouhá a v současné době

existují výhodnější extrakce, které jsou extrakčně více účinné při spotřebě nižšího množství rozpouštědla za výrazně nižší čas extrakce. Výhodou macerace je její minimální technické vybavení pro extrakci.

### **Ultrazvukem asistovaná extrakce (UAE)**

Pro extrakci se používá ultrazvuk o vysoké intenzitě, který pracuje při nízké frekvenci 20 - 100 kHz a vysoké intenzitě 10 – 1000 W/cm<sup>2</sup>. Při použití suché matrice dochází v kapalině k hydrataci a pomocí ultrazvuku vznikají malé kavitace, které narušují buněčnou stěnu buněk rostlinné matrice a díky tomu dochází k uvolnění obsahu. Ultrazvuk o vysoké intenzitě je výhodný např. pro extrakci bioaktivních látek z rostlinného materiálu, extrakce olejů a inaktivace enzymů. Ultrazvukem asistovaná extrakce (UAE) je přístrojově nenáročná, jednoduchá, relativně finančně nenáročná a časově méně náročná než jiné typy extrakcí např. macerace [20]. Není potřeba velkého množství rozpouštědla, teploty a energie.

### **Extrakce kapalinou pod tlakem (PLE)**

Extrakce probíhá pomocí extrakčního rozpouštědla za vysokého tlaku a teploty, ale pod hodnotami kritického bodu. Při vysokých hodnotách tlaku a teploty dochází ke změně vlastností extrakčního rozpouštědla, zvyšuje se přenos hmoty, snižuje se viskozita a povrchové napětí a tím je dosažen i lepší kontakt rozpouštědla s matricí. Používá se statický i dynamický mód extrakce. Výhodnými vlastnostmi této metody jsou nízká spotřeba extrakčního rozpouštědla, použití ekologicky méně toxických rozpouštědel, snížení spotřeby energie a snížení času extrakce. Nevýhodou této metody je problém s extrakcí termolabilních bioaktivních sloučenin, kvůli použité vysoké extrakční teplotě [21].

### **Mikrovlnami asistovaná extrakce (MAE)**

Mikrovlny jsou elektromagnetické vlny. Aby látka mohla absorbovat mikrovlnnou energii a být zahřívána, musí u ní docházet k dielektrickým ztrátám. Polární rozpouštědla mají vysoké dielektrické ztráty, a tedy dobře absorbují mikrovlnnou energii a jsou dobře zahřívány, např. voda, ethanol, methanol. Nepochární rozpouštědla, která mají velmi nízké až nulové dielektrické ztráty, nebudou tuto energii absorbovat, a i když budou mikrovlnám vystaveny, tak se nebudou zahřívát např. hexan, heptan. Pokud je této extrakční metodě vystavena rostlinná matrice, tak voda v rostlinných buňkách bude absorbovat mikrovlny a bude se zahřívát a vypařovat se, což vede

k porušení až prasknutí buněčné stěny a uvolnění buněčného obsahu do extrakčního rozpouštědla. Výhodou této metody je časová nenáročnost, nízká spotřeba extrakčního rozpouštědla [22].

### **3.2.2 Způsoby extrakce fenolických látek z různých druhů matrice**

Klasickými způsoby extrakce fenolických látek z rostlinného materiálu jsou např. zmíněná macerace a Soxhletova metoda, oproti kterým vstupují do popředí novější extrakční metody jako UAE, PLE, MAE a superkritická fluidní extrakce. Cílem této kapitoly a Tabulky 2 je vyobrazení jednak výtěžností fenolických látek pomocí moderních extrakčních metod v porovnání s klasickými metodami, ale i jejich výrazně kratšího času extrakce, nižší spotřeby organických rozpouštědel, nebo použití nižších extrakčních teplot. Práce se zabývají stanovením celkového obsahu fenolických látek, a to pomocí Folin-Ciocalteu metody. V tabulce jsou uvedeny celkové obsahy fenolických látek vyjádřené v mg ekvivalentu kyseliny gallové na gram vzorku. Současně se všechny práce zabývají optimalizací použité extrakční metody a většina porovnává jejich výsledky s klasickými extrakčními metodami. Součástí tabulky je i složení extrakčních rozpouštědel a použitá množství extrakčního rozpouštědla na 1 g vzorku, pro porovnání spotřeby organických rozpouštědel a možné určení té nejvíce „zelené“ extrakce fenolických látek z vybraných prací.

**Tabulka 2:** Přehled způsobů extrakce fenolických látek z různých druhů matrice

metoda	vzorek	rozpouštědlo	objem rozpouštědla	T (°C)	Čas (min)	mg GAE/g <sup>5</sup>	jiné podmínky extrakce	zdroj
macerace	<i>Olea europaea</i> - plody	80 % methanol	48,00 ml (24 ml/g) <sup>6</sup>	50,0	282	5,09		[23]
UAE <sup>1</sup>	<i>Olea europaea</i> - plody	80 % methanol	44,00 ml (22 ml/g)	47,0	30	7,01	výkon 240 W	[23]
MAE <sup>2</sup>	<i>Melastoma Sanguineum</i> - plod	31,33 % ethanol	16,11 ml (32,21 ml/g)	52,24	45	39,02	mikrovlnná síla - 500 W	[24]
Soxhletova extrakce	<i>Melastoma Sanguineum</i> - plod	31,33 % ethanol	200,00 ml (200 ml/g)	95,0	240	18,40		[24]
macerace	<i>Melastoma Sanguineum</i> - plod	31,33 % ethanol	16,11 ml (32,21 ml/g)	25,0	1440	25,79		[24]
PLE <sup>3</sup>	<i>Rubus fruticosus</i> - slupky a semínka	ethanol : voda (v/v) 50 % : 50 %	3,35 ml/min (20,1 ml/g)	100,0	30	7,36	tlak 75 bar	[25]
SFE <sup>4</sup>	<i>Vitis labrusca</i> - semínky	ethanol : CO <sub>2</sub> 6,66 % : 93,34 %	2 ml/min (20 ml/g)	45,71	30	81,67	tlak 157 bar	[26]

<sup>1</sup> ultrazvukem asistovaná extrakce, <sup>2</sup> mikrovlnami asistovaná extrakce, <sup>3</sup> extrakce kapalinou pod tlakem, <sup>4</sup> superkritická fluidní extrakce, <sup>5</sup> koncentrace fenolických látek vyjádřená v mg ekvivalentu kyseliny gallové na gram vzorku, <sup>6</sup> poměr množství rozpouštědla použitého na 1 gram vzorku

U všech prací byl celkový obsah fenolických látek odhadnut pomocí Folin-Ciocalteu metody. Jako standard byla použita kyselina gallová a obsah fenolických látek je vyjádřen na mg ekvivalentní standardu kyseliny gallové v 1 g suchého či čerstvého rostlinného vzorku.

Jak lze vyčíst z práce založené na porovnání účinnosti macerace a ultrazvukem asistované extrakce fenolických látek z plodů *Olea europaea* [23], výtěžnost UAE je vyšší i přesto, že čas extrakce byl několikanásobně kratší než u macerace. Bylo provedeno i HPLC stanovení 14 fenolických látek a ze zjištěných výsledků bylo dosaženo závěru, že ultrazvukové vlny nepoškodily analyzované fenolické látky a nedocházelo tedy k jejich degradaci. Z práce je i vidět, že pro UAE není potřeba vysokých teplot, což je výhodné pro extrakci termolabilních látek.

V další práci [24] byla mikrovlnami asistovaná extrakce fenolických látek z ovoce *Melastoma sanguinem* (MAE) srovnána s dvěma běžnými extrakčními metodami – macerace a Soxhletova metoda. Oproti Soxhletově metodě bylo spotřebováno několikanásobně nižší množství extrakčního rozpouštědla, bylo dosaženo kratšího času extrakce a teplota extrakce byla také nižší. Za využití MAE bylo dosaženo více jak dvojnásobné výtěžnosti extrakce. Oproti maceraci byla použita u MAE vyšší teplota, ale extrakce probíhala za nesrovnatelně kratší dobu s vyšší výtěžností. V této práci byla použita optimální mikrovlnná síla 500 W, u vyšších hodnot docházelo k snížení celkového obsahu fenolických látek, což mohlo být způsobeno tepelnou degradací.

Extrakce bioaktivních sloučenin z plodu *Rubus fruticosus* kapalinou pod tlakem byla využita v práci [25]. Teplota je u tohoto typu extrakce vysoká, což je vhodné pro termostabilní sloučeniny. Práce poukazuje na možné využití odpadu firem zpracovávajících rostliny, při použití extrakční metody s nízkou spotřebou extrakčního rozpouštědla na 1 g vzorku a za krátký čas.

Superkritická fluidní extrakce fenolických látek ze semínek *Vitis labrusca* byla použita v práci [26]. Jako neoptimálnější složení extrakčního média pro extrakci fenolických látek, bylo složení ethanol : CO<sub>2</sub> v poměru 6,66 % : 93,34 %. Teplota extrakce byla použita pod 50 °C, aby bylo zabráněno degradaci fenolických látek. Nejvýznamnějšími faktory na výtěžnost fenolických látek byla v této práci určena teplota a tlak. Bylo tedy dosaženo vysoké výtěžnosti fenolických látek za použití nízké koncentrace organického rozpouštědla, mírné teploty a tlaku a za čas extrakce pouhých 30 min.

Ze všech vybraných prací byla spotřeba extrakčního rozpouštědla na 1 g vzorku u SFE nejnižší, hned za ní byla PLE se spotřebou o 0,1 ml/g vyšší. Pokud vybereme z těchto prací nejvíce „zelenou“ extrakci, tak to bude právě SFE. Nejenomže má nejnižší spotřebu rozpouštědla na 1 g vzorku, ale v tomto rozpouštědle pouze 6,66 % zastupuje organické rozpouštědlo (ethanol), zbytek je CO<sub>2</sub>.

### **3.2.3 Superkritická fluidní extrakce**

Superkritická fluidní extrakce (SFE) je extrakční metoda, která využívá superkritickou tekutinu k extrakci vybraných analytů. Nastavitelnou teplotou, tlakem, poměrem přídavných rozpouštědel a oxidu uhličitého, velikostí skleněných kuliček, délkou extrakce a průtokem rozpouštědla je možné upravit extrakční účinnost.

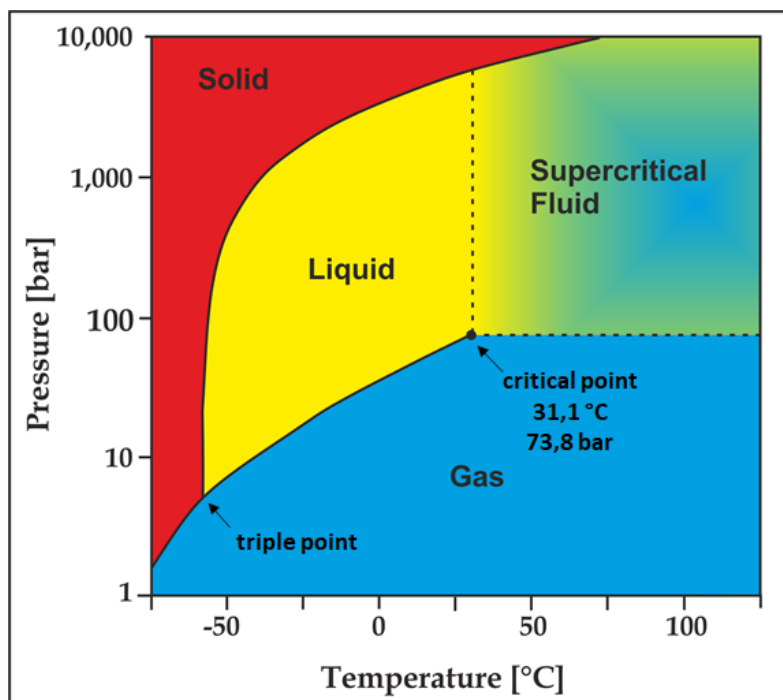
### **3.2.4 Superkritická tekutina**

Superkritická tekutina je charakterizována teplotou a tlakem, které jsou vyšší, než jsou kritické hodnoty této látky. Po překročení kritického bodu teploty a tlaku dané látky dochází ke změně vlastností a vzniká superkritická tekutina, která má vlastnosti plynu i kapaliny. Tekutina v nadkritickém stavu má hustotu vyšší než plyny, vysokou difuzivitu, nízkou viskozitu a nulové povrchové napětí. Těchto výhodných vlastností se využívá v SFE [27].

Nejčastěji používanou nadkritickou tekutinou je oxid uhličitý. Mezi jeho výhodné vlastnosti patří například nehořlavost, inertnost, cena a nízká toxicita pro životní prostředí. Nadkritického stavu u oxidu uhličitého lze snadno dosáhnout díky nízkým kritickým hodnotám pro teplotu 31,1 °C i tlak 73,8 barů. Kvůli nulovému dipólovému momentu molekuly CO<sub>2</sub> je superkritický CO<sub>2</sub> považován za nepolární rozpouštědlo, ale díky přítomnosti kvadrupólového momentu má lehkou polaritu, což mu umožňuje v superkritickém stavu a za vysokého tlaku rozpouštět některé polární látky. Extrakční výtěžnost látky pomocí superkritického CO<sub>2</sub> závisí na jejích substituentech, její polaritě a molární hmotnosti [28]. Zvýšením tlaku se zvyšuje hustota superkritické tekutiny, a proto je superkritický CO<sub>2</sub> do určité míry schopný extrahovat i polárnější analyty.

CO<sub>2</sub> je výborným extrakčním činidlem pro extrakci nepolárních látek. Pro extrakci polárních sloučenin je důležitý kosolvent jako součást extrakčního média spolu s CO<sub>2</sub> pro zvýšení rozpustnosti polárních sloučenin v extrakčním médiu. Již malý přídavek kosolventu výrazně

zvyšuje výtěžnost extrakce polárních sloučenin při SFE. Nejčastěji používané kosolventy pro extrakci polárních sloučenin jsou methanol, ethanol a voda [29]. Používají se i jejich kombinace, a to především methanol/ethanol + voda.



**Obrázek 7:** Fázový diagram CO<sub>2</sub> [30]

*solid - pevná látka, liquid - kapalina, gas - plyn, supercritical fluid - superkritická tekutina, triple point - trojný bod, critical point - kritický bod, pressure – tlak, temperature - teplota*

S přidáním kosolventů se mění i kritické hodnoty extrakčního média. Z tohoto důvodu musí být obsah některých kosolventů nízký, pro dosažení superkritického stavu extrakčního média, kvůli jejich vysoké kritické hodnotě tlaku a teploty. Přidáním vyššího množství kosolventu už tedy nedosáhneme superkritického stavu, ale jsme v subkritických podmínkách. Příkladem kosolventu s vysokými hodnotami kritického bodu je voda. Kritické hodnoty pro vodu jsou teplota 373,9 °C a tlak 220,5 bar [31]. Při takové teplotě by došlo k rozkladu rostlinného materiálu i extrahovaných látek [28].

### 3.2.5 Kosolventy

Přídavkem kosolventů upravujeme extrakční vlastnosti extrakčního média. Voda je skvělý solvent pro polární a iontové sloučeniny. Dalšími výhodnými vlastnostmi vody jsou její nízká toxicita, nehořlavost, nevýbušnost, nízká cena a bezpečnost při běžném použití.

