UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Diplomová práce

VÝVOJ SUPERKRITICKÉ FLUIDNÍ EXTRAKCE PRO IZOLACI BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Veronika Pilařová, Ph.D.
Vedoucí katedry: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2020 **Lukáš Kuda**

FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ
Univerzita Karlova

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Lukáš Kuda

Školitel: PharmDr. Veronika Pilařová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj superkritické fluidní extrakce pro izolaci biologicky aktivních látek

Cílem práce bylo optimalizovat metodu superkritické fluidní extrakce pro získání kvercetinu, flavonoidu s antioxidační aktivitou, ze sušeného a drceného plodu kdouloně obecné (*Cydonia oblonga* Mill.).

Superkritická fluidní extrakce je metoda, při které je využívána nadkritická tekutina pro extrakci požadovaných sloučenin. Nejčastějším rozpouštědlem je čistý CO_2, který je na základě svých fyzikálně chemických vlastností vhodným extrakčním činidlem pro extrakci nepolárních látek. V případě extrakcí polárních sloučenin se k nadkritické tekutině přidávají organická rozpouštědla jako ethanol, methanol či isopropanol. V závislosti na množství přidaného organického rozpouštědla můžeme definovat tradiční SFE, extrakci pomocí tekutiny obohacené o CO_2 a extrakci pomocí kapalin za zvýšeného tlaku. Teplota a tlak patří mezi další klíčové parametry ovlivňující výtěžnost extrakce a je potřeba je pečlivě optimalizovat.

Optimalizace metody pro extrakci kvercetinu probíhala v několika na sebe navazujících krocích. Nejprve byly jednotlivé parametry testovány podle Plackett-Burman design experimentu, kdy se testoval ethanol s přídavkem 0–20 % vody přidaný do CO_2 v rozmezí 10–90 %, teplota v rozmezí 30–80 °C a tlak v rozmezí 100–300 barů. Dalším krokem byl plně faktoriální design experimentu zaměřující se i na jednotlivé interakce mezi jednotlivými parametry. Po jeho vyhodnocení byly ověřeny zoptimalizované podmínky. Kinetika extrakce byla testována pro průtokové rychlosti 2, 3, 4, 5 mL/min. Pro vybrané finální podmínky extrakce: doba extrakce – 30 min, průtoková rychlost – 3 mL/min, teplota – 66 °C, tlak – 223 bar, rozpouštědlo pro extrakci – CO_2/ethanol + 10 % H_2O (10/90, v/v) byla ověřena opakovatelnost metody (147,8 ng/0,5 g vzorku, RSD 20,82 %). Metoda byla použita pro extrakci rostlinných vzorků z Jižní Afriky s obsahem kvercetinu.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Lukáš Kuda

Supervisor: PharmDr. Veronika Pilařová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: The Development of Supercritical Fluid Extraction for Isolation of Biologically Active Compounds

The main aim of this study was to optimize the method for extraction of quercetin – flavonoid with antioxidant activity – from dried crushed quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.) using supercritical fluid extraction (SFE).

The supercritical fluid extraction is a method in which supercritical fluid is used to extract active compounds. Neat CO_2 is the most common used solvent. Due to its physicochemical properties, it is suitable solvent for the extraction of non-polar compounds. While extraction of polar compounds id required, the organic solvents such as ethanol, methanol or isopropanol are added to the supercritical fluid. Depending on the amount of added organic solvent, SFE, SFE with modifier, CO_2 expanded liquid extraction and pressurized liquid extraction are distinguished. Temperature and pressure are other key parameters affecting extraction and need to be optimized as well. The optimization of the quercetin extraction method was carried out in several following steps. First, the key parameters were tested using simple Plackett-Burman design of experiments where ethanol with 0–20 % water was chosen as green organic solvent added to CO_2 in ratio 10–90 %. The temperature was tested in the range of 30–80 °C and pressure in the range of 100–300 bar. The following step was a fully factorial design of experiments which is also focused on individual interactions between tested parameters. After its evaluation, optimized conditions were verified by several extractions. The kinetics of the extraction was tested for the flow rates 2, 3, 4, 5 mL/min. The repeatability of method (147.8 ng / 0.5 g sample, RSD 20.82 %) was verified for final conditions: the extraction time – 30 min, flow rate – 3 mL/min, temperature – 66 °C, pressure – 223 bar, extraction solvent – CO_2/ethanol + 10% H_2O (10/90, v/v). This

method was used for the extraction of other South African plants that might contain quercetin just as quince.

„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.“

V Hradci Králové dne 9. 5. 2020 .....

Lukáš Kuda

Mé poděkování patří zejména PharmDr. Veronice Pilařové Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup, poskytnutí cenných rad při experimentální práci a následně při zpracování výsledků. Děkuji také Mgr. Ondřeji Jungovi za konzultace při statistickém hodnocení. Za možnost spolupráce a dodání vzorků děkuji Dr. Karlu Doležalovi z Katedry biochemie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a prof. Johannesu van Stadenovi z Výzkumného centra pro růst rostlin Univerzity of KwaZulu-Natal Pietermaritzburg v Jihoafrické republice.

Obsah

Seznam použitých zkratek 8
1 Úvod 10
2 Cíl práce 11
3 Teoretická část 12
3.1 Kdouloň obecná 12
3.2 Kvercetin 14
3.3 Superkritická fluidní extrakce (SFE) 16
3.4 Nadkritická tekutina 16
3.4.1 Instrumentace SFE a proces extrakce 19
3.4.2 Optimalizace metody, podmínky ovlivňující extrakci 20
3.4.3 Podmínky extrakce kvercetinu z rostlinného materiálu pomocí SFE 23
4 Experimentální část 26
4.1 Použité chemikálie 26
4.2 Přístrojové vybavení a pomůcky 26
4.3 Příprava roztoků 27
4.3.1 Příprava zásobních roztoků 27
4.3.2 Příprava pracovních roztoků 27
4.3.3 Příprava roztoků pro ředění standardů a odpařených extraktů 27
4.3.4 Příprava roztoků pro extrakci 27
4.3.5 Příprava mobilní fáze 28
4.4 Optimalizace SFE 28
4.4.1 Příprava vzorků pro extrakci 28
4.4.2 Vývoj metody 29
4.4.3 Úprava získaného extraktu 29
4.5 UHPLC-MS/MS analýza 30
4.6 Parametry hodnocení 30
4.6.1 Výpočet koncentrace vzorků 30
4.6.2 Kvantifikace pomocí metody kalibrační přímky 31
4.6.3 MODDE software 31
4.6.4 Směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka 34
5 Výsledky 35
5.1 Optimalizace základních parametrů 35

5.1.1 Plackett-Burman design model 35
5.1.2 Plně faktoriální design experimentů (full factorial design) 38
5.1.3 Ověření zoptimalizovaných podmínek 40
5.2 Kinetika extrakce 43
5.3 Finální optimalizace 46
5.3.1 Vliv velikosti kuliček v extrakční cele na výtěžnost extrakce 46
5.3.2 Finální podmínky a opakovatelnost extrakce 47
5.4 Aplikace metody na rostlinné vzorky s obsahem kvercetinu 48
6 Závěr 55
7 Seznam použité literatury 56
8 Přílohy 60
8.1 Seznam tabulek 60
8.2 Seznam obrázků 60
8.3 SFC 2019, Philadelphia, USA 62
8.4 SFC 2019, Philadelphia, USA, sekce plakátových sdělení 64
8.5 10. postgraduální a 8. postdoktorandská konference 2020, FaF UK, HK 65