Ethanol je jeden z nejčastěji používaných polárních solventů. Je neomezeně mísitelný s vodou. Jeho vlastnosti jsou hořlavost (1. třída hořlavin), těkavost, cenová dostupnost. Je často používán jako rozpouštědlo, dezinfekce, při výrobě alkoholických nápojů, k extrakcím jako extrakční činidlo, při syntéze např. kyseliny octové a ve farmaceutickém průmyslu [32]. Jeho kritický bod teploty je 243,1 °C a tlaku 63,9 bar [31]. Jeho kritická hodnota tlaku je podobná jako u CO<sub>2</sub>, ale kritická teplota je vysoká.

Methanol je také polární rozpouštědlo a je neomezeně mísitelný s vodou. Jeho vlastnostmi jsou toxicita, hořlavost, těkavost a cenová dostupnost. I přes jeho toxicitu je díky jeho vlastnostem často používán jako rozpouštědlo, přísada do nemrznoucích směsí, k extrakcím jako extrakční činidlo a při syntéze např. formaldehydu [33]. Kritickou hodnotu teploty má methanol 239,5 °C a tlaku 81 barů [31].

**Tabulka 3:** Kritické body teploty a tlaku pro vybrané kosolventy [31]

<b>kosolvent</b>	<b>T<sub>c</sub><sup>1</sup> (°C)</b>	<b>P<sub>c</sub><sup>2</sup> (bar)</b>
ethanol	243,1	63,9
methanol	239,5	81,0
voda	373,9	220,5

<sup>1</sup> kritická teplota, <sup>2</sup> kritický tlak

### 3.2.6 Využití superkritické fluidní extrakce

Superkritická fluidní extrakce se nejčastěji používá pro přípravu např. bezkofeinové kávy/čaje, olejového extraktu z *Humulus lupulus*, extrakce aromatických látek. Tato kapitola se zabývá převážně použitím SFE pro nekonvenční extrakce, které mají potenciální využití ve farmaceutickém, analytickém, ale i industriálním odvětví, viz Tabulka 4. Z běžného použití byla vybrána extrakce aromatických látek, kde SFE převyšuje ostatní extrakce svou vysokou extrakční výtěžností za použití 100 % CO<sub>2</sub>. Dále byly vybrány extrakce alkaloidů, které mají významné použití ve farmacii. Z těchto alkaloidů byl vybrán vinblastin, kolchicin a jeho deriváty a artemisinin. Další

prací je využití SFE v kombinaci s extrakcí na pevné fázi pro získání THC standardu analytické kvality. V neposlední řadě je zmíněno i využití SFE pro zužitkování industriálního odpadu, v tomto případě zužitkování odpadu *Virginia tobacco*.

**Tabulka 4: Přehled využití SFE**

vzorek	extrahovaný analyt	teplota (°C)	tlak (bar)	složení extrakčního média	průtoková rychlost extrakčního média	čas extrakce (min)	výtěžnost	zdroj
<i>Catharanthus roseus</i> - nadzemní části	vinblastin	40	300	ethanol : CO <sub>2</sub> 2 % : 98 %	16,67 g/min	130	291,90 µg/g extraktu	[34]
<i>Cannabis sativa</i> - květenství	THC (tetrahydrokanabinol)	60	150	ethanol : CO <sub>2</sub> 2 % : 98 %	9,17 g/min	240	13,97 g extraktu/100 g matrice - extrakt obsahující 36,18% THC, po SPE získá 3,55 g (90,10 % THC)/100 g matrice	[35]
<i>Colchicum autumnale</i> - semena	kolchicin	35	247	methanol : CO <sub>2</sub> 3 % : 97 %	1,50 ml/min	110	1,25 %/200 mg matrice	[36]
	3-demethylkolchicin						0,17 %/200 mg matrice	
	kolchikosid						0,46 %/200 mg matrice	
<i>Artemisia annua</i> - listy	artemisinin	60	400	100 % CO <sub>2</sub>	2,40 g/min	-	95,10 mg/g extraktu, 5,47 mg/g matrice	[37]
Virginia tobacco - odpad z procesu odstraňování stonků z listu při jejich zpracovávání	solanesol/nikotin	40	150	100 % CO <sub>2</sub>	261,17 g/min	180	solanesol/nikotin 33,33/0 g/kg matrice	[38]
	solanesol/nikotin	58	370	100 % CO <sub>2</sub>	194,50 g/min	180	solanesol/nikotin 17,52/2,10 g/kg matrice	
<i>Lavandula angustifolia</i> - květy	aromatické látky	40	120	100 % CO <sub>2</sub>	450,00 ml/min	120	extrakt - 3,20 – 3,70 %/g matrice	[39]

Pomocí superkritické fluidní extrakce vinblastinu z nadzemní části rostliny *Catharanthus roseus* [34] bylo dosaženo vysoké výtěžnosti extrakce vinblastinu za použití relativně nízkého množství organického rozpouštědla. Nejvyšší selektivity bylo dosaženo při použití extrakčního média CO<sub>2</sub> + 2 % ethanol. Při extrakčních podmínkách tlak 300 bar, teplota 40 °C a koncentrace ethanolu jako kosolventu 2 %, bylo extrahováno 291,9 µg/g vinblastinu. SFE extrakty dosahovaly koncentrace vinblastinu až o 92,41 % vyšší v porovnání s extrakcí pevná látka – kapalina.

Extrakcí, izolací a purifikací tetrahydrokanabinolu z květenství *Cannabis sativa* za využití superkritické fluidní extrakce a extrakce na pevné fázi [35] bylo dosaženo zisku THC o čistotě 90,1 %. Pro extrakci byla použita květenství *Cannabis sativa* s pozorovanou koncentrací 7,04 % THC v květenstvích. Pro purifikaci byl použit extrakt SFE s obsahem THC v extraktu 36,18 %, byl vybrán pro vysokou THC čistotu, která byla zjištěna pomocí GC-FID a RP-HPLC. Purifikace probíhala za použití extrakce na pevné fázi a následně byla provedena analýza čistoty a kvantifikace. Za využití SFE je možné získat extrakt THC 13,97g/100g matrice s koncentrací 36,18 % THC a po purifikaci pomocí SPE THC o čistotě 90,1 % a výtěžnosti 3,55g/100 g matrice. SFE v kombinaci s SPE je tedy možné použít pro extrakci THC o vysoké čistotě za relativně krátký čas, přijatelných extrakčních podmínek a při spotřebě nízkého množství organických rozpouštědel při extrakci pomocí SFE.

Dále je popsána extrakce kolchicinu a příbuzných alkaloidů ze semen rostliny *Colchicum autumnale* pomocí superkritického oxidu uhličitého [36]. Za využití SFE byly dvěma po sobě jdoucími extrakcemi extrahovány alkaloidy kolchicin, 3-demethylkolchicin a kolchikosid. Semena byla extrahována ve statickém módu po dobu 25 min a v dynamickém módu po dobu 30 min, poté byl tento proces ještě jednou opakován na stejném vzorku, protože vyšší extrakční výtěžnost pro kolchikosid byla získána až ve druhé extrakci. Celková doba extrakce byla 110 min. Jako extrakční médium byl použit CO<sub>2</sub> + 3 % methanol. Průtoková rychlost extrakčního média byla 1,5 ml/min. Při zoptimalizovaných podmínkách bylo možné extrahovat mírně vyšší množství kolchicinu a 3-demethylkolchicinu z 200 mg matrice, než za využití macerace se sonikací. Kolchikosid byl extrahován o něco lépe za pomoci macerace se sonikací než SFE. Je důležité upozornit na to, že SFE probíhala po dobu 110 min, oproti tomu macerace se sonikací trvala 24 h.

Podle této práce je tedy možné usoudit, že SFE má vlastnosti, které se dají využít pro časově, ekonomicky a ekologicky efektivní extrakci alkaloidů z rostlinného materiálu.

Extrakcí bioaktivních látek z listů rostliny *Artemisia annua* za použití SFE [37], vody a ethanolu, byl získán SFE extrakt artemisininu s  $IC_{50}$  proti *Plasmodium falciparum* nižší než 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . Za použití SFE byl získán extrakt artemisininu s koncentrací 95,1 mg/g extraktu. Pomocí ethanolu byl získán extrakt se skoro stejnou koncentrací 95,6 mg/g extraktu. Matrice, která byla použita k SFE, byla ještě jednou použita pro extrakci polárních bioaktivních látek za použití ethanolu nebo vody. SFE extrakce byla více selektivní pro artemisinin než pro polární sloučeniny, z důvodu použití 100 %  $\text{CO}_2$  bez kosolventu, bylo tedy možné z již použité matrice fenolické látky extrahovat. Bylo dosaženo extraktu s vysokou koncentrací artemisininu, s vysokým účinkem proti *Plasmodium falciparum* za použití SFE i ethanolu a dále bylo dosaženo zisku polárních bioaktivních látek, jako jsou fenolické látky i flavonoidy z již použité matrice.

Superkritická fluidní extrakce tabákového odpadu [38], který vzniká při zpracování rostliny *Virginia tabacco*, poukazuje na možné další využití tohoto odpadu. Za použití SFE byl extrahován solanesol a nikotin. Solanesol je obsažen v listech *Solanaceae*. Mezi účinky solanesolu patří např. protizánětlivý, antibakteriální, antivirotický a antifungální účinek. Extrakce pomocí SFE probíhaly pouze za využití 100 %  $\text{CO}_2$  jako extrakčního média, bez přídavku kosolventu. SFE extrakty byly následně podrobeny extrakci kapalina – kapalina, pro oddělení solanesolu od nikotinu. Nejvyšší extrakční výtěžnost pro solanesol byla při extrakčních podmínkách tlaku 150 bar a teplotě 40 °C. Nejvyšší extrakční výtěžnost pro nikotin byla dosažena při podmínkách tlaku 370 bar a teplotě 58 °C. Je tedy možné použít dvoukrokovou extrakci, kdy v prvním kroku extrakce bude extrahován převážně solanesol při podmínkách 150 bar a 40 °C a ve druhém kroku při extrakčních podmínkách 370 bar a teplotě 58 °C nikotin.

Při extrakci aromatických sloučenin z květů *Lavandula angustifolia* za využití tří různých extrakčních metod [39] byla nejvyšší extrakční výtěžnost u SFE. Extrakce probíhaly ze dvou různých matic a vyšší extrakční výtěžnost byla obecně pozorována u matrice z vyšší nadmořské výšky (500 m). Extrakční výtěžnost pro SFE u matrice získané ve vyšší nadmořské výšce činila 3,7 %/g matrice. V tomto extraktu byl nejvíce zastoupen linalool 43,30 %, linalyl acetát 21,00 %, alfa-bisabolol 11,87 % a kafr 8,20 %. SFE extrakt obsahoval vyšší množství seskviterpenů a nízké

množství uhlovodíkových monoterpenů, než extrakty získané pomocí UAE a hydrodestilace. Uhlovodíkové monoterpeny snadno oxidují a snižují tímto stabilitu, kvalitu a vůni esenciálních olejů. Za pomoci stanovení s využitím kalibrace u 5 vybraných analytů byla nalezena u 4 analytů - linalool, kafr, linalyl acetát a (E)-karyophylen - koncentrace v SFE extraktu vyšší než u hydrodestilace.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité chemikálie

- ultračistá voda připravena na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové přístrojem Milli-Q Direct Water Purification System (Merck spol. s.r.o., Česká republika)
- destilovaná voda připravena na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové přístrojem Millipore (Merck spol. s.r.o., Česká republika)
- ethanol absolutní  $\geq 99,7$  % (VWR International s.r.o., Česká republika)
- methanol  $\geq 99,9$  % HiPerSolv CHROMANORM<sup>®</sup>, HPLC – ULTRA LC-MS (Merck KGaA, Česká republika)
- kyselina mravenčí  $\geq 99$  %, LC-MS (Merck KGaA, Česká republika)
- oxid uhličitý  $> 99,995$  % (Messer, Česká republika)
- acetonitril RS  $\geq 99,95$  %, LC/MS (CARLO ERBA Reagents S.A.S.)
- kyselina octová  $\geq 99$  % (Penta s.r.o., Česká republika)

### 4.2 Standardy

- katechin  $\geq 98$  % (Honeywell Fluka)
- hyperosid  $\geq 98,35$  % (MedChemExpress, USA)
- hirsutrin  $\geq 90,1$  % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- reynoutrin  $\geq 97$  % (MedChemExpress, USA)
- kvercetin  $\geq 95$  % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- kyselina gallová  $\geq 97,5-102,5$  % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- rutin hydrát  $\geq 94$  % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- kyselina kávová  $\geq 98$  % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- kyselina chlorogenová  $\geq 95$  % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- kvercitrin hydrát  $\geq 97$  % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- floridzin dihydrát  $\geq 99$  % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- floretin  $\geq 99$  % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- guaiaverin  $\geq 99,3$  % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- epikatechin  $\geq 90$  % (Sigma-Aldrich, Česká republika)

## 4.3 Přístrojové vybavení

### Příprava vzorku

- mixér Sencor (Sencor, Česká republika)

### SFE

- SFE systém MV-10 (Waters, USA)
- extrakční cela 5 ml (Waters, USA)
- skleněné kuličky 2, 3 a 5 mm (Waters, Česká republika)
- ChromScope™ software (Waters, USA)

### Příprava standardů a úprava extraktů

- digitální ultrazvuková lázeň DU-32 (Argo Lab, Itálie)
- rotační vákuová odparka Concentrator plus 5305 (Eppendorf, Česká republika)
- třepačka TS-100 (Biosan, Česká republika)
- centrifuga MPW 260R (MPW, Polsko)

### UHPLC

- Empower vyhodnocovací software (Waters, USA)
- Acquity UPLC systém (Waters, USA) – čerpadlo, automatický dávkovač, kolonový termostat
- chromatografická kolona s vícevrstvou reverzní fází typu C18, YMC Triart C18 (150 x 3 mm, 1,9 µm) (YMC, Japonsko)
- MODDE software 12.1 (Umetrics, Švédsko)

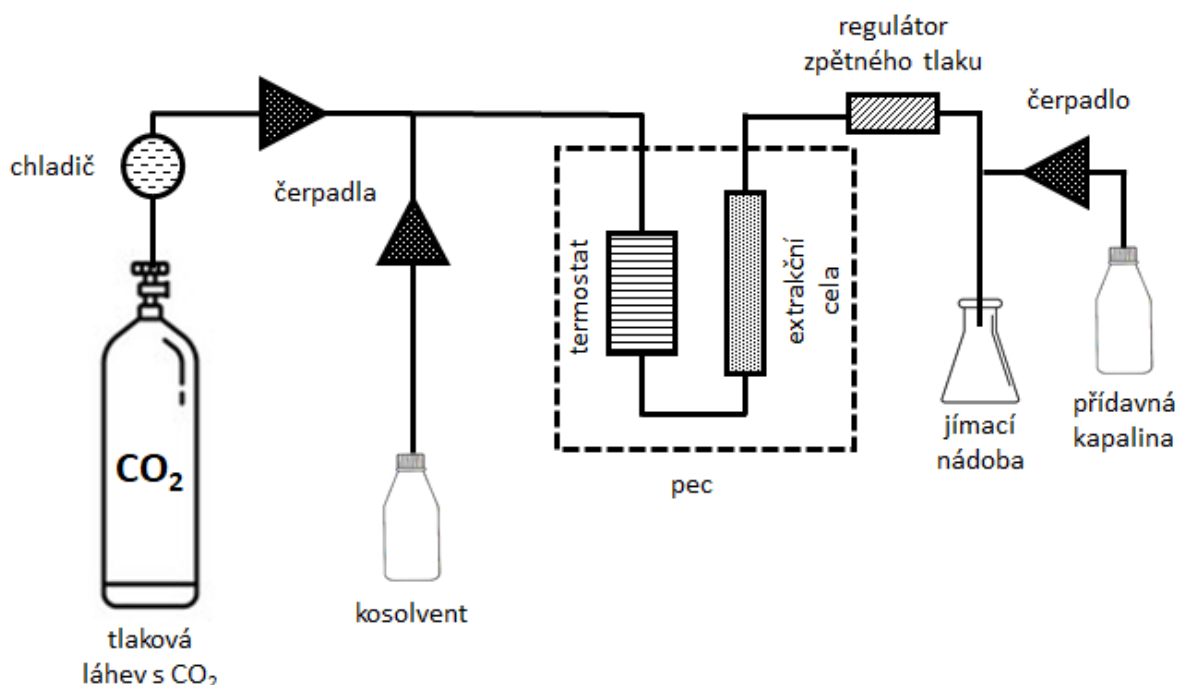
## 4.4 SFE metoda

### 4.4.1 Příprava vzorků pro extrakci

Pro optimalizaci metody byly použity sušené jablečné křížaly odrůdy Matčino (pozdní letní jablko), potřebná hmotnost pro celý experiment byla doplněna malým množstvím jablečných křížal dalších odrůd. Křížaly byly sušeny při teplotě 70 °C po dobu 8 hodin (dužina + slupka). Následně byly křížaly homogenizovány pomocí mixéru na jemnou směs. Směs byla uchovávána v uzavřené skleněné nádobě v suchu, chladu a tmě.

#### 4.4.2 Postup extrakce

Navážka vzorku pro extrakci byla 0,5 g. Navážka byla umístěna do 5 ml extrakční cely mezi dvě vrstvy skleněných kuliček. Následně byla extrakční cela zapojena systémem kapilár do pece v systému SFE. Extrakční cela byla zapojena tak, aby přívod kosolventu a CO<sub>2</sub> byl připojen ze spodní části extrakční cely a vývod z horní části. Sběrná kapilára byla vložena do jímací nádoby. Po skončení extrakce bylo množství extraktu změřeno v odměrném válci a jeho část uchována ve vialkách do doby analýzy při teplotě -20°C.



**Obrázek 8:** Schéma přístroje SFE

Obrázek 8 znázorňuje schéma SFE. Přívod kapalného CO<sub>2</sub> z tlakové láhve a kosolventu do systému zabezpečují čerpadla. Před CO<sub>2</sub> čerpádlem je chladič, který udržuje hlavy CO<sub>2</sub> čerpadla chlazené na 4 °C, čímž zabezpečuje přívod CO<sub>2</sub> v kapalném stavu. Extrakční médium poté proudí do vyhřívané pece. Extrakční pec se senzory pro kontrolu teploty je částí SFE systému, která vyhřívá extrakční celu na požadovanou teplotu. Extrakční médium se dostává do extrakční cely, která obsahuje vzorek a dochází k extrakci. Následující částí je regulátor zpětného tlaku, který při extrakci udržuje stabilní nastavený tlak. Součástí SFE je i čerpadlo pro přidavnou kapalinu pro extrakce s nízkým obsahem kosolventu v extrakčním médiu, aby se předcházelo vysrážení

extraktu v systému kapilár. Poslední částí je kolektor extraktů, který se skládá z jímacích nádob pro finální extrakty.

#### **4.4.3 Úprava SFE extraktů**

Získané extrakty byly upraveny následujícím způsobem: 1 ml extraktu byl odpipetován do Eppendorfovy zkumavky a odpařen na rotační vakuové odparce při teplotě 45 °C do sucha. K odparkům bylo přidáno 100 µl extrakčního rozpouštědla a byly třepány po dobu 10 min. Rozpuštěný odparek se následně 10 minut centrifugoval při zrychlení 18188 G a teplotě 4 °C. Supernatant byl následně odebrán pomocí automatické pipety do mikrovialek. Zpracované extrakty byly bezprostředně vloženy do autosampleru UHPLC přístroje a analyzovány.

#### **4.4.4 Optimalizace SFE metody**

Optimalizace extrakce byla rozdělena do několika kroků:

1. Identifikace signifikantních faktorů ovlivňujících výtěžnost extrakce
2. Vliv průtoku extrakčního média na kinetiku extrakce
3. Vliv velikosti skleněných kuliček na výtěžnost extrakce
4. Ověření opakovatelnosti optimalizované metody

#### **Identifikace signifikantních faktorů ovlivňujících výtěžnost extrakce**

Prvním krokem optimalizace metody byla identifikace signifikantních faktorů na výtěžnost extrakce. K tomuto účelu byl použit software MODDE, kde byl pomocí Plackett-Burman (PB) designu vytvořen seznam jedenácti experimentů včetně 3 středových bodů. Jednotlivé extrakce byly provedeny v duplikátech a celkový počet experimentů provedených v náhodném pořadí byl 22. PB design slouží jako experimentální screening, umožňující identifikaci signifikantních faktorů bez nutnosti generování velkého množství dat. V tomto kroku byly zadány sledované parametry – tlak a teplota extrakce, množství oxidu uhličitého a vody v extrakčním rozpouštědle. Rozmezí testovaných faktorů bylo zvoleno na základě fyzikálně-chemických vlastností analytů a pracovního rozsahu instrumentace. Rozsah testovaných faktorů byl následovný: teplota 30–80 °C, tlak 100–300 bar, obsah oxidu uhličitého 10–90 %, obsah vody v ethanolicím kosolventu 0–20 %. Průtoková rychlost extrakčního rozpouštědla byla 2 ml/min a čas extrakce 10 minut. Vzorek byl

umístěn sendvičovým způsobem mezi dvě vrstvy skleněných kuliček s průměrem 3 mm. Extrakce probíhaly v dynamickém módu. Jako prevence vysrážení extraktu v kapilárách při extrakci s použitím 90 % CO<sub>2</sub>, bez ohledu na obsah vody v kosolventu byl přidán ethanol jako přídavná kapalina s průtokovou rychlostí 0,5 ml/min. Přehled podmínek a pořadí experimentů je uveden v Tabulce 5.

#### **Vliv průtoku extrakčního média na kinetiku extrakce**

Ve druhém kroku byl testován vliv průtokové rychlosti 2–5 ml/min na výtěžnost extrakce. Extrakce s různými průtokovými rychlostmi byly aplikovány na již optimalizované podmínky extrakce z prvního kroku optimalizace. Oproti prvnímu kroku optimalizace extrakce probíhaly 60 min a extrakty byly odebírány postupně v časových intervalech po 5, 10, 15, 30, 45, 60 minutách.

#### **Vliv velikosti skleněných kuliček na výtěžnost extrakce**

Ve třetím kroku byl testován vliv velikosti použitých skleněných kuliček na výtěžnost extrakce. Optimalizace extrakce probíhala při optimálních podmínkách získaných z prvního a druhého kroku optimalizace. Byly zde testovány skleněné kuličky o průměru 2, 3 a 5 mm.

#### **Ověření opakovatelnosti optimalizované metody**

Ve čtvrtém kroku byla ověřena opakovatelnost optimalizovaných podmínek extrakce. Optimalizované podmínky byly použity pro extrakci ve třech po sobě jdoucích dnech. Každý den byly extrahovány tři extrakty. Míra opakovatelnosti byla vyjádřena jako RSD (%) ze třech dní.

**Tabulka 5:** Přehled podmínek extrakcí Plackett-Burman designu

extrakce	pořadí	CO <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> O (%)	teplota (°C)	tlak (bar)	průtok CO <sub>2</sub> (ml/min)	průtok kosolventu (ml/min)	přídavná kapalina (ml/min)
N1	8	90	0	30	300	1,8	0,2	0,5
N2	17	90	20	30	100	1,8	0,2	0,5
N3	20	90	20	80	100	1,8	0,2	0,5
N4	7	10	20	80	300	0,2	1,8	0,0
N5	4	90	0	80	300	1,8	0,2	0,5
N6	1	10	20	30	300	0,2	1,8	0,0
N7	13	10	0	80	100	0,2	1,8	0,0
N8	11	10	0	30	100	0,2	1,8	0,0
N9	19	50	10	55	200	1,0	1,0	0,0
N10	10	50	10	55	200	1,0	1,0	0,0
N11	16	50	10	55	200	1,0	1,0	0,0
N12	22	90	0	30	300	1,8	0,2	0,5
N13	18	90	20	30	100	1,8	0,2	0,5
N14	2	90	20	80	100	1,8	0,2	0,5
N15	14	10	20	80	300	0,2	1,8	0,0
N16	6	90	0	80	300	1,8	0,2	0,5
N17	21	10	20	30	300	0,2	1,8	0,0
N18	5	10	0	80	100	0,2	1,8	0,0
N19	12	10	0	30	100	0,2	1,8	0,0
N20	15	50	10	55	200	1,0	1,0	0,0
N21	9	50	10	55	200	1,0	1,0	0,0
N22	3	50	10	55	200	1,0	1,0	0,0

#### 4.4.5 Hodnocení vhodnosti modelu extrakčních podmínek

Každý model popisuje sumární statistiku vyjádřenou čtyřmi parametry: vhodnost modelu (R<sup>2</sup>), přesnost budoucí predikce (Q<sup>2</sup>), validita, opakovatelnost.

Hodnota vhodnosti modelu R<sup>2</sup> menší než 0,5 představuje model s nízkým významem. Q<sup>2</sup> hodnota odhaduje přesnost budoucí predikce a měla by být vyšší než 0,1 pro významný model a vyšší než 0,5 pro dobrý model. Zároveň by měl být rozdíl mezi R<sup>2</sup> a Q<sup>2</sup> hodnotami menší, než 0,3. Q<sup>2</sup> je nejlepší a nejcitlivější indikátor.

Validita modelu je test různých problémů modelu. Hodnota menší než 0,25 indikuje statisticky významný problém modelu (přítomnost odlehlých hodnot, nevhodný typ modelu,

problém s transformací dat). Nízká hodnota může indikovat i chybějící faktor a/nebo chybějící kvadratický člen faktoru. Validita modelu může být nízká i v případě, pokud je celková chyba velmi malá (téměř identické replikáty) a model je dobrý a kompletní. Když je celková chyba tak malá, že replikáty se považují za identické, je problém s hodnocením validity modelu (z toho důvodu může být v tomto případě nízká). Například validita modelu může být nízká, i když je hodnota  $Q^2$  vyšší než 0,9. Je to z důvodu vysoké citlivosti testu a/nebo extrémně dobrých replikátů.

Opakovatelnost vyjadřuje variabilitu replikátů v porovnání s celkovou variabilitou. Opakovatelnost by měla být vyšší než 0,5.

## **4.5 Příprava roztoků**

### **4.5.1 Příprava ředícího roztoku**

Ředící roztok byl použit pro přípravu a ředění standardů a pro rekonstituci odpařených extraktů. Složení roztoku bylo následovné: 60:40 MeOH:H<sub>2</sub>O (v/v) s přídavkem 0,1% (v/v) kyseliny mravenčí. Pro přípravu zásobních standardů hůř rozpustných analytů, jako kvercetin a jeho deriváty, byly připraveny dva individuální roztoky. První roztok byl 100% methanol s 0,1% (v/v) kyselinou mravenčí a druhý ultračistá voda s 0,1% (v/v) kyselinou mravenčí. Rozpouštění tudíž probíhalo nejdříve v 60 % požadovaného objemu methanolické složky, až pak bylo přidáno 40 % požadovaného objemu vodné složky.

### **4.5.2 Příprava zásobních standardů**

Z každého standardu bylo naváženo přibližně 0,2 mg. Navážka se rozpustila v příslušném objemu ředícího roztoku tak, aby byla koncentrace standardu 0,2 mg/ml. Objem ředícího roztoku byl vypočten podle navážky a čistoty standardu. Dokonalé rozpuštění bylo podpořeno třepáním na třepačce. Deriváty kvercetinu byly pro jejich horší rozpustnost rozpuštěny ve dvou krocích (viz 4.5.1) a vloženy do ultrazvukové lázně na 15 minut.

### **4.5.3 Příprava směšného standardu**

Směšný standard o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  byl připraven tak, že od každého zásobního standardu bylo do mikrovialky napipetováno 50  $\mu\text{l}$  a ředícím roztokem byl objem doplněn na 1 ml (300  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku). Směšné standardy byly uchovávány při teplotě 4 °C.

#### 4.5.4 Příprava mobilní fáze pro UHPLC

Pro UHPLC separaci byla připravena vodná složka mobilní fáze z ultračisté vody, která byla okyselená kyselinou octovou na pH 2,8. Organickou složku mobilní fáze tvořil acetonitril.

#### 4.6 UHPLC-DAD metoda

Pro analýzu extraktů byl použit UPLC systém Acquity s detektorem diodového pole. Separace fenolických látek probíhala na koloně YMC Triart C18 ExRS (150 x 3 mm; 1,9 µm). Mobilní fáze se skládala z ultračisté vody okyselené kyselinou octovou na pH 2,8 (A) a acetonitrilu (B). Pro separaci byla použita gradientová eluce (viz Tabulka 6). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,35 ml/min, objem nástřiku byl 2 µl, teplota kolonového termostatu byla nastavená na 30 °C a teplota autosampleru na 6 °C. Detekce probíhala na vybraných vlnových délkách:

254 nm – guaiaverin, hirsutrin, hyperosid, reynoutrin, kvercitrin

280 nm – kyselina gallová, epikatechin, katechin, floridzin, floretin

320 nm – kyselina chlorogenová, kyselina kávová

365 nm – rutin, kvercetin

**Tabulka 6:** Gradientová eluce UHPLC-DAD separace

čas (min)	složka A (%)	složka B (%)
0,0	90	10
8,0	78	22
10,2	72	28
10,7	60	40
13,7	50	50
13,9	50	50
14,1	90	10
17,5	90	10

Podmínky separační metody byly převzaty z předchozí experimentální práce Mgr. Marcely Hollé.

##### 4.6.1 Hodnocení UHPLC analýzy fenolických látek

Po UHPLC separaci byly píky analytů integrovány na příslušných vlnových délkách. Píky byly identifikovány na základě porovnání jejich retenčních časů a retenčních časů příslušných

standardů. Plochy integrovaných píků byly použity k výpočtu koncentrace analyzovaných látek v  $\mu\text{g/g}$ .