Seznam použitých zkratek

A	plocha píku
BEH	hybridní ethylenový můstek
BPR	regulátor zpětného tlaku
c	koncentrace
CO_2	oxid uhličitý
CXL	tekutina obohacená oxidem uhličitým
CXLE	extrakce tekutinou obohacenou oxidem uhličitým
D	dynamický mód extrakce
DAD	detektor s diodovým polem
DoE	design experimentů
EtOH	ethanol
GC	plynová chromatografie
H_2O	voda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MS	hmotnostní spektrometrie
N	počet měření
N/A	nedetekováno
NO·	volné radikály oxidu dusnatého
$\cdot O_2^-$	superoxid
·OH	hydroxylový radikál
$ONOO^-$	peroxynitrit
PDA	detektor s fotodiodovým polem
p_k	kritický tlak
PL	kapalina za zvýšeného tlaku
PLE	extrakce pomocí kapalin za zvýšeného tlaku
QCE	kvercetin

r^2	korelační koeficient
ROS	reaktivní formy kyslíku
RNS	reaktivní formy dusíku
RP	reverzní stacionární fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka
S	statický mód extrakce
sCO_2	nadkritický oxid uhličitý
SD	směrodatná odchylka
SF	nadkritická tekutina
SFE	superkritická fluidní extrakce
S/N	signál/šum
SRM	monitorování vybrané reakce
T_k	kritická teplota
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti
V	objem
x_i	naměřené hodnoty
$\bar{x}$	aritmetický průměr naměřených hodnot

1 Úvod

Rostlinný materiál poskytuje bohatý zdroj účinných látek, které mohou mít kladný vliv na organismus člověka. Významnou skupinou přírodních účinných látek, které se v rostlinách nacházejí, jsou flavonoidy. Mezi jejich stěžejní vlastnosti, pro které jsou předmětem výzkumu a následného využití v medicíně, farmacii či nutraceutice, patří zejména vlastnosti antioxidační. Antioxidanty umožňují zbavovat organismus tzv. oxidačního stresu, který může být příčinou četných onemocnění. Mezi nejdiskutovanější flavonoidy s těmito vlastnostmi patří rutin a kvercetin, který je předmětem této práce.

Kvercetin je obsahovou látkou mnoha rostlin. Vyskytuje se např. v cibuli, jablcích, kůře grapefruitu, listech morušovníku či moringy, nati třezalky, zeleném čaji, rajčatech nebo kdouli. Řada účinných látek, kvercetin nevyjímaje, je z rostlinného materiálu extrahována. Jednou z metod extrakce je superkritická fluidní extrakce (SFE), metoda, která využívá jako extrakční rozpouštědlo nadkritickou tekutinu.

Doposud nebyly publikovány žádné vědecké články, které by se zabývaly SFE extrakcí kvercetinu z kdoule. Tato diplomová práce, prováděna ve spolupráci s výzkumným pracovištěm Katedry biochemie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a Výzkumného centra pro růst rostlin Univerzity of KwaZulu-Natal Pietermaritzburg v Jihoafrické republice, se zabývá zjištěním vhodných podmínek, za kterých lze extrahovat kvercetin z kdoule pomocí SFE.

2 Cíl práce

Hlavním cílem práce bylo optimalizovat podmínky extrakce kvercetinu z kdoule za použití metody superkritické fluidní extrakce s důrazem na výtěžnost a opakovatelnost metody. V prvním kroku optimalizace byl pozorován vliv jednotlivých parametrů, tj. tlaku, teploty, množství kosolventu a přídavku vody na výtěžnost extrakce. V druhém kroku byly tyto podmínky zkoumány v užším intervalu hodnot a byly také vyhodnoceny vzájemné interakce mezi testovanými parametry. Následně byla optimalizována doba extrakce a průtoková rychlost extrakčního rozpouštědla. Posledním krokem optimalizace bylo ověření vlivu průměru extrakčních kuliček přidávaných ke vzorku a vyplňujících objem extrakční cely. Byla ověřena opakovatelnost metody extrakcí vzorků v rámci několika dní.

Finální ověřená metoda byla použita k extrakci kvercetinu z kdoule a dalších rostlinných vzorků s obsahem kvercetinu. Extrakty byly zanalyzovány a kvantifikovány.

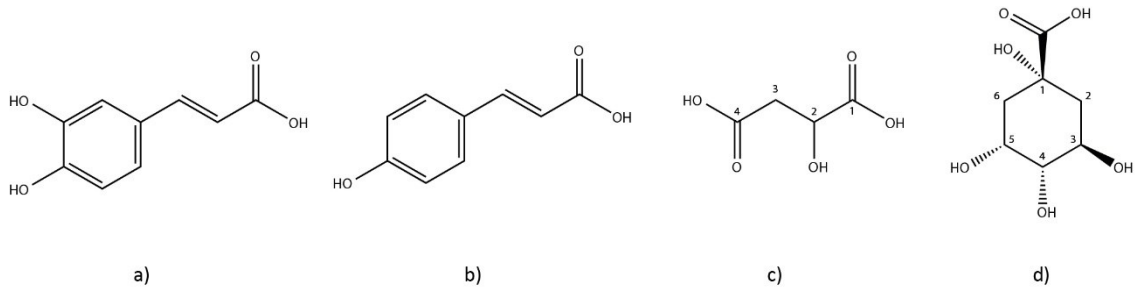
3 Teoretická část

3.1 Kdouloň obecná

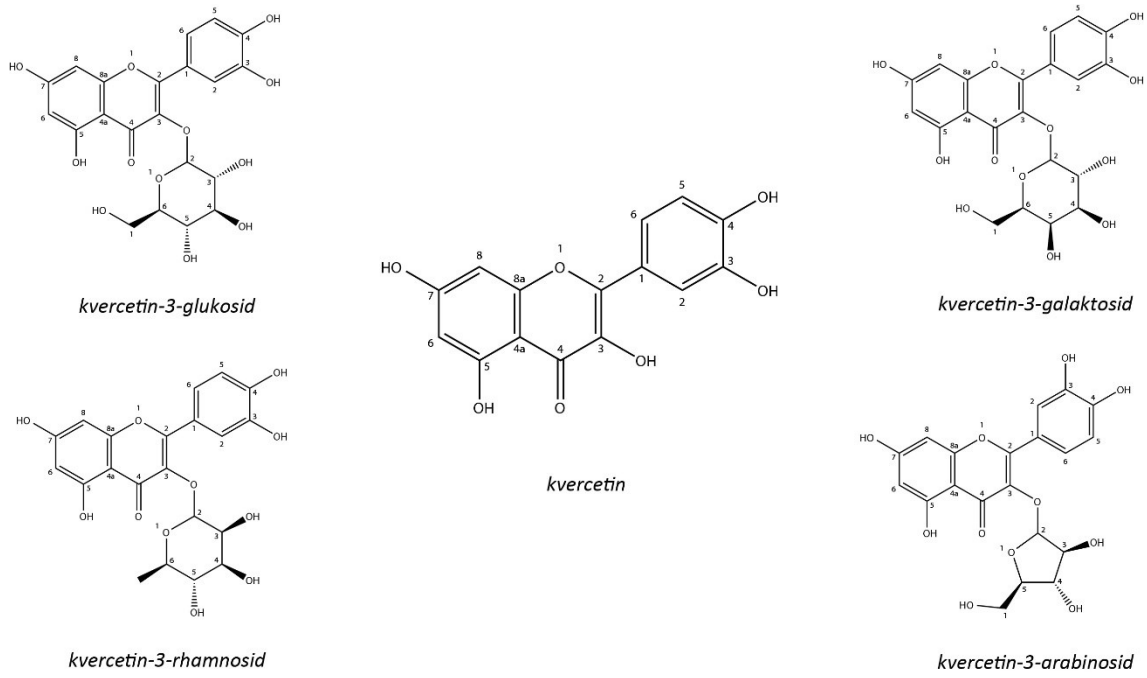
Kdouloň obecná (*Cydonia oblonga* Mill., čeleď *Rosaceae*, dříve *Malaceae*) je dřevina stromovitého či keřovitého charakteru, která původně pochází z Blízkého východu, dnes je běžně pěstovaná i u nás. Listy jsou různě veliké, podlouhle vejčité až eliptické. Pro květy je charakteristická bílá až narůžovělá barva, jsou pětičetné a podobně jako budoucí plod výrazně aromatické. Plodem je kdoule, mnohosemenná, plstnatá, zelenožlutá malvice. Dle tvaru plodu lze dělit kdouloň na dvě základní formy – jabloňovitou (*Cydonia oblonga Mill. subsp. maliformis*) a hruškovitou (*Cydonia oblonga Mill. subsp. pyriformis*). Jednotlivé odrůdy kdouloní se liší jak zmíněným tvarem plodů, tak dále povrchem plodů a zejména vzrůstem a mírou plodnosti. Díky tomu existuje mnoho kultivarů, které jsou obvykle charakteristické pro určitou zeměpisnou oblast. Příkladem mohou být odrůdy Morava, Šuranská, Bereckého, Triumph, Juranská, Vranja, Ironda, Mir a mnohé další [1] [2] [3].