#### 4.6.2 Výpočet koncentrace analyzovaných látek

Výpočet koncentrace analytů v  $\mu\text{g/g}$  sušených jablečných křížal probíhal dle vzorce:

$$c = ((A_{vz} * 10) / (A_{st}) * V_r * (1/10)) * 2$$

$A_{vz}$  - plocha vzorku,  $A_{st}$  - plocha standardu s koncentrací  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $V_r$  - celkový objem získaného extraktu,  $1/10$  - zakoncentrování, násobení  $2$  - přepočet koncentrace z navážky vzorku  $0,5 \text{ g}$  na  $1 \text{ g}$

#### 4.6.3 Směrodatná odchylka (SD) a relativní směrodatná odchylka (RSD)

Směrodatná odchylka udává, jak moc jsou data odlehlá od jejich průměru. Vypočítá se jako odmocnina z rozptylu. Rozptyl udává průměr druhých mocnin rozdílů mezi průměrem získaných hodnot a jednotlivými hodnotami.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x_p)^2}{n}}$$

$x_i$  = získané hodnoty,  $x_p$  = průměr získaných hodnot,  $n$  = počet získaných hodnot

Relativní směrodatná odchylka se udává v % a vyjadřuje, jak je směrodatná odchylka velká ve vztahu k průměru získaných hodnot.

$$RSD = \frac{SD}{x_p} * 100$$

## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Plackett-Burman design

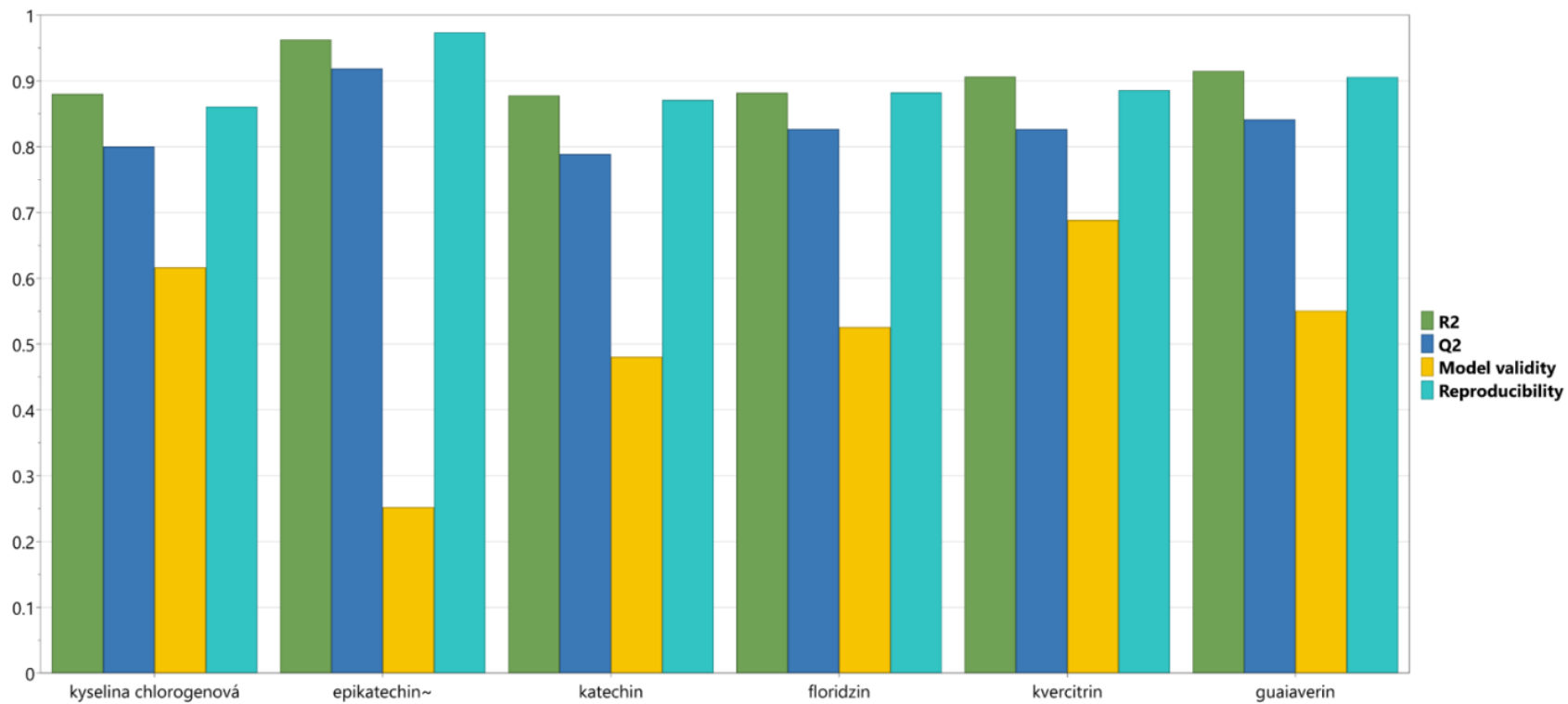
Hodnocení a optimalizace metody byly zaměřeny na 6 nejzastoupenějších analytů – kyselina chlorogenová, epikatechin, katechin, floridzin, kvercitrin a guaiaverin pro jejich majoritní zastoupení ze 14 sledovaných analytů, viz oddíl 5.2.1. Ze 14 stanovovaných analytů, byl floretin jediným analytem, který nebyl stanoven v žádném extraktu.

R2 představuje vhodnost modelu. U všech vybraných nejzastoupenějších analytů (kyselina chlorogenová, epikatechin, katechin, floridzin, kvercitrin a guaiaverin) byla jeho hodnota vyšší než 0,5 a pohybovala se okolo 0,9. Podle toho parametru bylo dosaženo závěru, že model je vhodný pro všechny vybrané analyty.

Q2 odhaduje přesnost budoucí predikce. Pro všechny vybrané analyty byla hodnota Q2 vyšší než 0,5, což vyjadřuje dobrý model. Zároveň by se hodnota Q2 neměla lišit od R2 o více než 0,3, což splňují všechny vybrané analyty.

Validita modelu představuje test různých problémů modelu. U katechinu, floridzinu a guaiaverinu se hodnota validity modelu pohybovala okolo 0,5, u kyseliny chlorogenové se pohybovala okolo 0,6 a u kvercitrinu okolo 0,7. Hodnota validity modelu by neměla být nižší než 0,25. Podle těchto dat nebyly zjištěny statisticky významné problémy modelu. Nejnižší validita modelu byla zjištěna u epikatechinu s hodnotou přibližně 0,25 i přesto, že Q2 byla u epikatechinu ze všech vybraných analytů nejvyšší. V takovém případě mohla být nízká hodnota validity modelu způsobena vysokou citlivostí testu.

Opakovatelnost vyjadřuje variabilitu porovnávaných replikátů s celkovou variabilitou. Opakovatelnost se u všech vybraných analytů pohybovala okolo 0,9, což vyjadřuje dobrou opakovatelnost.



**Obrázek 9:** Přehled vhodnosti modelu pro 6 nejzastoupenějších analytů

*model validity – validita modelu, reproducibility - opakovatelnost*

## 5.2 Identifikace signifikantních faktorů ovlivňujících výtěžnost extrakce

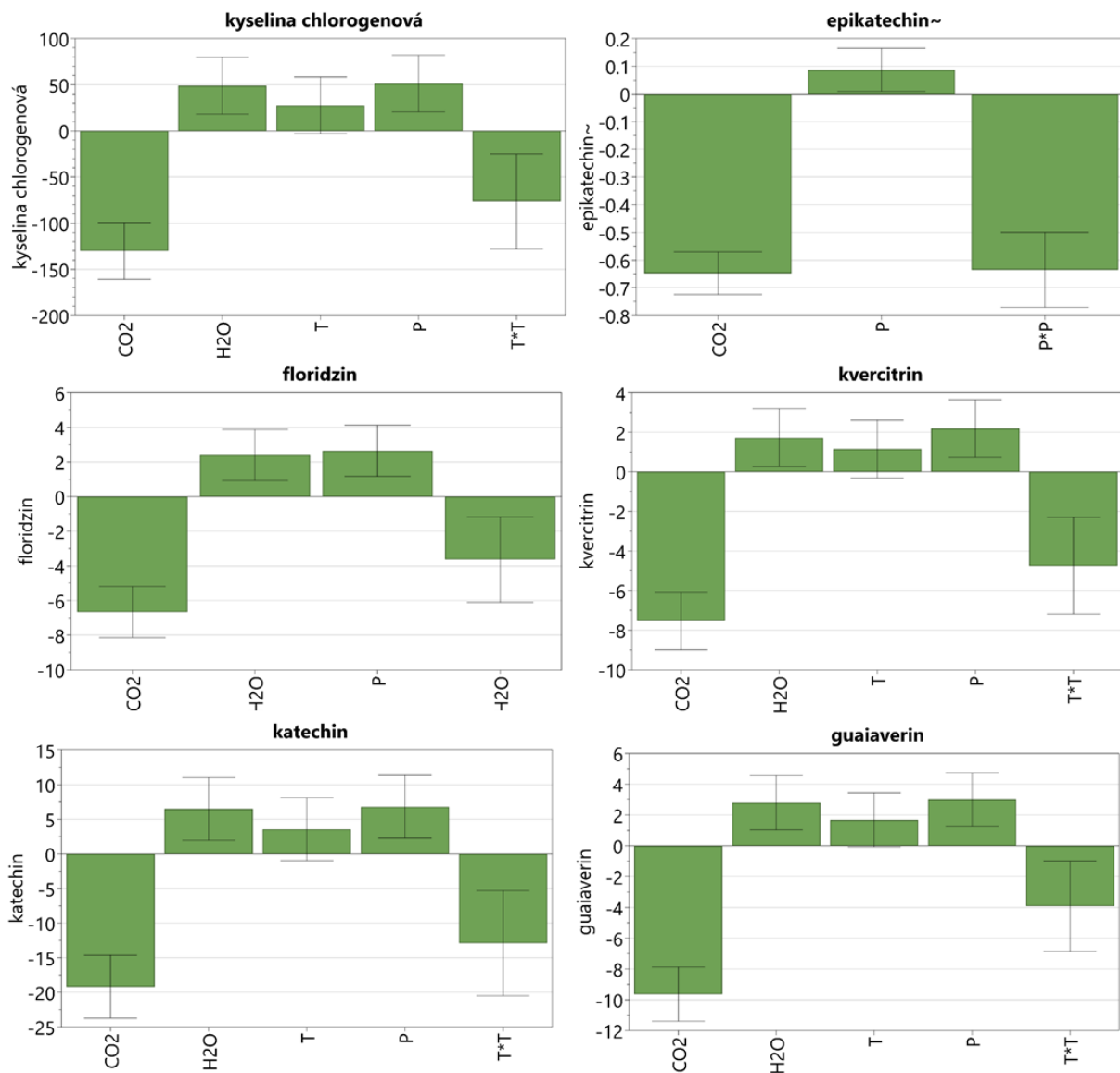
Vliv obsahu CO<sub>2</sub> v extrakčním médiu na výtěžnost extrakce je u všech vybraných analytů nejvýznamnější. Záporné hodnoty vyjadřují, že zvýšením obsahu CO<sub>2</sub> dochází k rapidnímu snížení výtěžnosti, a naopak se snížením obsahu CO<sub>2</sub> v extrakčním médiu dochází ke zvýšení výtěžnosti extrakce. Tento efekt je v souladu s nízkou polaritou CO<sub>2</sub>, která výrazně limituje výtěžnost extrakce analytů s polárním charakterem. Nejnižší možný obsah CO<sub>2</sub> v extrakčním médiu je 10 %.

Obsah H<sub>2</sub>O v kosolventu významně ovlivňuje extrakční výtěžnost kyseliny chlorogenové, floridzinu, kvercitrinu, katechinu a guaiaverinu. Vliv obsahu H<sub>2</sub>O v kosolventu je u těchto analytů, společně s tlakem, druhým nejvýznamnějším faktorem. Zvýšením obsahu H<sub>2</sub>O v kosolventu dochází ke zvýšení výtěžnosti analytů. U floridzinu byl obsah H<sub>2</sub>O v kosolventu identifikován jako kvadratický člen. Pro výtěžnost epikatechinu byl vliv obsahu vody v kosolventu nesignifikantním faktorem. Maximální možná koncentrace H<sub>2</sub>O v kosolventu je 20 %, při vyšší koncentraci by docházelo k rozdělení fází extrakčního média.

Tlak působí na výtěžnost všech vybraných analytů podobně, a to takovým způsobem, že se zvýšením tlaku dochází i ke zvýšení výtěžnosti extrakce. U epikatechinu byl tlak druhým nejvýznamnějším faktorem a byl identifikován jako kvadratický člen. Maximální možný tlak extrakce použité SFE instrumentace byl 300 bar.

Teplota má z testovaných faktorů nejmenší vliv na výtěžnost extrakce analytů. U analytů kyseliny chlorogenové, kvercitrinu, katechinu a guaiaverinu model identifikoval teplotu jako kvadratický člen. Vliv teploty na výtěžnost bude mít u těchto analytů kvadratický průběh. U analytů epikatechinu a floridzinu byl vliv teploty nesignifikantní.

Krabicové grafy popisují intenzitu vlivu identifikovaných signifikantních faktorů na výtěžnost 6 vybraných analytů.



**Obrázek 10:** Vliv signifikantních faktorů na výtěžnost analytů

T\*T, P\*P, H<sub>2</sub>O\*H<sub>2</sub>O označují kvadratický člen faktoru, který byl vložen tam, kde model identifikoval přítomnost kvadratického členu.

### 5.2.1 Vliv testovaných faktorů na výtěžnost extrakce

Pro zjištění významnosti testovaných faktorů, jejich vlivu na extrakci všech studovaných fenolických látek a optimalizaci extrakčních podmínek byl použit software MODDE. Samotná optimalizace extrakčních podmínek však byla přizpůsobena pro šest nejkonzentrovanejších analytů, což byly kyselina chlorogenová, epikatechin, katechin, kvercitrin, guaiaverin a floridzin. Je to z toho důvodu, že optimální extrakční podmínky minoritně zastoupených fenolických látek

se mohou výrazně lišit od optimálních extrakčních podmínek majoritních analytů. Tudíž míra kompromisu pro volbu optimálních extrakčních podmínek by mohla negativně ovlivnit celkovou výtěžnost extrakce.

Na základě ploch identifikovaných píků UHPLC-DAD analýzy byly vypočteny koncentrace kvantifikovaných analytů v  $\mu\text{g/g}$  vzorku. Tabulka 7 vyobrazuje výtěžnosti pro jednotlivé extrakční podmínky. Výtěžnost je hodnocena v podobě součtu koncentrací všech kvantifikovaných analytů a součtu koncentrací šesti nejvíce zastoupených analytů – kyselina chlorogenová, epikatechin, katechin, kvercitrin, guaiaverin a floridzin. Jak je možné vidět z Tabulky 7, rozdíly v koncentracích všech kvantifikovaných analytů a šesti vybraných analytů jsou malé, což znamená, že analyty, které byly vybrány, jsou majoritně zastoupeny, a proto musí být zohledněn vliv extrakčních podmínek na jejich výtěžnost. Na základě relativní směrodatné odchylky můžeme porovnat míru opakovatelnosti extrakcí mezi jednotlivými experimenty. Relativní směrodatná odchylka byla vypočtena ze sum všech kvantifikovaných analytů v obou duplikátech pro daný experiment.

Nejvyšší extrakční výtěžnosti bylo dosaženo při extrakcích N4 a N15, kdy extrakce probíhala s 10 %  $\text{CO}_2$  v extrakčním médiu a 20 %  $\text{H}_2\text{O}$  v kosolventu při teplotě 80 °C a tlaku 300 bar. RSD pro dané extrakce byla 2,05 %, což vypovídá o dobré opakovatelnosti. Nejnižší extrakční výtěžnost bylo dosaženo při extrakci N3 a N14 s 90 %  $\text{CO}_2$  a 20 %  $\text{H}_2\text{O}$  v kosolventu při teplotě 80 °C a tlaku 100 bar. Zde bylo zjištěno i vysoké RSD 26,4 %, které vypovídá o špatné opakovatelnosti. Extrakce N21 je odlehlá hodnota. Z Tabulky 7 lze vidět, že obsah  $\text{CO}_2$  v extrakčním médiu je nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím extrakci. Pro extrakci polárních sloučenin jako jsou fenolické látky je dosaženo výrazně vyšší výtěžnosti při použití polárního rozpouštědla, jako např. ethanolu, navíc s přidavkem vody. Se snižujícím se obsahem  $\text{CO}_2$  v extrakčním médiu a zvyšujícím se obsahem  $\text{H}_2\text{O}$  v extrakčním médiu, teplotou a tlakem docházelo k výraznému zvýšení výtěžnosti extrakce.

**Tabulka 7:** Výtěžnosti při jednotlivých extrakčních podmínkách

extrakce	CO <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> O (%)	teplota (°C)	tlak (bar)	suma 6 vybraných analytů (µg/g)	suma všech analytů (µg/g)	RSD (%) <sup>1</sup>
N1	90	0	30	300	17,25	18,95	27,08
N12					29,59	33,02	
N2	90	20	30	300	9,81	11,16	25,18
N13					5,81	6,67	
N3	90	20	80	100	3,87	4,10	26,40
N14					5,85	7,04	
N5	90	0	80	300	29,12	32,40	14,51
N16					21,71	24,19	
N4	10	20	80	300	1281,46	1364,23	2,05
N15					1240,84	1309,48	
N6	10	20	30	300	921,67	976,74	12,69
N17					1199,04	1260,61	
N7	10	0	80	100	798,59	846,33	1,77
N18					769,97	816,97	
N8	10	0	30	300	262,38	281,99	14,31
N19					349,28	376,15	
N9					930,05	979,90	
N10					680,40	727,13	
N11	50	10	55	200	710,12	748,74	31,99
N20					868,82	919,61	
N21					241,68	261,63	
N22					895,24	947,92	

<sup>1</sup> relativní směrodatná odchylka vypočtena ze sum všech kvantifikovaných analytů

**Tabulka 8:** Optimální podmínky extrakce získané v prvním kroku optimalizace SFE

CO <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> O (%)	teplota (°C)	tlak (bar)
10	20	59	300

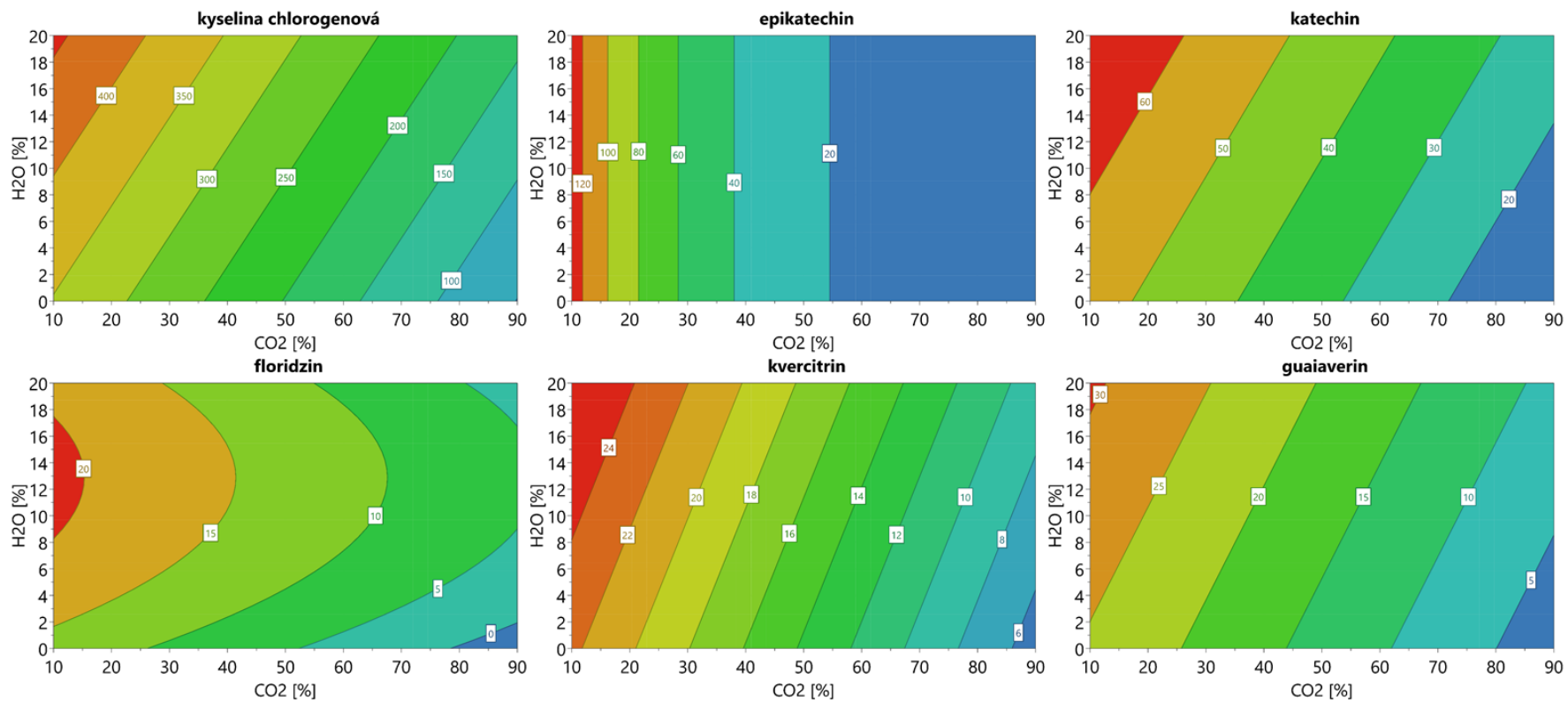
Za využití softwaru MODDE, byly pomocí funkce optimizer vygenerovány optimální podmínky extrakce s cílem maximalizovat výtěžnost extrakce pro 6 nejzastoupenějších analytů v extraktech jablečných křížal. Výsledné optimální podmínky se od extrakcí s nejvyšší výtěžností N4/N15 liší pouze teplotou, která byla při těchto extrakcích o 21 °C vyšší (80 °C) a jsou uvedeny v Tabulce 8. Vliv zvyšující se teploty na výtěžnost má kvadratický průběh u většiny

nejzastoupenějších analytů a narůstá pouze do teploty přibližně 60 °C, při překročení této teploty již nedochází ke kontinuálnímu nárůstu výtěžnosti s rostoucí teplotou, ale naopak dochází ke snižování výtěžnosti s rostoucí teplotou. Tento efekt je pravděpodobně nejvíce způsoben degradací termolabilních fenolických látek při zvyšující se teplotě nad 60 °C. Je důležité podotknout, že použitím vysokého obsahu kosolventu v extrakčním médiu je znemožněno dosažení superkritického stavu extrakčního média, tudíž extrakce probíhá za subkritických podmínek.

Pro detailnější znázornění vlivu testovaných faktorů na výtěžnost byly připraveny vrstevnicové grafy (Obrázky 11–13). Vlivy faktorů byly vyhodnoceny jako funkce hlavního faktoru CO<sub>2</sub>, který byl vždy vynesena na ose x. CO<sub>2</sub> byl identifikován jako nejdůležitější faktor ovlivňující výtěžnost extrakce.

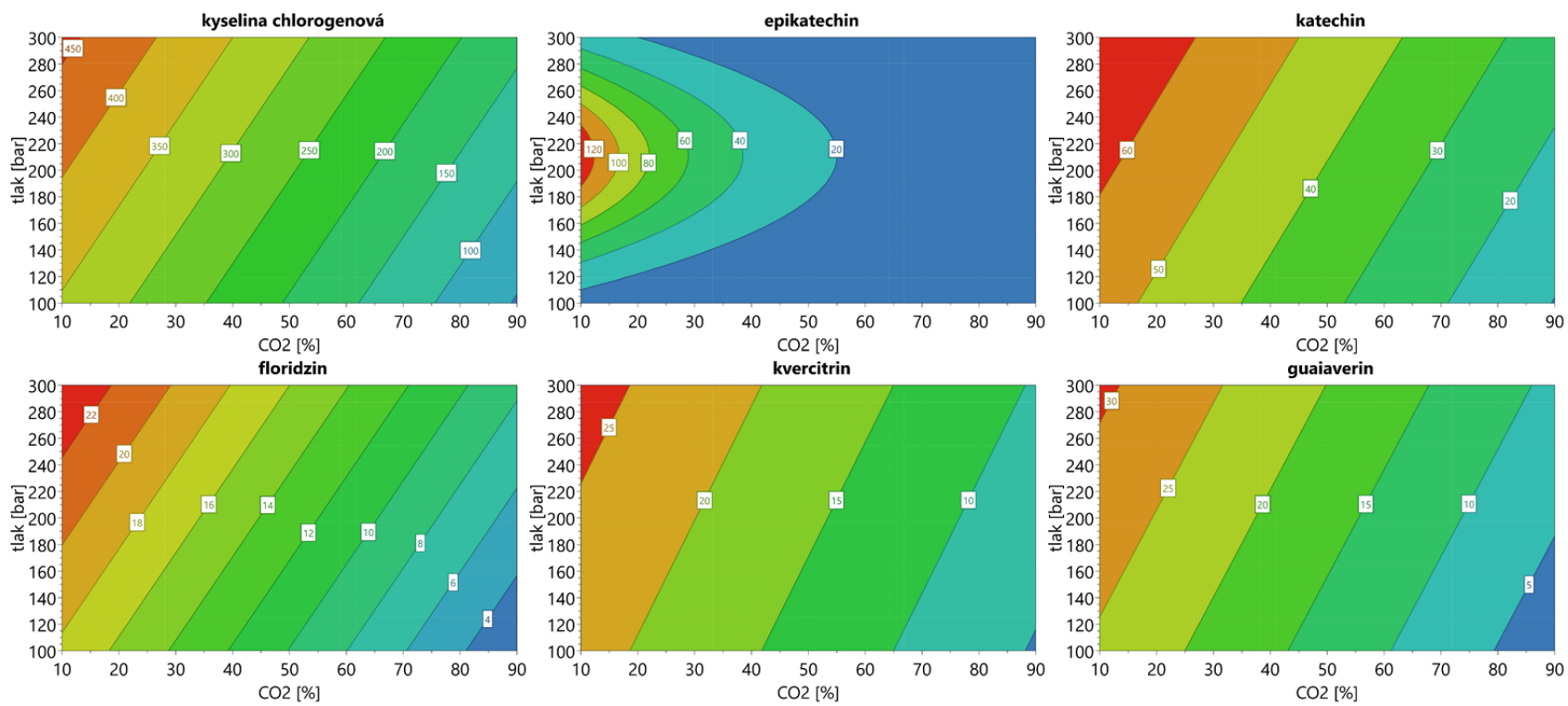
Na Obrázku 11 lze vidět, že se snižujícím se obsahem CO<sub>2</sub> v extrakčním médiu roste i výtěžnost všech vybraných analytů s maximem při 10 % CO<sub>2</sub>. Obsah 10 % CO<sub>2</sub> je nejmenší možný podíl v extrakčním médiu.

U kyseliny chlorogenové, katechinu, kvercitrinu a guaiaverinu se se zvyšujícím obsahem H<sub>2</sub>O lineárně zvyšuje výtěžnost extrakce. Maxima je dosaženo při 20 % obsahu H<sub>2</sub>O v kosolventu. Vliv obsahu H<sub>2</sub>O v kosolventu byl identifikován jako nesignifikantní na výtěžnost epikatechinu. Proto neměl obsah H<sub>2</sub>O v kosolventu vliv na výtěžnost epikatechinu. Kvadratický průběh vlivu obsahu H<sub>2</sub>O v kosolventu na výtěžnost, s maximem přibližně při 13 % H<sub>2</sub>O, byl identifikován pro floridzin. Další zvýšením obsahu H<sub>2</sub>O v kosolventu nad 13 %, již nevede ke kontinuálnímu nárůstu výtěžnosti, ale dochází ke snížení výtěžnosti floridzinu. 20 % obsah H<sub>2</sub>O v kosolventu je zároveň maximální možný, při vyšší koncentraci H<sub>2</sub>O by došlo k rozdělení fází extrakčního média.