Kdoule se zpravidla používá pro výrobu marmelád, kompotů, moštů či destilátů. Konzumace čerstvého plodu není běžná z důvodu jeho tvrdosti, trpké a výrazně kyselé chuti.

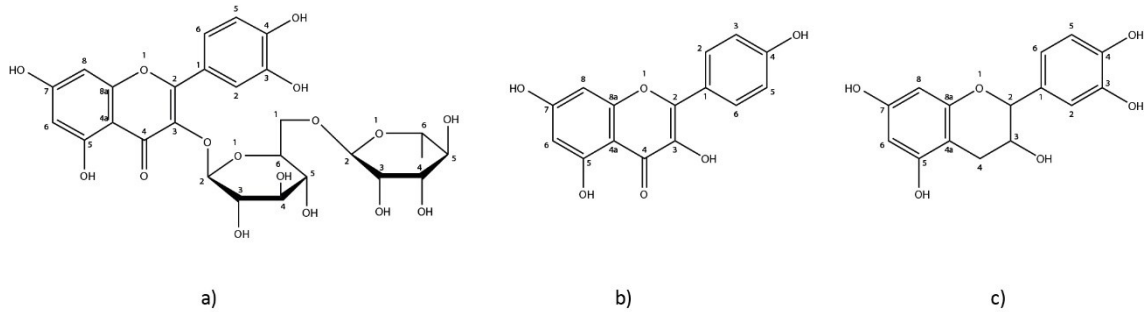
V nedávné době se kdoule stala předmětem četných farmakologických výzkumů, ve kterých bylo zjištěno, že konzumace tohoto ovoce vykazuje pozitivní vliv na lidský organismus. Jedná se o účinky antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivé, antiulcerózní či protinádorové. Nositeli těchto významných biologických účinků jsou sekundární metabolity *(obr. č. 1)* obsažené v kdouli. Mezi ně patří zejména deriváty organických kyselin (např. kyselina chinová, kyselina jablečná), fenolické sloučeniny (deriváty kyseliny kávové a kyseliny p-kumarové), či polyfenolické flavonoidy. Právě flavonoidy jsou významné antioxidanty, které snižují patologicky zvýšenou propustnost a lomivost kapilár a také mají antitrombotické, antihemoragické, protizánětlivé či hepato-protektivní účinky.



Obrázek 1: *a) kyselina kávová b) kyselina p-kumarová c) kyselina jablečná d) kyselina chinová*



Obrázek 2: *Kvercetin a jeho glykosidické formy*

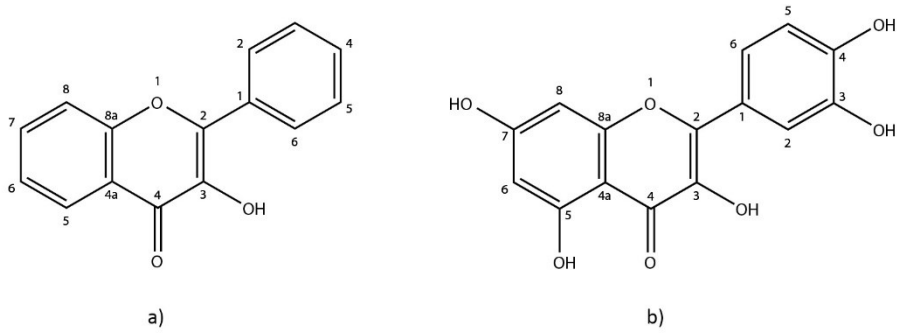


Obrázek 3: *a) rutin b) kempferol c) (+)-katechin, (-)-katechin*

V rostlinách, v plodu kdouloně nevyjímaje, jsou flavonoidy mnohdy přítomny ve formě glykosidů *(obr. č. 2),* kdy je necukerná složka (aglykon) vázaná glykosidickou vazbou nejčastěji přes kyslík z hydroxidu v poloze C-3 hlavního cyklu k cukerné složce. Ze skupiny flavonoidů můžeme nalézt v kdouli zejména flavonoly – volný kvercetin či jeho glykosidické formy jako např. kvercetin-3-*O*-glukosid, kvercetin-3-*O*-galaktosid, kvercetin-3-*O*-arabinosid, kvercetin-3-*O*-rhamnozid, kvercetin-3-*O*-rhamnoglukosid (neboli rutin) a kempferol znovu se svými různými glykosidickými formami. Dále se v plodu vyskytují ze skupiny flavonoidů optické izomery flavan-3-olu katechin a epikatechin *(obr. č. 3)* [4] [5] [6].

3.2 Kvercetin

Kvercetin patří do skupiny flavonoidů, konkrétně do strukturního podtypu flavonolů *(obr. č. 4)*. Flavonol je tvořen benzopyranovým (4H-chromenovým) jádrem, na který je vázán fenyl v poloze C-2, hydroxyskupina v poloze C-3 a ketonická oxo skupina v poloze C-4. Strukturním názvem se jedná o 3-hydroxy-2-fenyl-*4H*-chromen-4-on. Samotný kvercetin je navíc substituovaný čtyřmi dalšími hydroxyskupinami v polohách 3´, 4´, 5, 7. Strukturním názvem lze tento flavonoid pojmenovat jako 3,5,7-trihydroxy-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-*4H*-chromen-4-on).



Obrázek 4: *a) flavonol b) kvercetin*

Skupenstvím se jedná o pevnou žlutou látku ve formě jehliček nebo prášku, při rozpuštění výrazně hořké chuti. Bod tání je při teplotě 316,5 °C. Kvercetin je za laboratorních podmínek ve vodě velmi těžce rozpustný. Velmi dobře se naopak

rozpouští v organických rozpouštědlech jako je ether a methanol, popřípadě ethanol či aceton. Dle struktury lze odvodit, že se jedná o slabou kyselinu. Hodnoty pKa pro jednotlivé fenolické skupiny jsou 7,17; 8,26; 10,13; 12,30 a 13,11 [7].

Kvercetin se nachází v rostlinách a jejich plodech, běžně např. v cibuli, listovém salátu, jablcích, fazolích, borůvkách, rajčatech či zeleném čaji. Díky jeho nízké rozpustnosti v hydrofilním prostředí je výhodné, že často tvoří v rostlinném materiálu vazby s cukry za vzniku glykosidů a vazby s dalšími fenolickými sloučeninami. Vzniklé deriváty zvyšují rozpustnost kvercetinu a mají vliv na zlepšení jeho absorpce do organismu a zlepšení biologické dostupnosti. Pro lepší biologickou dostupnost kvercetinu mohou být využity také nosičové systémy jako polymerní nanočástice či micely, které zamezují jeho rozkladu např. v kyselém prostředí žaludku. Právě špatná rozpustnost ve vodném prostředí a náchylnost k degradaci jsou častými problémy, kterými je třeba se zabývat při podávání kvercetinu do lidského organismu.