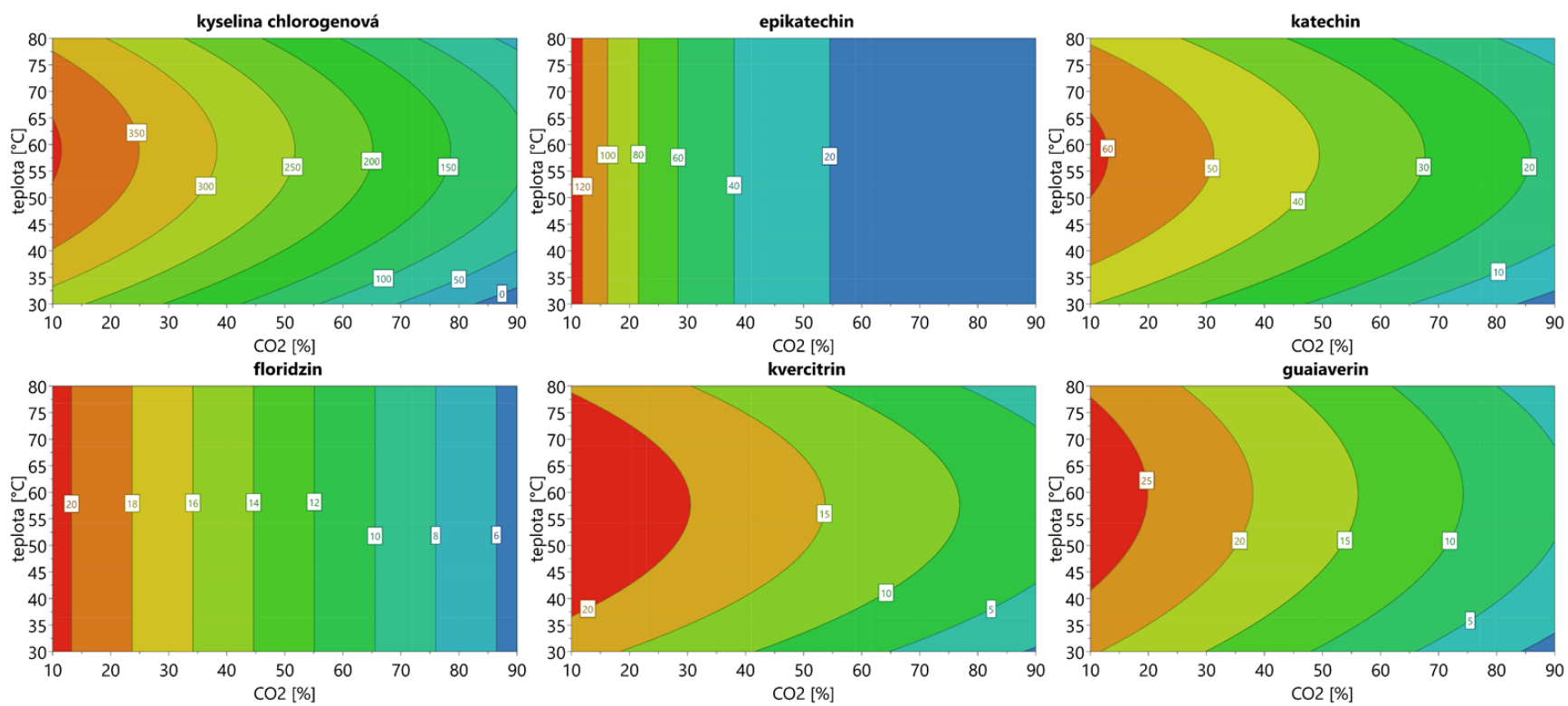
**Obrázek 11:** Vliv obsahu H<sub>2</sub>O v kosolventu a obsahu CO<sub>2</sub> v extrakčním médiu na výtěžnost analytů

Na Obrázku 12 lze vidět, že se zvyšujícím se tlakem dochází ke změnám vlastností extrakčního média jako ke zvýšení solvatační síly a hustoty. Díky těmto změnám dochází ke zvýšení schopnosti extrahovat analyty z matrice. Pro kyselinu chlorogenovou, katechin, floridzin, kvercitrin a guaiaverin má zvyšující se tlak pozitivní vliv na výtěžnost s maximem při 300 bar, což je i maximální použitelný tlak použitého SFE přístroje. Výtěžnost těchto analytů stoupá lineárně s narůstajícím tlakem. Vliv tlaku na výtěžnost epikatechinu má kvadratický průběh s maximem při přibližně 210 bar, při vyšším tlaku výtěžnost klesá.



**Obrázek 12:** Vliv tlaku a obsahu CO<sub>2</sub> v extrakčním médiu na výtěžnost analytů

Na obrázku 13 je viditelné, že pro kyselinu chlorogenovou, katechin, kvercitrin a guaiaverin má vliv teploty na výtěžnost kvadratický průběh s maximem při přibližně 60 °C. Po překročení teploty 60 °C, výtěžnost pozvolna klesá. Vliv teploty byl identifikován jako nesignifikantní na výtěžnost epikatechinu a floridzinu. Proto neměla teplota vliv na výtěžnost epikatechinu ani floridzinu.



**Obrázek 13:** Vliv teploty a obsahu CO<sub>2</sub> v extrakčním médiu na výtěžnost analytů

### 5.3 Vliv průtoku extrakčního média na kinetiku extrakce

Ve druhém kroku optimalizace SFE byl zjišťován vliv průtokové rychlosti na extrakční účinnost. Extrakce byly provedeny v triplikátech na každé testované průtokové rychlosti - 2, 3, 4, 5 ml/min. V průběhu extrakce byly v časových intervalech 5, 10, 15, 30, 45 a 60 min odebírány frakce pro stanovení obsahu fenolických látek. Podmínky extrakce byly optimalizovány vzhledem k výsledkům z prvního kroku optimalizace, tedy 10 % CO<sub>2</sub> v extrakčním médiu, 20 % H<sub>2</sub>O v kosolventu, teplota 59 °C a tlak 300 bar (viz Tabulka 8). Výsledky byly vyjádřeny v podobě kumulativního nárůstu sumy kvantifikovaných analytů v Grafech 1 a 2.

**Tabulka 9:** Vliv průtokové rychlosti extrakčního média na výtěžnost vybraných analytů (μg/g) v čase

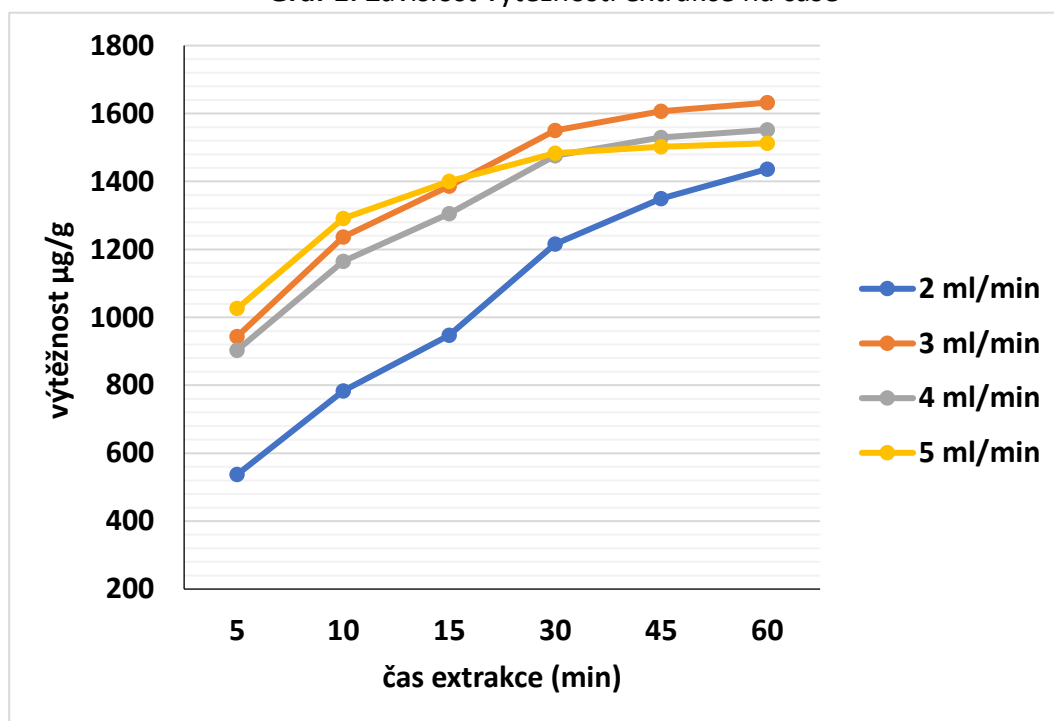
průtoková rychlost (ml/min)	čas (min)					
	5	10	15	30	45	60
2	537,16	783,28	947,54	1215,44	1349,55	1436,47
3	943,59	1236,16	1386,57	1549,82	1607,10	1631,87
4	903,46	1164,49	1305,66	1475,67	1529,82	1551,97
5	1026,08	1290,83	1400,63	1483,80	1501,86	1512,28

Podmínky extrakce: 10 % CO<sub>2</sub>, 20 % H<sub>2</sub>O, teplota 59 °C, tlak 300 bar

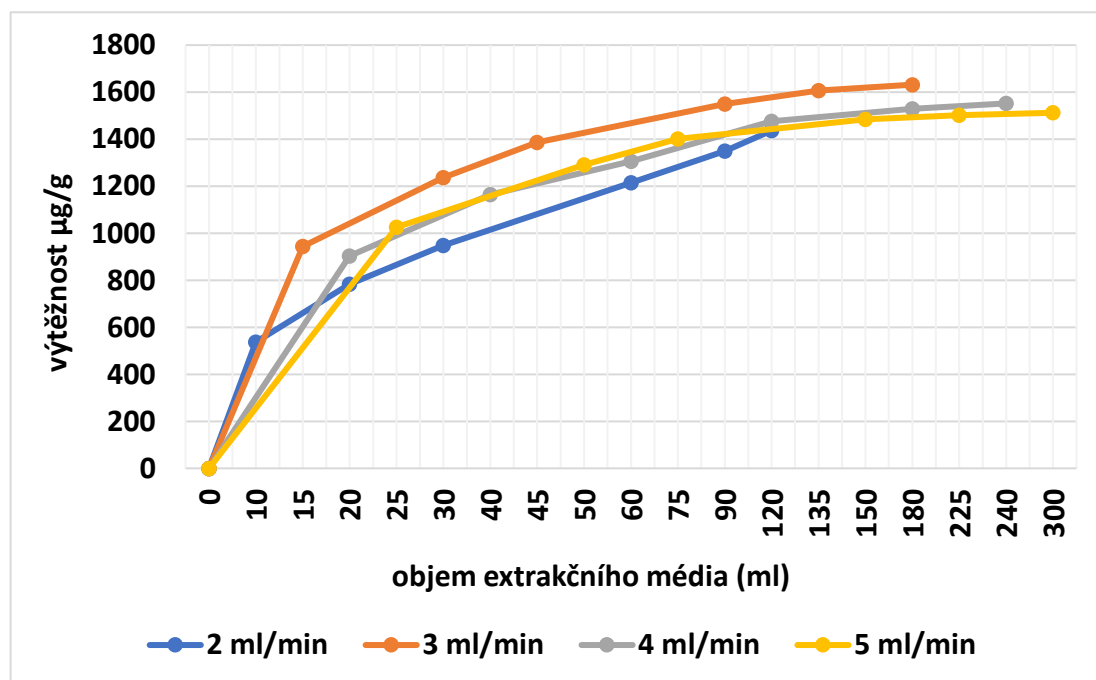
Tabulka 9 uvádí průměrné kumulativní výtěžnosti jednotlivých frakcí při testovaných průtokových rychlostech. Bylo zjištěno, že ve frakcích od 30. minuty poskytuje průtoková rychlost 3 ml/min nejvyšší výtěžnosti. Jak je zároveň vidět v Grafu 1, výtěžnost analytů při extrakci významně narůstala až do 30. minuty. Po 30 minutách extrakce byl nárůst výtěžnosti jen mírný. Jako nejvýhodnější byla proto zvolena doba extrakce 30 min s průtokovou rychlostí 3 ml/min (90 ml extrakčního média/extrakce).

Graf 2 zobrazuje vliv objemu použitého extrakčního média na výtěžnost extrakce. Zde je také vidět, že extrakce s průtokem 3 ml/min po dobu 30 minut poskytuje nejvyšší výtěžnosti i v porovnání s jinými extrakcemi při přibližně stejné spotřebě extrakčního média. Použití vyššího objemu extrakčního rozpouštědla nevedlo k významnému zvýšení výtěžnosti.

Graf 1: Závislost výtěžnosti extrakce na čase



Graf 2: Závislost výtěžnosti extrakce na objemu extrakčního média



## 5.4 Vliv velikosti skleněných kuliček na výtěžnost extrakce

Ve třetím kroku optimalizace SFE, byl sledován vliv velikosti použitých skleněných kuliček na výtěžnost extrakce. Tím, že skleněné kuličky vyplňují významnou část objemu extrakční cely, je možné, že ovlivňují výtěžnost např. změnou proudění extrakčního média v extrakční cele, a tedy i mírou kontaktu extrakčního média se vzorkem. Byly testovány skleněné kuličky o průměru 2, 3 a 5 mm. Použité podmínky extrakce jsou shrnuty v Tabulce 10.

**Tabulka 10:** Extrakční podmínky pro testování vlivu velikosti skleněných kuliček na výtěžnost extrakce

CO <sub>2</sub> (%)	10
H <sub>2</sub> O (%)	20
teplota (°C)	59
tlak (bar)	300
průtoková rychlost extrakčního média (ml/min)	3,0
průtoková rychlost CO <sub>2</sub> (ml/min)	0,3
průtoková rychlost kosolventu (ml/min)	2,7
čas extrakce (min)	30

**Tabulka 11:** Vliv velikosti skleněných kuliček na výtěžnost extrakce

	velikost skleněných kuliček		
	2 mm	3 mm	5 mm
1. extrakce (µg/g)	1791,34	1946,10	1078,90
2. extrakce (µg/g)	2142,86	1808,70	1130,39
průměr	1967,10	1877,40	1104,64
SD	175,76	68,70	25,75
RSD (%)	8,94	3,66	2,33

Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo při první extrakci s použitím 3 mm skleněných kuliček a při druhé extrakci s 2 mm kuličkami viz Tabulka 11. Nejvyšší průměrná výtěžnost byla dosažena s použitím 2 mm kuliček, avšak RSD obou opakovaní extrakcí činilo 8,94 %. Z toho důvodu bylo vyhodnoceno, že vhodnější pro použití budou skleněné kuličky s průměrem 3 mm, které vykazovaly RSD pouze 3,66 % a stále porovnatelně vysokou výtěžnost. Při použití 5 mm skleněných kuliček byla výtěžnost extrakce výrazně snížena, až o 41,16 % oproti 3 mm kuličkám.

## 5.5 Ověření opakovatelnosti optimalizované metody

Ve čtvrtém kroku byla testována opakovatelnost již optimalizovaných extrakčních podmínek, viz Tabulka 12. Tři po sobě jdoucí dny byly každý den provedeny 3 extrakce.

**Tabulka 12:** Souhrn optimalizovaných podmínek extrakce

CO <sub>2</sub> (%)	10
H <sub>2</sub> O (%)	20
teplota (°C)	59
tlak (bar)	300
průtoková rychlost extrakčního média (ml/min)	3,0
průtoková rychlost CO <sub>2</sub> (ml/min)	0,3
průtoková rychlost kosolventu (ml/min)	2,7
čas extrakce (min)	30
velikost skleněných kuliček (mm)	3

**Tabulka 13:** Výtěžnosti, průměry, SD a RSD při hodnocení opakovatelnosti

opakování	výtěžnost (µg/g)			průměr	SD	RSD (%)
	1.	2.	3.			
den 1	989,54	981,55	889,15	953,41	45,56	4,78
den 2	953,26	1133,25	879,12	988,55	106,71	10,79
den 3	1218,65	589,21	888,44	1053,55	165,10	15,67
průměr				998,50	105,79	10,41

Tabulka 13 vyobrazuje výsledky testování opakovatelnosti. Byla zjištěna průměrná opakovatelnost, která byla vypočítána z denních opakovatelností a činí 10,41 %. Metoda je podle průměrné opakovatelnosti opakovatelná. Třetí den měření se vyskytly problémy se stabilitou tlaku v SFE systému, což se významně projevilo ve druhé extrakci, a proto byla tato extrakce vynechána při stanovení průměrné výtěžnosti, SD a RSD třetího dne.

**Tabulka 14:** Celkové mezidenní výsledky

průměr	SD	RSD (%)
991,62	115,64	11,66

Celková mezidenní opakovatelnost (přesnost) byla vypočítána ze všech extrakcí s výjimkou druhé extrakce třetího dne, kvůli její odlehle hodnotě a její výsledek společně s celkovým

mezidenním průměrem a SD jsou uvedeny v Tabulce 14. Celková mezidenní opakovatelnost činí 11,66 % a metoda je tedy opakovatelná.