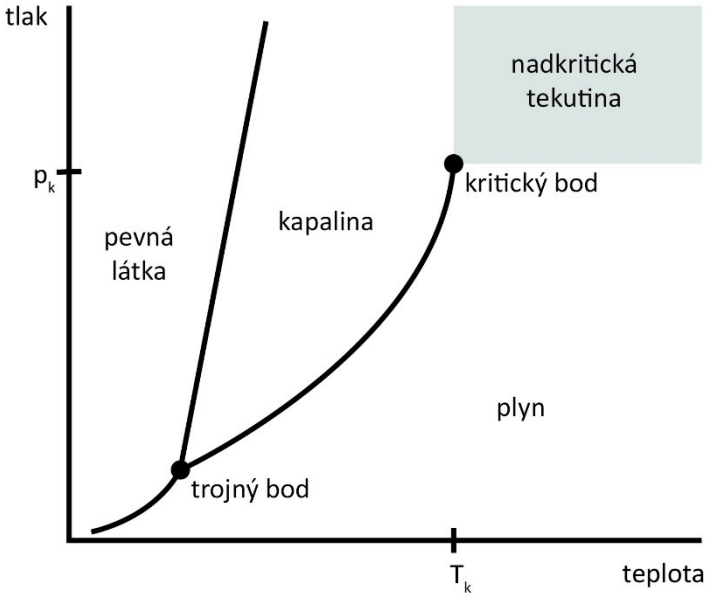
Kvercetin má řadu významných biologických vlastností, mezi které patří zejména vlastnosti antioxidační a protizánětlivé. Obecně patří mezi nejsilnější antioxidanty ze skupiny flavonoidů. Velmi dobře napomáhá k vyrovnávání buněčného redoxního potenciálu za účelem udržení homeostázy organismu. Mechanismus antioxidační aktivity kvercetinu spočívá ve struktuře molekuly, kdy jednotlivé fenolové skupiny a oxo skupina spolu s 2,3 dvojnou vazbou v benzopyranovém cyklu jsou donory elektronů pro reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). Donací elektronů dochází k přeměně ROS a RNS na látky organismu neškodlivé. Reaktivní formy kyslíku a dusíku jako jsou např. volné radikály superoxidu ($\cdot O_2^-$), hydroxylové radikály ($\cdot OH$), volné radikály oxidu dusnatého ($NO\cdot$) či peroxynitrit ($ONOO^-$) mohou způsobovat tzv. oxidační stres, který má škodlivý vliv na buňky a tkáně organismu. Proto je kvercetin shledáván jako látka potenciálně vhodná pro prevenci chronických onemocnění, jako jsou např. nemoci kardiovaskulárního charakteru, diabetes, Alzheimerova choroba, anémie či chronické obstrukční plicní nemoci. Zkoumána je také jeho protinádorová aktivita. Díky těmto vlastnostem je kvercetin často analyzovanou strukturou a nachází využití zejména v oborech lékařství či farmacii a s nimi úzce spojenou nutraceutikou [8] [9].

3.3 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Superkritická fluidní extrakce je proces, při kterém dochází k oddělení požadovaných látek od matrice za použití nadkritické tekutiny jako extrakčního rozpouštědla. SFE nabízí řadu výhod oproti konvenčním extrakčním metodám, mezi které patří například Soxhletova extrakce. Mezi hlavní výhody, které vyplývají z vlastností nadkritického rozpouštědla, patří vysoká účinnost extrakce, kratší doba extrakce, bezpečnost a šetrnost k životnímu prostředí (tzv. „zelená chemie“). Benefitem je také možnost spojení SFE s analytickými metodami jako je plynová chromatografie nebo superkritická fluidní chromatografie. Zpravidla se jako vzorek využívá pevná, dostatečně homogenizovaná a suchá matrice, ze které se mohou prostřednictvím této metody extrahovat zejména látky hydrofobního charakteru. Farmaceutický průmysl, chemický průmysl, kosmetika a potravinářství jsou hlavní odvětví, ve kterých SFE nachází své uplatnění. Konkrétně je poté nejčastějším využitím SFE extrakce účinných látek a olejů z rostlinných drog [10] [11].

3.4 Nadkritická tekutina

Nadkritická tekutina (SF) je taková tekutina, jejíž teplota a tlak dosáhly hodnoty vyšší, než je kritický bod *(obr. č. 5)*. Nad tímto bodem již látka neexistuje ve stavu kapalném ani plynném. Nadkritická tekutina má hustotu podobnou kapalinám a



Obrázek 5: *Fázový diagram tlak-teplota nadkritické tekutiny*

viskozitu podobnou plynům. Je tvořena jednou fází, kdy jsou její složky zcela mísitelné mezi sebou, je stlačitelná a má nulové povrchové napětí. Její nízká viskozita, která vede k rychlé difuzivitě, je zcela zásadním faktorem pro její využíti jako rozpouštědla při extrakčních a separačních procesech. Tomuto využití napomáhá i fakt, že díky mnohem větší stlačitelnosti než u běžných kapalin, dochází při malých změnách teploty a tlaku k velkým změnám ve vlastnostech ovlivňujících rozpustnost látek [12].

Nejčastěji využívanou nadkritickou tekutinou je nadkritický oxid uhličitý ($scCO_2$), který má oproti ostatním nadkritickým tekutinám (např. propan, ethylen, amoniak – *obr. č. 6*) několik výhodných vlastností. Jedná se především o dosažení jeho nadkritického stavu, kterého lze snadno dosáhnout za laboratorních podmínek při T_k 31 °C a p_k 7,4 MPa, jeho inertnost, nehořlavost, nízkou cenu, snadnou odstranitelnost či neškodnost vůči přírodě. Naopak nevýhodou $scCO_2$ je jeho nepolární charakter a tím snížená schopnost rozpouštění látek polárních. Z tohoto důvodu se k němu často přidávají kosolventy, které modifikují jeho fyzikálně chemické vlastnosti. Jedná se o polární i nepolární organická rozpouštědla plně mísitelná s CO_2, nejčastěji ethanol, methanol, isopropanol, acetonitril, hexan a další. V závislosti na množství organického rozpouštědla potom rozlišujeme nadkritickou tekutinu (obvykle samotný CO_2, nebo s přídavkem 0–20 % organického kosolventu), tekutinu obohacenou oxidem uhličitým

SF	T_c [°C]	p_c [MPa]	Další aspekty
CO_2	33	7,4	nízká polarita
H_2O	374	22,1	korozivní
ethan	32	4,9	hořlavý
propan	97	4,3	hořlavý
ethylen	9	5,0	hořlavý
methanol	239	8,1	hořlavý
ethanol	241	6,1	hořlavý
toluen	319	4,1	hořlavý
amoniak	132	11,3	hořlavý, toxický

Obrázek 6: *Nadkritické tekutiny a jejich vybrané vlastnosti [12]*

(CXL → CXLE – extrakce za použití tekutiny obohacené oxidem uhličitým) a organické rozpouštědlo, kapalinu, za zvýšeného tlaku (PL → PLE – extrakce pomocí kapalin za zvýšeného tlaku) [11] [13].

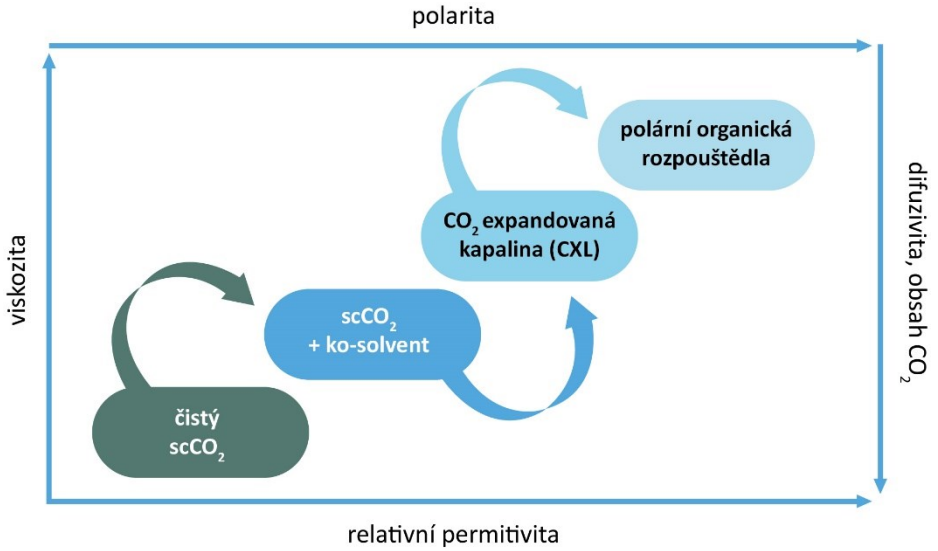
Při běžné SFE za využití nadkritického rozpouštědla $scCO_2$, popřípadě jeho kombinace s malým množstvím kosolventu, se využívá výhod nadkritického stavu, kdy schopnost rozpouštědla rozpouštět požadované látky je výrazně ovlivňována změnami tlaku a teploty.