## 6 Závěr

Tato práce se zabývala optimalizací extrakce fenolických látek z jablečných křížal s využitím oxidu uhličitého. V extraktech byla monitorována výtěžnost 14 analytů – kyselina gallová, kyselina chlorogenová, epikatechin, katechin, kyselina kávová, rutin, kvercetin, floridzin, kvercitrin, floretin, guaiaverin, hirsutrin, hyperosid a reynoutrin. V extraktech bylo kromě floretinu kvantifikováno všech 13 zbývajících analytů. Na základě kvantitativního zastoupení byla optimalizace extrakční metody provedena pro šest nejkoncentrovanějších analytů – kyselinu chlorogenovou, epikatechin, katechin, floridzin, kvercitrin a guaiaverin.

Prvním krokem optimalizace byly získány informace o významu a vlivu jednotlivých faktorů na výtěžnost extrakce analytů. Obsah CO<sub>2</sub> v extrakčním médiu byl určen jako nejvýznamnější faktor na výtěžnost extrakce a s jeho snižující se obsahem docházelo ke zvýšení výtěžnosti extrakce polárních fenolických látek. Obsah H<sub>2</sub>O v ethanolicím kosolventu a tlak byly společně vyhodnoceny jako druhé nejvýznamnější faktory, faktor teploty ovlivňoval výtěžnost nejméně. Pomocí softwaru MODDE byly výsledky výtěžností extrakce pro jednotlivé experimenty zpracovány a funkce optimizer umožnila vygenerování extrakčních podmínek pro maximalizování výtěžnosti extrakce vybraných analytů. Optimální podmínky – 10 % CO<sub>2</sub> v extrakčním médiu, 20 % H<sub>2</sub>O v kosolventu, tlak 300 bar a teplota 59 °C. Použitím vysoké koncentrace kosolventu nebylo dosahováno superkritického, ale subkritického stavu extrakčního média.

Optimální podmínky z prvního kroku byly použity pro určení vlivu průtokové rychlosti extrakčního média a času extrakce. Nejvyšší výtěžnost byla sledována při průtokové rychlosti 3 ml/min a v čase 30 min (spotřeba 90 ml extrakčního média), při delším průběhu extrakce již výtěžnost významně nenarůstala.

Podobný vliv na výtěžnost extrakce byl pozorován u 2 a 3 mm skleněných kuliček. Jako neoptimálnější však byly vybrány 3 mm skleněné kuličky, které dosahovaly stále vysokou výtěžnost a výbornou opakovatelnost extrakce s RSD 3,66 %.

V posledním kroku byla ověřena opakovatelnost metody, která byla charakterizována celkovou mezidenní přesností s RSD 11,66 %. Podle relativní směrodatné odchylky je možné říci, že je optimalizovaná metoda opakovatelná.

Byla vyvinuta a optimalizována extrakční metoda s využitím CO<sub>2</sub> pro extrakci kyseliny chlorogenové, epikatechinu, katechinu, floridzinu, kvercitrinu a guaiaverinu z jablečných křížal. Optimální podmínky extrakce fenolických látek jsou následovné: 10% obsah CO<sub>2</sub> v extrakčním médiu, 20% obsah H<sub>2</sub>O v ethanolickém kosolventu, tlak 300 bar, teplota 59 °C, průtoková rychlost 3 ml/min, čas extrakce 30 min (spotřeba 90 ml extrakčního média) a velikost skleněných kuliček 3 mm. Metoda je vhodná pro šetrnou extrakci bioaktivních látek s antioxidačním účinkem.

## 7 Seznam použité literatury

[1] <https://www.ctpz.cz/vyzkum/vyskyt-fenolických-latek-v-ovoci-863>

Přístup získán 4.6.2021

[2] Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 14(6), 2202–2211. <https://doi.org/10.3390/molecules14062202>

[3] Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chen, C.-Y. O., & Lima, G. P. P. (2017). Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. In M. Soto-Hernandez, M. Palma-Tenango, & M. del Rosario Garcia-Mateos (Eds.), *Phenolic Compounds*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/66368>

[4] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Přístup získán 22.5.2021

[5] Willems, J. L., Khamis, M. M., Mohammed Saeid, W., Purves, R. W., Katselis, G., Low, N. H., & El-Aneed, A. (2016). Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 933, 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.041>

[6] <https://www.caymanchem.com/product/25054/5-caffeoylquinic-acid>

Přístup získán 4.6.2021

[7] Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., & Hu, Y. (2013). Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 801457. <https://doi.org/10.1155/2013/801457>

[8] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e1753?lang=en&region=CZ>

Přístup získán 4.6.2021

[9] Shay, J., Elbaz, H. A., Lee, I., Zielske, S. P., Malek, M. H., & Hüttemann, M. (2015). Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (–)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 181260. <https://doi.org/10.1155/2015/181260>

[10] [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/43412?lang=en&region=CZ&cm\\_sp=Insite--caContent\\_prodMerch\\_gruCrossEntropy--prodMerch10-2](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/43412?lang=en&region=CZ&cm_sp=Insite--caContent_prodMerch_gruCrossEntropy--prodMerch10-2)

Přístup získán 4.6.2021

[11] Coșarcă, S., Tanase, C., & Muntean, D. L. (2019). Therapeutic Aspects of Catechin and Its Derivatives – An Update. *Acta Biologica Marisiensis*, 2(1), 21–29. <https://doi.org/doi:10.2478/abmj-2019-0003>

[12] [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/phl80513?lang=en&region=CZ&cm\\_sp=Insite--caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_phloridzin\\*-srpRecs3-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/phl80513?lang=en&region=CZ&cm_sp=Insite--caSrpResults_srpRecs_srpModel_phloridzin*-srpRecs3-1)

Přístup získán 4.6.2021

[13] Zhang, T., Wei, X., Miao, Z., Hassan, H., Song, Y., & Fan, M. (2016). Screening for antioxidant and antibacterial activities of phenolics from Golden Delicious apple pomace. *Chemistry Central Journal*, 10(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13065-016-0195-7>

[14] Najafian, M., Jahromi, M. Z., Nowroznejhad, M. J., Khajeaian, P., Kargar, M. M., Sadeghi, M., & Arasteh, A. (2012). Phloridzin reduces blood glucose levels and improves lipids metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecular Biology Reports*, 39(5), 5299–5306. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1328-7>

[15] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/quercitrin4483852212311?lang=en&region=CZ>

Přístup získán 4.6.2021

[16] Babujanarthanam, R., Kavitha, P., Mahadeva Rao, U. S., & Pandian, M. R. (2011). Quercitrin a bioflavonoid improves the antioxidant status in streptozotocin: induced diabetic rat tissues. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 358(1), 121. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0927-x>

[17] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/75759?lang=en&region=CZ>

Přístup získán 4.6.2021

[18] Prabu, G. R., Gnanamani, A., & Sadulla, S. (2006). Guaijaverin – a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Microbiology*, 101(2), 487–495. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02912.x>

[19] Hirondart, M., Rombaut, N., Fabiano-Tixier, A. S., Bily, A., & Chemat, F. (2020). Comparison between Pressurized Liquid Extraction and Conventional Soxhlet Extraction for Rosemary Antioxidants, Yield, Composition, and Environmental Footprint. *Foods*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/foods9050584>

[20] Bimakr, M., Ganjloo, A., Zarringhalami, S., & Ansarian, E. (2017). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Malva sylvestris* leaves and its comparison with agitated bed extraction technique. *Food Science and Biotechnology*, 26(6), 1481–1490. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0229-5>

[21] Alvarez-Rivera, G., Bueno, M., Ballesteros-Vivas, D., Mendiola, J. A., & Ibañez, E. (2020). Chapter 13 - Pressurized Liquid Extraction. In C. F. Poole (Ed.), *Liquid-Phase Extraction* (pp. 375–398). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00013-X>

[https://www.researchgate.net/publication/338303891\\_Pressurized\\_Liquid\\_Extraction](https://www.researchgate.net/publication/338303891_Pressurized_Liquid_Extraction)

Přístup získán 18.8.2021

[22] Destandau, E., Michel, T., & Elfakir, C. (2013). Microwave-Assisted Extraction. In *RSC Green Chemistry* (pp. 113–156). <https://doi.org/10.1039/9781849737579-00113>

[https://www.researchgate.net/publication/240659833\\_Microwave-Assisted\\_Extraction](https://www.researchgate.net/publication/240659833_Microwave-Assisted_Extraction)

Přístup získán 18.8.2021

[23] Deng, J., Xu, Z., Xiang, C., Liu, J., Zhou, L., Li, T., Yang, Z., & Ding, C. (2017). Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.023>

[24] Zhao, C.-N., Zhang, J.-J., Li, Y., Meng, X., & Li, H.-B. (2018). Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Melastoma sanguineum* Fruit: Optimization and Identification. *Molecules*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/molecules23102498>

[25] Machado, A. P. D. F., Pasquel-Reátegui, J. L., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2015). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a

comparison with conventional methods. *Food Research International*, 77, 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.042>

[26] Ghafoor, K., Al-Juhaimi, F. Y., & Choi, Y. H. (2012). Supercritical fluid extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape (*Vitis labrusca* B.) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 67(4), 407–414. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0313-1>

[27] [https://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty/files/23/23-extrakce\\_silic\\_kminu\\_pomoci\\_superkriticke\\_fluidni\\_extrakce\\_\(sfe\).pdf](https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty/files/23/23-extrakce_silic_kminu_pomoci_superkriticke_fluidni_extrakce_(sfe).pdf)

Přístup získán 19.5.2021

[28] Wrona, O., Rafińska, K., Możeński, C., & Buszewski, B. (2019). Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 100(6), 1624–1635. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0232>

[29] <https://www.supercriticalfluids.com/why-and-how-are-co-solvents-sometimes-used-in-sfe-processes/>

Přístup získán 19.5.2021

[30] <https://iojomio.wordpress.com/2013/03/12/how-carbon-transport-works/>

Přístup získán 13.6.2021

[31] <https://thermopedia.com/>

Přístup získán 24.5.2021

[32] <https://www.av-equen.cz/znalosti/ethanol/>

Přístup získán 19.5.2021

[33] [https://is.muni.cz/el/1431/jaro2014/C3806/Metanol\\_WIKI\\_CZ.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2014/C3806/Metanol_WIKI_CZ.pdf)

Přístup získán 19.5.2021

[34] Falcão, M. A., Scopel, R., Almeida, R. N., do Espírito Santo, A. T., Franceschini, G., Garcez, J. J., Vargas, R. M. F., & Cassel, E. (2017). Supercritical fluid extraction of vinblastine from *Catharanthus roseus*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 129, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.018>

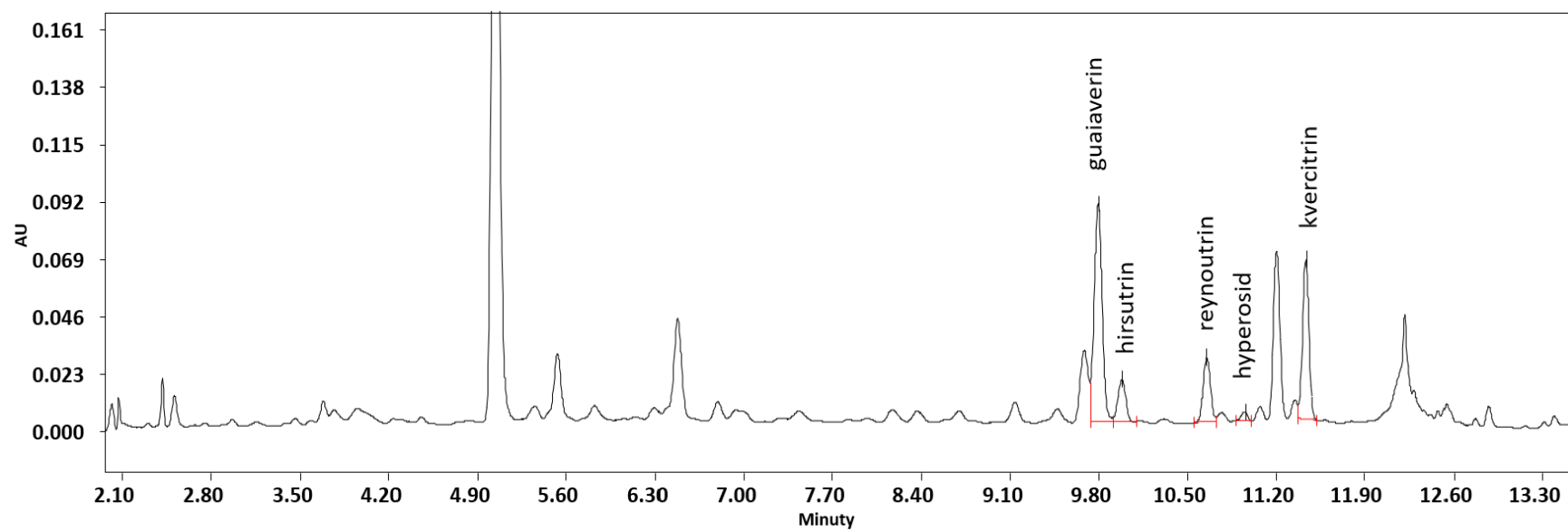
[35] Gallo-Molina, A. C., Castro-Vargas, H. I., Garzón-Méndez, W. F., Martínez Ramírez, J. A., Rivera Monroy, Z. J., King, J. W., & Parada-Alfonso, F. (2019). Extraction, isolation and purification of tetrahydrocannabinol from the *Cannabis sativa* L. plant using supercritical fluid extraction and solid phase extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 146, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.01.020>

[36] Ellington, E., Bastida, J., Viladomat, F., & Codina, C. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of colchicine and related alkaloids from seeds of *Colchicum autumnale* L. *Phytochemical Analysis*, 14(3), 164–169. <https://doi.org/10.1002/pca.702>

[37] Martínez-Correa, H. A., Bitencourt, R. G., Kayano, A. C. A. V., Magalhães, P. M., Costa, F. T. M., & Cabral, F. A. (2017). Integrated extraction process to obtain bioactive extracts of *Artemisia annua* L. leaves using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water. *Industrial Crops and Products*, 95, 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.007>