Pro tekutinu obohacenou oxidem uhličitým je charakteristické, že namísto přidávání kosolventu do CO_2, jako je tomu u nadkritické tekutiny, lze přidat naopak CO_2 do rozpouštědla. U běžné SFE, kde je použit čistý CO_2, je dosahováno nízkých hodnot relativní permitivity, nízké polarity rozpouštědla a tím pádem rozpouštění nepolárních látek. S přídavkem malého množství kosolventu u SFE se relativní permitivita zvyšuje. U CXL lze ale získat ještě vyšší hodnoty relativní permitivity a tedy lepší rozpustnost polárních látek v matrici. Hustota CXL je srovnatelná s hustotou běžných organických rozpouštědel. Co se týče viskozity, tak ta je nižší než u běžných organických rozpouštědel (hodnota viskozity mezi SF a PL). Zároveň lze s CXL také pracovat za nižších tlaků než u zmíněných alternativních typů rozpouštědel, což vede k možnosti užívat méně nákladnou instrumentaci. Další výhodou je možnost dosažení uspokojivé rychlosti přenosu hmoty, a to bez nutnosti použití tak vysokých teplot jako např. u PLE. To poté dovoluje práci i s termolabilními sloučeninami [14] [15].

PLE probíhají za použití běžných rozpouštědel (ethanol, ethylacetát, ethylaktát, voda a další), která jsou vystavena zvýšenému tlaku. Principem této metody je skutečnost, že za zvýšené teploty a tlaku, podobně jako u SFE, dochází k fyzikálně chemickým změnám ve vlastnostech rozpouštědla, zvyšuje se rychlost přenosu hmoty, snižuje se povrchové napětí a viskozita rozpouštědla. Tyto faktory poté mají vliv na snadnější průnik rozpouštědla do pevné extrahované matrice. Důsledkem je poté fakt, že v porovnání s konvenčními extrakcemi, PLE dosahují vyšších výtěžků, probíhají rychleji a za nižší spotřeby rozpouštědla [16].

Změny ve vlastnostech rozpouštědel jsou shrnuty na *obr. č. 7*, kde je vidět, že přídavek organické složky k rozpouštědlu má za následek změny v polaritě a tím pádem zásadní vliv na druh extrahovaných látek. Zároveň s přibývajícím množstvím organické složky ke složce CO_2, se postupně vzdalujeme nadkritickému stavu. Často již nelze

o nadkritickém stavu vůbec hovořit, jelikož vzniklé směsi jsou kapaliny, které dosahují kritického bodu za jiných podmínek než CO_2. Díky tomu se částečně ztrácí výhody nadkritického stavu a vzniklá směs je ve stavu na pomezí mezi kapalinou a nadkritickou tekutinou.

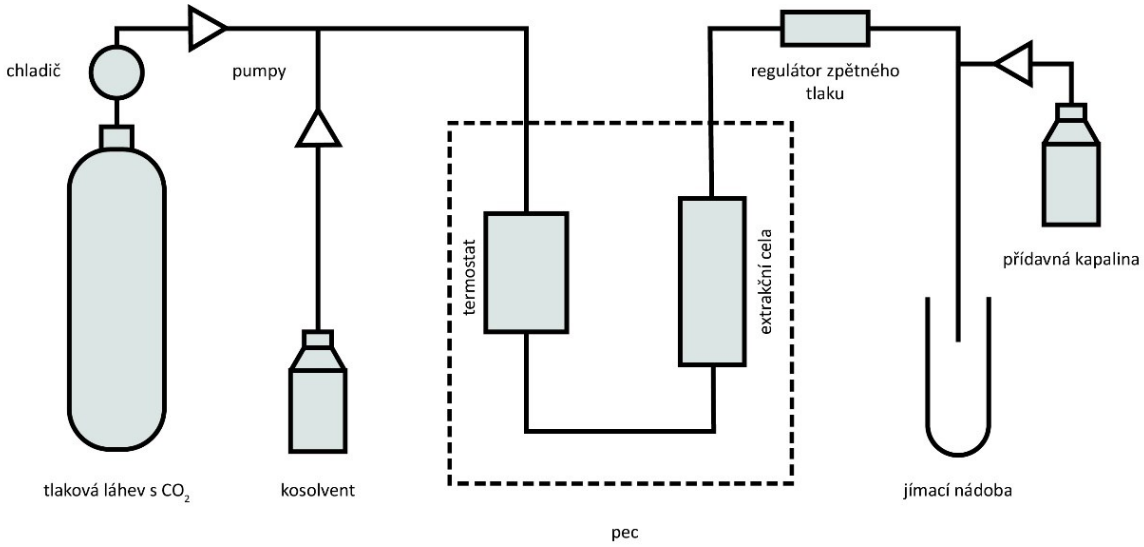


Obrázek 7: *Změny ve vlastnostech rozpouštědla s postupně přibývajícím obsahem organické složky [16]*

3.4.1 Instrumentace SFE a proces extrakce

Instrumentace SFE se skládá z několika základních částí *(obr. č. 8)*. Součástí techniky je ocelová zásobní láhev s rozpouštědlem – kapalným CO_2, ze které je CO_2 přes chladič pumpován pod tlakem do systému. Dále se v systému nachází pumpa, která čerpá kosolvent, obvykle organické rozpouštědlo použité v případě extrakce polárních sloučenin. Vzniká tak směs CO_2-kosolvent. Směs je pod tlakem čerpána do tzv. pece, která je vyhřívána na požadovanou teplotu. V tomto momentu se ze směsi stává tekutina v nadkritickém stavu či tekutina tomuto stavu blízká. Ta prochází extrakční nádobou, která je naplněna vzorkem, s daným vzorkem interaguje a unáší látky, které jsou v dané tekutině rozpustné. Následně tekutina s izolovanými látkami vstupuje do regulátoru zpětného tlaku (BPR), který kontroluje celý tlak soustavy, a to takovým způsobem, že v případě překročení požadovaného tlaku dojde k většímu otevření ventilu za uvolnění přetlaku. Za výstupem se CO_2 stává plynným, opouští systém a může být recyklován a znovu použit. Extrakt ve formě čisté látky nebo rozpuštěný v kosolventu je jímán do sběrné nádoby. V případě malého množství kosolventu a hrozícího vysrážení

extraktu v systému je za BPR k extraktu přidávána tzv. pomocná kapalina (make-up solvent) kompatibilní se složením extraktu. Popsaný proces lze označit jako dynamický mód extrakce, kdy extrakční činidlo prochází kontinuálně vzorkem během celého trvání extrakce. V případě statického módu extrakce se proces liší tím, že je vzorek v rozpouštědle po stanovený čas luhován [17] [18] [19].



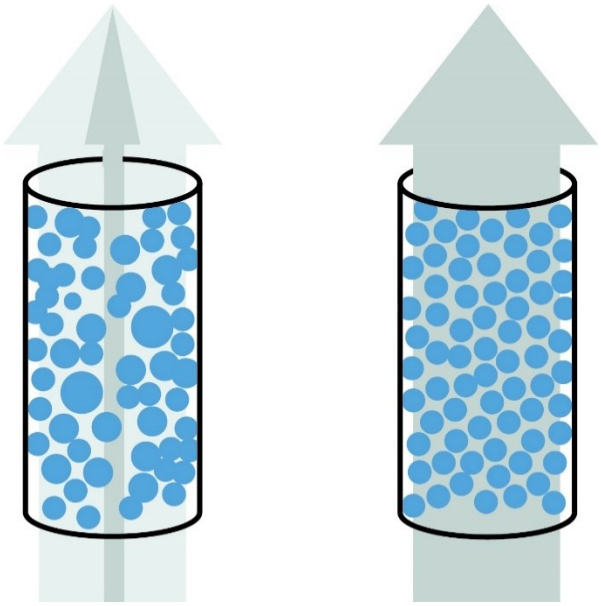
Obrázek 8: *Schéma SFE instrumentace*

3.4.2 Optimalizace metody, podmínky ovlivňující extrakci

Optimalizace metody je prováděna obvykle tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší extrakční výtěžnosti požadovaných látek. Tu lze ovlivnit pomocí řady faktorů a pomocí nastavení vhodných podmínek extrakce.