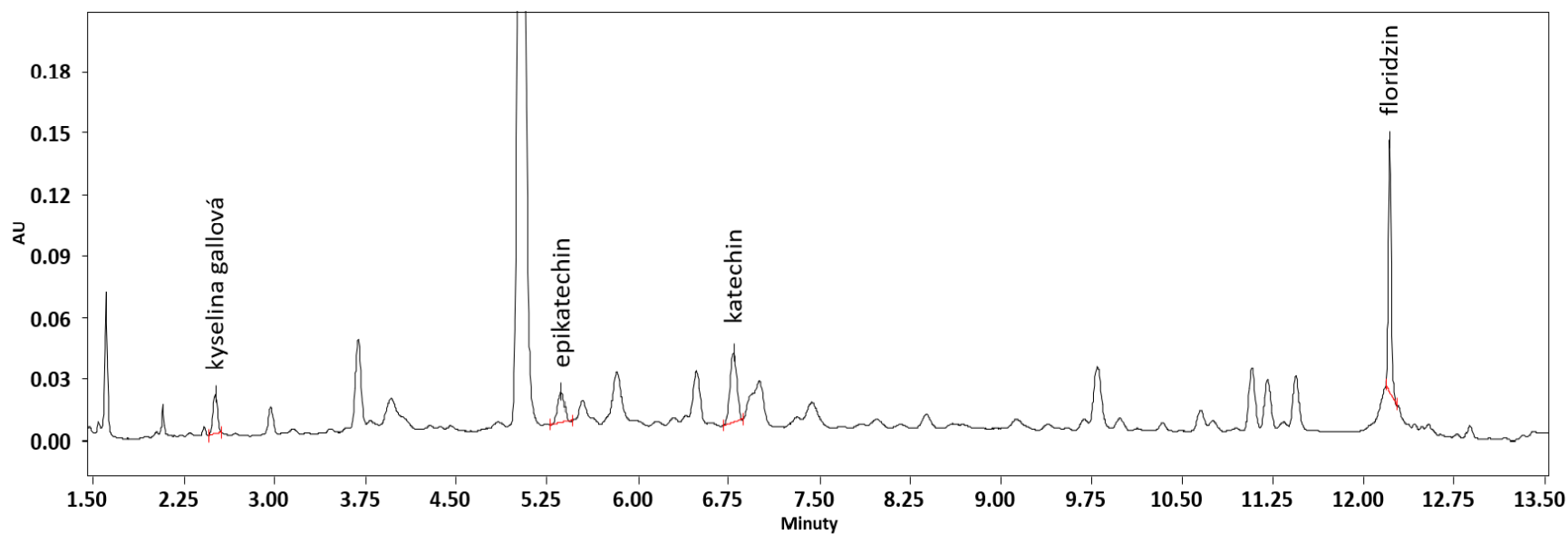
- [38] Tita, G. J., Navarrete, A., Martín, Á., & Cocero, M. J. (2021). Model assisted supercritical fluid extraction and fractionation of added-value products from tobacco scrap. *The Journal of Supercritical Fluids*, 167, 105046. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105046>
- [39] Da Porto, C., Decorti, D., & Kikic, I. (2009). Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*, 112(4), 1072–1078. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.015>

## 8 Přílohy



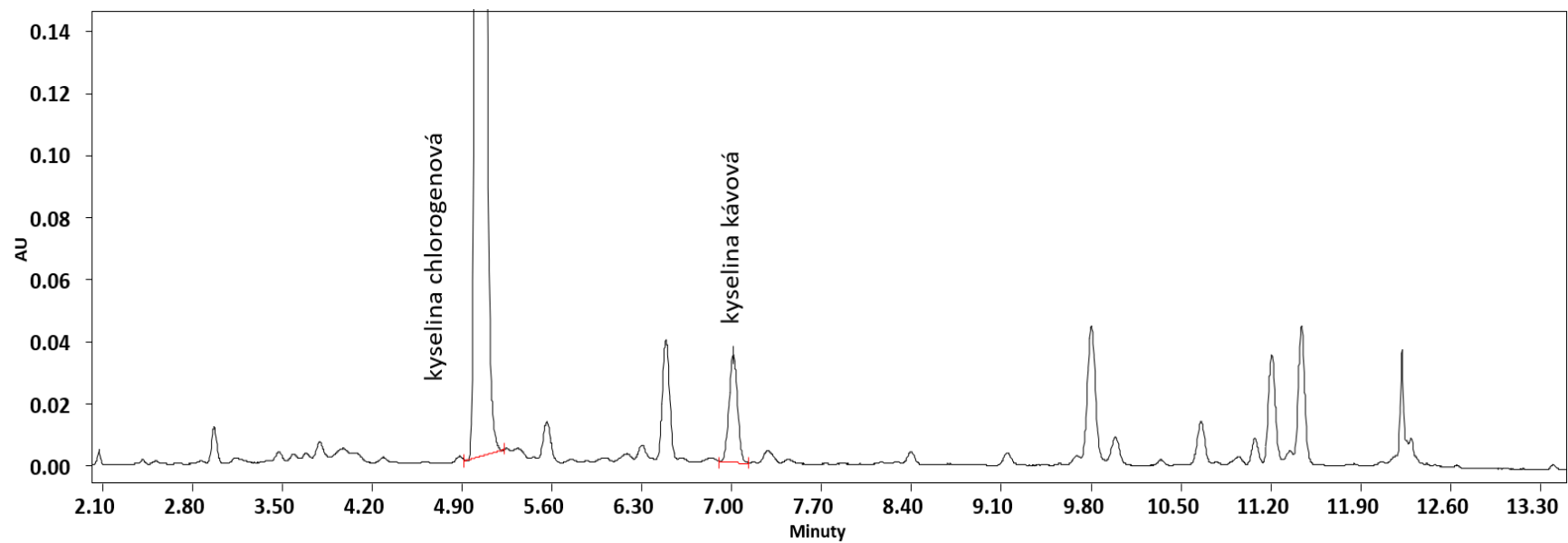
Název extrakce: PB N4 , detektor PDA – vlnová délka 254 nm

**Obrázek 14:** Chromatogram extrakce N4–254 nm



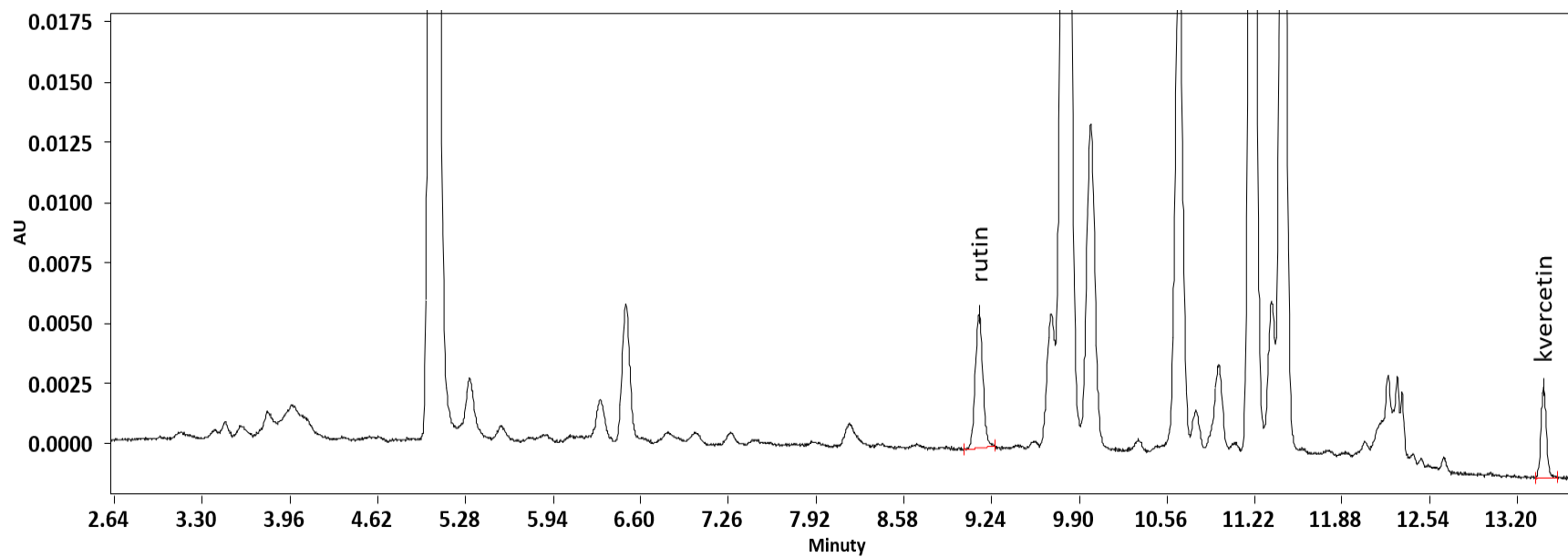
Název extrakce: PB N4 , detektor PDA – vlnová délka 280 nm

**Obrázek 15:** Chromatogram extrakce N4–280 nm



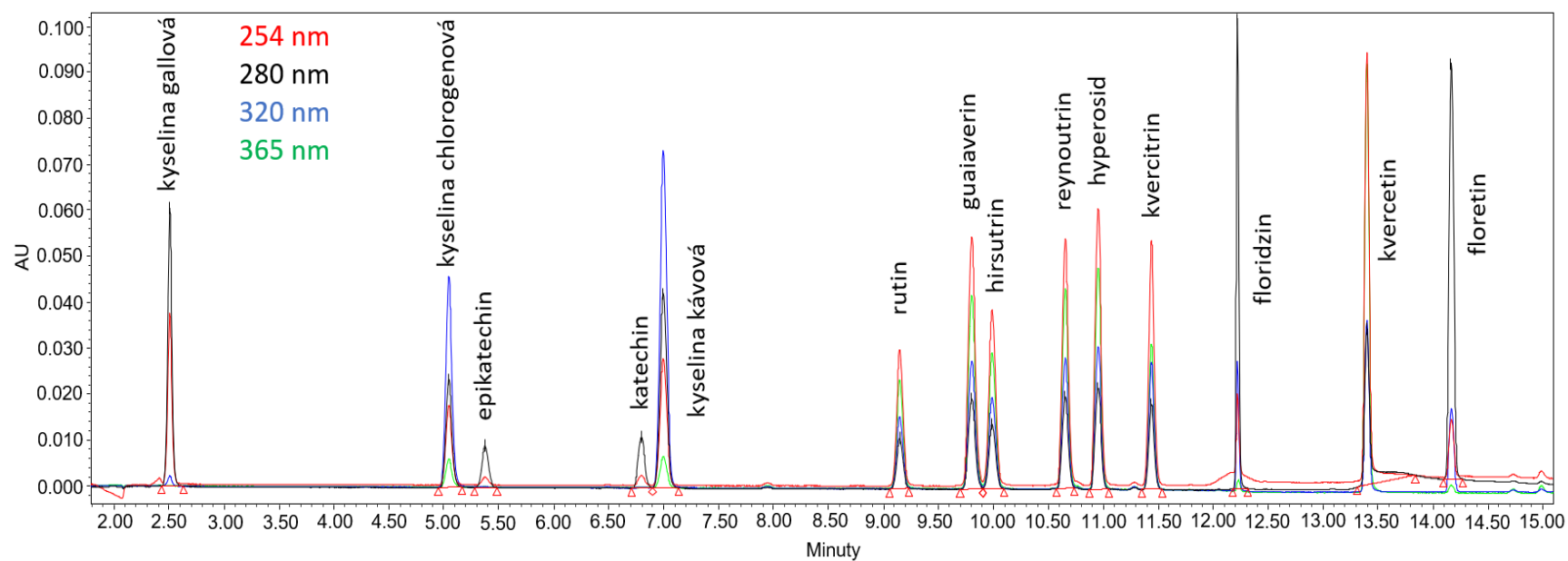
Název extrakce: PB N4 , detektor PDA – vlnová délka 320 nm

**Obrázek 16:** Chromatogram extrakce N4 – 320 nm



Název extrakce: PB N4 , detektor PDA – vlnová délka 365 nm

**Obrázek 17:** Chromatogram extrakce N4 – 365 nm



**Obrázek 18:** Chromatogram analýzy směšného standardu, překryv sledovaných vlnových délek

**Tabulka 15:** Podmínky extrakcí a získané koncentrace jednotlivých fenolických látek

číslo	pořadí experimentu	obsah CO <sub>2</sub> v extrakčním médiu (%)	obsah H <sub>2</sub> O v kosolventu (%)	teplota (°C)	tlak (bar)	G (μg/g)	CH (μg/g)	EPI (μg/g)	CAT (μg/g)	CAF (μg/g)	RUT (μg/g)	QE (μg/g)	FDZ (μg/g)	QI (μg/g)	FLT (μg/g)	GUA (μg/g)	Q3BG (μg/g)	HYP (μg/g)	REY (μg/g)
N1	8	90	0	30	300	0,13	9,87	1,18	1,55	0,46	0,00	0,30	1,38	2,25	0,00	1,01	0,25	0,15	0,41
N2	17	90	20	30	100	0,37	5,30	1,38	0,70	0,46	0,00	0,20	0,99	1,08	0,00	0,36	0,07	0,11	0,13
N3	20	90	20	80	100	0,02	2,95	0,19	0,31	0,07	0,02	0,01	0,18	0,11	0,00	0,13	0,05	0,01	0,05
N4	7	10	20	80	300	12,47	929,12	59,89	125,44	19,46	9,10	1,57	51,18	48,95	0,00	66,88	18,44	2,72	19,01
N5	4	90	0	80	300	0,49	18,76	2,54	1,73	1,22	0,00	0,42	1,54	3,24	0,00	1,31	0,28	0,24	0,64
N6	1	10	20	30	300	1,16	637,83	50,60	104,83	13,76	6,67	1,43	37,72	40,19	0,00	50,51	14,17	1,86	16,03
N7	13	10	0	80	100	0,87	562,39	46,24	87,56	12,79	6,55	1,15	26,76	33,88	0,00	41,77	12,25	1,50	12,64
N8	11	10	0	30	100	0,77	181,37	13,44	24,36	4,19	3,64	0,56	10,60	16,04	0,00	16,57	5,00	0,57	4,88
N9	19	50	10	55	200	0,48	671,13	54,39	99,16	16,62	5,30	1,22	32,05	35,62	0,00	37,69	11,76	1,78	12,71
N10	10	50	10	55	200	4,54	463,93	42,37	75,69	12,57	4,23	1,27	29,11	34,68	0,00	34,61	10,51	1,77	11,85
N11	16	50	10	55	200	0,99	513,78	42,25	74,59	13,90	3,40	1,04	22,89	28,65	0,00	27,96	8,61	1,11	9,58
N12	22	90	0	30	300	0,27	16,07	3,27	2,84	1,49	0,00	0,42	2,70	3,44	0,00	1,28	0,33	0,18	0,73
N13	18	90	20	30	100	0,18	3,01	0,77	0,24	0,32	0,00	0,15	0,52	1,08	0,00	0,19	0,05	0,08	0,08
N14	2	90	20	80	100	0,69	3,70	0,68	0,36	0,23	0,00	0,07	0,35	0,53	0,00	0,23	0,05	0,08	0,07
N15	14	10	20	80	300	1,22	900,53	63,60	124,50	19,18	9,13	1,51	43,08	49,02	0,00	60,12	16,92	2,19	18,48
N16	6	90	0	80	300	0,33	14,31	2,24	1,04	1,07	0,00	0,33	1,04	2,27	0,00	0,80	0,17	0,21	0,36
N17	21	10	20	30	300	0,36	873,39	63,56	123,45	18,25	6,95	1,47	41,04	42,77	0,00	54,83	15,33	2,10	17,11
N18	5	10	0	80	100	0,31	534,84	45,14	85,25	12,40	6,39	1,27	27,88	35,26	0,00	41,61	12,36	1,54	12,72
N19	12	10	0	30	100	0,14	226,85	19,63	37,12	5,59	4,01	0,83	15,27	24,08	0,00	26,34	7,14	0,96	8,19
N20	15	50	10	55	200	0,90	607,15	52,03	97,34	14,57	5,79	1,34	31,02	38,79	0,00	42,48	12,67	1,83	13,70
N21	9	50	10	55	200	3,75	160,86	15,45	27,89	4,04	2,00	0,53	9,51	13,59	0,00	14,39	4,35	0,63	4,65
N22	3	50	10	55	200	1,91	631,82	54,92	98,95	15,76	5,61	1,35	31,09	37,44	0,00	41,01	12,49	2,04	13,52