SFE je využívána pro extrakci vzorků s minimálním obsahem vody. Vzorek musí být dostatečně homogenizovaný. Lze jím naplnit celý objem extrakční cely, nebo jeho množství doplnit skleněnými kuličkami, pískem, či jiným inertním materiálem. Velikost částic vzorku i materiálu přidaného ke vzorku může ovlivnit výtěžnost extrakce. Dostatečnou homogenizací, kdy vznikají částice a mezičásticové prostory stejné velikosti docílíme kontinuálního toku rozpouštědla skrze vzorek *(obr. č. 9)*. Naopak, nejsou-li částice dostatečně homogenizovány, vznikají částice různě velké a stejně tak i rozdílné mezičásticové prostory. To poté může vést k atypickým pohybům rozpouštědla matricí (např. turbulentní proudění). Důsledkem špatného proudění může nastat situace, kdy rozpouštědlo prochází některými částmi vzorku snadněji a některými naopak

v nejhorším případě neprochází vůbec. Tím pádem dochází k nižším výtěžnostem extrakce. K zaplnění prostoru extrakční cely a udržení homogenity se přidávají ke vzorku již zmíněné skleněné kuličky stejné velikosti či písek. Mísí se buď se vzorkem anebo se vkládají na dno a navrch extrakční cely. Velikost kuliček může mít na výslednou výtěžnost také vliv, a proto je vhodné během optimalizace vyzkoušet kuličky o různých průměrech [13].



Obrázek 9: *Vliv rozdílné velikosti částic a mezičásticových prostor na průtok rozpouštědla vzorkem. Na obrázku vlevo jsou znázorněny rozdílně velké částice a nekontinuální tok rozpouštědla. Na obrázku vpravo je znázorněno homogenní prostředí a kontinuální tok rozpouštědla vzorkem.*

Základem optimalizace metody je výběr vhodného rozpouštědla, kterým je ve většině případech scCO_2 používaný v čistém stavu pro extrakci nepolárních či málo polárních sloučenin nebo zvolení CO_2 v kombinaci s kosolventem za účelem zvýšení relativní permitivity a tím lepší rozpustnosti extrahovaných polárních látek. Mezi nejčastější kosolventy patří methanol a ethanol s případným přídavkem vody nebo ethyl-acetátu. Voda a ethyl-acetát se chovají ve směsi jako modifikátory selektivity, kdy napomáhají zvýšení relativní permitivity. Stěžejním faktorem optimalizace metody je právě nalezení vhodného poměru složek tvořících rozpouštědlo. Vhodný poměr složek je také nutný pro zajištění toho, aby rozpouštědlo bylo tvořeno pouze jednou fází, fází kapalnou. V závislosti na množství jednotlivých složek (CO_2/organické rozpouštědlo/ voda) a schopnosti CO_2 se rozpouštět ve vodě a organickém rozpouštědle, zvoleném tlaku a teplotě může dojít k rozdělení směsi až na dvě či tři fáze (jedna plynná, jedna až

dvě kapalné). Rozdělení směsi je nežádoucím jevem, kterému je třeba předejít. K ověření jednofázového složení zamýšleného nebo zoptimalizovaného poměru složek směsi slouží třífázové diagramy, případně je toto možné ověřit experimentálně. Schopnost vody rozpouštět CO_2 není příliš velká, z toho důvodu musí být ve směsi zastoupená v minimálním množství, aby se předešlo zmíněnému rozdělení fází. Naopak obvykle používané kosolventy, ethanol a methanol, jsou klasifikovány jako rozpouštědla, která jsou schopna pojmout velké množství CO_2 [15] [20].

V případě použití samotného oxidu uhličitého, malého množství organického kosolventu nebo hrozícího vysrážení vzorku je k extraktu po proběhnuté extrakci obvykle přidána pomocná kapalina – organické rozpouštědlo kompatibilní se vzorkem a extraktem.

V rámci optimalizace extrakce je nutné zvolit vhodnou teplotu a tlak, které ovlivňují fyzikálně chemické vlastnosti rozpouštědla. Při využívání čistého $scCO_2$ jako rozpouštědla je tlak velmi podstatným parametrem pro optimalizaci. I malé změny v hodnotách tlaku poté mají zásadní vliv na polaritu a s tím spojenou rozpustnost látek. Použití různého tlaku tak umožní extrahovat látky o různé polaritě. S rostoucím přidáváním organického kosolventu k rozpouštědlu se však vliv tlaku na extrakci látek určité polarity snižuje. Při optimalizaci parametru tlaku platí některá obecná pravidla, kdy např. při zvýšení tlaku, pod kterým prochází rozpouštědlo soustavou, dochází ke zvýšení rozpouštěcí síly a zvýšení hustoty rozpouštědla. Nelze však říct, že by vyšší hodnoty tlaku měly zároveň za následek vyšší výtěžnost extrakce. Vyšší hodnoty tlaku mohou mít naopak i mnohé negativní vlastnosti, kdy se např. snižuje selektivita extrakce, zvyšuje se nákladnost a zátěž instrumentace.

Volba teploty hraje v nastavení podmínek extrakce menší roli než volba tlaku, a to především z důvodu, že za vyšších teplot dochází k nechtěné degradaci biologického materiálu, který se extrahuje nejčastěji. Z tohoto důvodu se během extrakcí většinou pohybujeme v rozmezí teplot, kdy tato degradace nehrozí, a to při teplotách 30–80 °C.

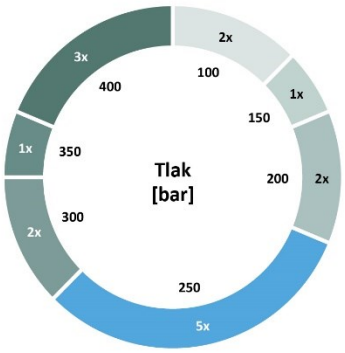
Pro konečné doladění podmínek extrakce slouží parametry průtoková rychlost [mL/min], tedy rychlost průtoku rozpouštědla soustavou, která má vliv zejména na přenos hmoty, a doba extrakce [min], jejíž ideální nastavení je takové, aby se vyextrahovalo co největší množství požadované látky. Pro zjištění opakovatelnosti metody je vhodné celý proces provést za stejných podmínek několikrát.

3.4.3 Podmínky extrakce kvercetinu z rostlinného materiálu pomocí SFE

V současné době bylo publikováno několik prací zaměřených na extrakci kvercetinu z různých rostlinných materiálů s využitím SFE *(tab. č. 1)*. Doposud ale nebyl publikován žádný vědecký článek, který by se přímo zabýval extrakcí kvercetinu z kdoule pomocí SFE. V několika publikacích byla prováděna extrakce také pomocí Soxhletovy extrakce, kdy je pevný vzorek vystaven působení rozpouštědla po několik hodin až dnů. Právě výrazně dlouhá doba extrakce, velká spotřeba rozpouštědla, riziko degradace extrahovaných sloučenin teplem, využívání rozpouštědel nešetrných k přírodě nebo omezená rozpustnost vzorku v rozpouštědle dělá tento typ extrakce nepopulárním.

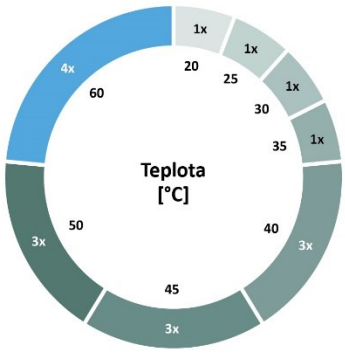
Co se týče nevýhod SFE, ačkoliv doba extrakce není obvykle tak dlouhá jako u zmíněné Soxhletovy extrakce, stále se ve většině publikacích pohybovala nejčastěji okolo dvou hodin a více. S tím je spojena také poměrně vysoká spotřeba rozpouštědla (povětšinou byl v publikacích zvolen dynamický mód extrakce, *graf č. 2*), která samozřejmě závisí také na jeho složení. CO_2 lze poměrně snadno recyklovat a vracet zpět do systému. V závislosti na podílu organické složky ale dochází k velké spotřebě organického rozpouštědla. Zajímavé je, že ačkoliv se ve zmiňovaných publikacích nejčastěji extrahovaly polární látky, tak složení rozpouštědla bylo různorodé. Téměř ve všech případech byl jako kosolvent použit ethanol. Z rešerše dále vyplývá, že nejpoužívanějším tlakem byl tlak 250 bar (*graf č. 1*) a nejpoužívanější teplota byla 60 °C (*graf č. 3*). Obě hodnoty se poměrně shodují s konečnými parametry, které vyšly z optimalizace metody extrakce kvercetinu z kdoule v experimentální části (223 bar a 66 °C).

Graf č. 1: *Tlak - počet měření za daného tlaku*



Graf č. 2: *Průtokový rychlost - počet měření za dané průtokové rychlosti*

Graf č. 3: *Teplota - počet měření za dané teploty*



Obrázek 10: *Soubor grafů – počet měření za daného tlaku, průtokové rychlosti a teploty*

Tabulka 1: *Podmínky extrakce kvercetinu z rostlinného materiálu pomocí SFE*
(S – statický mód extrakce, D – dynamický mód extrakce, HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, GS – plynová chromatografie, UHPLC – ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie, PDA – detektor s fotodiodovým polem, DAD – detektor s diodovým polem, FID – plamenově-ionizační detektor, MS – hmotnostní spektrometr, UV-VIS – detekce pomocí spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

Analyty	Matrice/typ vzorku	Přidané organické rozpouštědlo	Poměr CO_2 a kosolventu (v/v)	Tlak [bar]	Teplota [°C]	Průtoková rychlost [mL/min]	Mód extrakce	Doba extrakce [min]	Analýza a detekce	Zdroj
fenolové kyseliny, katechin, kvercetin	*Stachytarpheta Jamaicensis*	ethanol	-	250	60	-	S	240	HPLC/UV	[21]
kvercetin, rutin	*Hyperici Herba*	methanol	85/15	332	50	0,5 – 1,0	S/D	30 / 60	HPLC/DAD	[22]
fenolové kyseliny, kvercetin	grepfruit	ethanol	90/10	200	40	5,8	D	180	HPLC/DAD	[23]
kvercetin	*Rosa Damascena*	ethanol	-	250	46,3	0,7	D	120	HPLC/UV	[24]
humulen, trans-karyofylen, kyselina galová, kvercetin	*Achyrocline Satureioides*	ethanol	83,6/16,4	300	30	-	D	420	GC/FID	[25]
(+)-katechin, (–)-epikatechin, rutin, kvercetin, trans-resveratrol	grapfruitová kůra	ethanol	80/20	250	60	2	S/D	3 / 15	HPLC/DAD	[26]
stigmasterol, kvercetin, avikularin	*Mimosa Pudica*	ethanol	70/30	400	60	5	D	120	HPLC/UV	[27]
rutin, hyperin, isokvercetin, hibifolin, myricetin, kvercetin	*Abelmoschus Manihot*	ethanol	15/85	200	52	2	D	120	HPLC/UV-VIS	[28]
kvercetin	*Allium cepa*	ethanol	92,4/7,6	393	40	5	S	150	HPLC/UV	[29]
kvercetin, mangiferin, isomangiferin, kempferol	*Mangifera indica*	aceton	20/80	100	40	1	-	-	HPLC/UV	[30]
flavonoidy, fenolové kyseliny	*Morus Indica* - listy	-	-	150	23	4,4	-	-	HPLC/DAD	[31]
alkaloidy, flavonoidy, fenolové kyseliny	*Mimosa Pudica Linn*	-	-	280	60	6-8	D	120	HPLC/UV	[32]
flavonoidy (3-*O*-methyl kvercetin)	*Opuntia Ficus-indica*	ethanol	90/10	400	35	-	-	120	HPLC/PDA	[33]
mastné kyseliny, kvercetin	*Moringa Oleifera* - listy	ethanol	40/60	70	50	1,2	D	160	GS/MS, HPLC/MS	[34]
kvercetin, ginkgetin	*Taxus Chinensis*	ethanol	18/82	240	46	2	D	138	UHPLC/PDA	[35]
flavonoidy, fenolové kyseliny	*Achyrocline Satureioides*	ethanol	80/20	100 - 300	45	-	-	120	-	[36]

Získané extrakty byly nejčastěji analyzovány pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie (HPLC) a ultra-vysoko účinné kapalinové chromatografie (UHPLC) ve spojení se spektrofotometrickou detekcí v oblasti ultrafialového a viditelného záření (UV-VIS) v oblasti jedné nebo dvou vlnových délek nebo s detekcí diodového pole (DAD) umožňující měřit celé spektrum vlnových délek. Používána byla i plynová chromatografie (GC) ve spojení s plamenově ionizačním detektorem nebo s hmotnostním spektrometrem (MS).

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

- kvercetin, quercetin, čistota > 95 % (HPLC) (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- ultračistá voda vyrobena na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, Mili-Q, Millipore
- ethanol absolutní, čistota > 99,7 % (VWR International s.r.o., Česká republika)
- methanol, Methanol HiPerSolv CHROMANORM®, HPLC – ULTRA LC-MS, čistota ≥ 99,9 % (Merck KGaA, Česká republika)
- kyselina mravenčí, Formic acid, čistota 98–100 %, LC-MS (Merck KGaA, Česká republika)
- oxid uhličitý, CO_2, čistota > 99,995 % (Messer, Česká republika)

4.2 Přístrojové vybavení a pomůcky

- SFE systém MV-10 (Waters, USA)
- ChromScope™ software (Waters, USA)
- Acquity UPLC systém (Waters, USA)
    - čerpadlo
    - automatický dávkovač
    - kolonový termostat
- hmotnostní analyzátor typu trojitého kvadrupólu Quattro Micro (Waters, Velká Británie)
- analytická kolona s reverzní fází typu C18, Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2,1x100 mm, 1,7 µm) (Waters, Irsko)
- MassLynx 4.1 software (Waters, Velká Británie)
- MODDE software 12.1 (Umetrics, Švédsko)
- digitální ultrazvuková lázeň DU-32 (Argo Lab, Itálie)
- analytické váhy HR-120 (A&D company, Japonsko)
- automatické mikropipety se špičkami (Eppendorf, Česká republika)
- odparka Concentrator plus 5305 (Eppendorf, Česká republika)
- třepačka TS-100 (Biosan, Česká republika)
- centrifuga MIKRO 220R (Hettich, Německo)

- mikrovialky 2 mL (Thermo scientific, Česká republika) s perforovanými víčky (Waters, Česká republika)
- vialky 7 mL s víčkem (Supelco, Česká republika)
- mikrozkumavky Eppendorf 2,0 mL (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- skleněné kuličky 2, 3, 5 mm (Waters, Česká republika)
- mlýnek IKA A11 basic (Fischer scientific, Česká republika)

4.3 Příprava roztoků

4.3.1 Příprava zásobních roztoků

Pro přípravu zásobního roztoku kvercetinu byl jako rozpouštědlo použit methanol. Koncentrace zásobního roztoku byla 1 mg/mL. Zásobní roztok byl uchováván v lednici a připravován čerstvý dle potřeby.

4.3.2 Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztok kvercetinu byl připravován ředěním zásobního roztoku do roztoku methanolu a 0,1% kyseliny mravenčí v poměru 60:40. Roztoky byly připravovány v koncentracích 10 µg/mL – 1 ng/mL vždy před každým měřením.

Pracovní roztok o koncentraci 10 µg/mL byl připraven odebráním 10 µL zásobního roztoku, přidáním 400 µL 0,1% kyseliny mravenčí a doplněním objemu do 1 mL methanolem. Dále byly roztoky ředěny v rozmezí 1 µg/mL – 1 ng/mL pomocí směsi methanol : 0,1% kyselina mravenčí v poměru 60:40.

4.3.3 Příprava roztoků pro ředění standardů a odpařených extraktů

Pro ředění pracovních roztoků a rozpouštění odpařených extraktů byla použita směs methanolu a 0,1% kyseliny mravenčí připravená smísením uvedených roztoků v poměru 60:40.

4.3.4 Příprava roztoků pro extrakci

Jako kosolventy pro SFE byly použity ethanol, ethanol s přídavkem 10 % a 20 % destilované vody. Roztok ethanolu s 10 % vody byl připraven smísením 20 mL destilované vody a 180 mL ethanolu odměřenými odměrnými válci a smísenými

v zásobní lahvi. Roztok ethanolu s 20 % vody byl připraven smísením 40 mL destilované vody a 160 mL ethanolu odměřenými odměrnými válci a smísenými v zásobní lahvi.

4.3.5 Příprava mobilní fáze

0,1% kyselina mravenčí byla připravena odměřením 500 µL kyseliny mravenčí do 500 mL odměrné baňky s destilovanou vodou a roztok byl vodou doplněn po rysku.

4.4 Optimalizace SFE

Pro extrakci byl používán SFE systém (Waters MV-10) sestávající z pump čerpajících CO_2 a kosolvent, z pece pro umístění extrakčních cel, automatického regulátoru zpětného tlaku, pumpy čerpající přídavnou kapalinu, modulu pro sběr frakcí a chladiče chladícího CO_2 a pracujícího za teploty 4 °C. Hraniční hodnoty nastavení tlaku a teploty byly na tomto přístroji 400 barů a 90 °C. Přístroj byl ovládán prostřednictvím Chrom-Scope™ softwaru (Waters, USA).

4.4.1 Příprava vzorků pro extrakci

Jako vzorek byly použity mrazem sušené plody kdouloně obecné (*Cydonia oblonga* Mill., čeleď *Rosaceae)* o celkové hmotnosti 54 g. Drcené usušené plody byly zhomogenizovány v mlýnku na jemný prášek žlutohnědého zbarvení. Navážka vzorku pro extrakci činila 0,50 g a byla nasypána do 5 mL extrakční ocelové cely mezi vrstvu skleněných kuliček, které doplňovaly objem cely *(obr. č. 11)*. Cela byla zapojena do systému pomocí kapilár tak, aby extrakční rozpouštědlo protékající kapilárou vstupovalo do cely zespodu a vystupovalo z ní seshora.

Obrázek 11: *Průřez naplněnou extrakční celou*

4.4.2 Vývoj metody

Optimalizace metody byla realizována v pěti blocích měření a byla provedena pomocí software MODDE umožňující optimalizaci parametrů a vyhodnocení jejich interakcí a vlivu. V prvních třech krocích optimalizace (celkem 45 experimentů) byl testován vliv teploty, tlaku a složení extrakčního rozpouštědla jako stěžejních parametrů pro SFE. Teplota byla testována v rozmezí 30–80 °C, tlak v rozmezí 100–300 bar, jako kosolventy byly testovány ethanol, ethanol s přídavkem 10 % vody a 20 % vody. Poměr kosolventu a CO_2 byl v rozmezí 10–90 % kosolventu. Průtok extrakčního činidla byl 2 mL/min. Přídavná kapalina o průtoku 0,5 mL/min byla použita pouze v případě, pokud byl poměr kosolventu a CO_2 10:90. Z těchto experimentů byly vyhodnoceny optimální hodnoty uvedených parametrů. Následně byla testována kinetika, kdy byl sledován vliv průtokové rychlosti v rozmezí 2–5 mL/min a vliv doby extrakce na výtěžnost. Posledním krokem bylo ověření opakovatelnosti extrakce za použití zoptimalizovaných hodnot testovaných parametrů.

Po každé extrakci byl systém propláchnut po dobu 5 min směsí CO_2/kosolvent a poté čistým CO_2. Extrakční cely byly vždy rozebrány, vymyty destilovanou vodou a ethanolem a těsnění byla ještě zvlášť čištěna pomocí ultrazvukové lázně.

4.4.3 Úprava získaného extraktu

Získaný extrakt byl jímán do sběrných nádob. Jeho celkový objem byl vždy změřen a následně byla část odebrána a uchována v mrazicím boxu v 7 mL vialkách za teploty -20 °C. Před UHPLC-MS analýzou byl 1 mL extraktu odebrán do mikrozkumavek Eppendorf. Rozpouštědlo se nechalo odpařit pod vakuem při teplotě 30 °C. Odpařený extrakt byl znovu rozpuštěn ve 100 µL předem připravené směsi 0,1% kyseliny mravenčí a methanolu (40:60). Pro rozpuštění se mikrozkumavky nechaly 10 min třepat v třepačce při laboratorní teplotě, následně byly vzorky centrifugovány po dobu 5 min. Zakoncentrovaný extrakt byl přepipetován z mikrozkumavek do mikrovialek a opatřen uzávěrem s perforovanou membránou a následně nastříknut do UHPLC-MS systému.

4.5 UHPLC-MS/MS analýza

Pro analýzu extraktu byla zvolena metoda již původně publikovaná v odborném článku [37]. Pro analýzu byl použit UHPLC-MS/MS systém skládající se z kapalinového chromatografu UPLC (Waters) spojeného s hmotnostním detektorem typu trojitého kvadrupólu Quattro Micro (Waters). Separace probíhala na analytické koloně Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2,1x100 mm, 1,7 µm) za použití gradientové eluce. Mobilní fáze se skládala z methanolu (složka B) a 0,1% kyseliny mravenčí (složka A). Gradient začínal na 5 % organické složky B, jejíž množství se během 5 minut zvýšilo na 95 %. V čase 5,1 min byly opět nastaveny výchozí podmínky gradientu po dobu 2 minut tak, aby kolona byla ekvilibrována.

Veškeré nastřikované roztoky byly skladovány v automatickém dávkovači za teploty 4 °C. Objem vzorku nastřikovaného na kolonu činil 5 µL. Každý vzorek byl nastřikován dvakrát. Kolona byla během analýzy udržována na teplotě 40 °C.

Detekce pomocí hmotnostního spektrometru byla provedena v pozitivním módu ionizace elektrosprejem. Parametry iontového zdroje byly nastaveny následovně: napětí na kapiláře 3200 V, teplota iontového zdroje 130 °C, extrakční kužel 3,0 V, hexapól 0,5 V, napětí na vstupním kuželu 40 V, kolizní energie 30 V. Zmlžujícím plynem byl dusík o průtokové rychlosti 800 L/hod a teplotě 450 °C. Dusík byl také použit na vstupním kuželu, a to o průtoku 100 L/hod. Argon byl použit jako kolizní plyn. Kvantifikace analytu byla provedena s využitím SRM (monitorování vybrané reakce) experimentu, kdy byly pro kvercetin sledovány dva přechody s ohledem na selektivitu analýzy. Jako prekurzor byla zvolena protonovaná molekula $[M+H]^+$ o *m/z* 302,91. Produktové ionty pro jednotlivé SRM přechody byly následující: SRM1 – 136,92 a SRM2 – 152,87.

MassLynx software byl použit pro kontrolu probíhající analýzy a pro úpravu (integraci píků) nashromážděných dat [37].

4.6 Parametry hodnocení

4.6.1 Výpočet koncentrace vzorků

Prvním krokem při hodnocení dat bylo zpracování výsledků pomocí MassLynx softwaru. Stěžejními informacemi byly zejména plochy píků (A) analyzovaných vzorků a standardu. Jelikož byl každý vzorek nastříknutý na kolonu dvakrát, tak musely být

nejprve jednotlivé plochy píků u stejných vzorků zprůměrovány. Následně nás zajímaly výsledné reálné koncentrace kvercetinu v 1 mL roztoku (respektive koncentrace v ng vztažené na 0,5 g vzorku). Výpočet lze shrnout do jednoho vzorce:

$$c = \left(\frac{A_{vz}}{A_{st}} \times 1000\right) \times V_r \times \frac{1}{10}$$

Poměr A_{vz}/A_{st} představuje poměr plochy píku vzorku ku ploše standardu. Koncentrace standardu byla 1 µg/mL. Takto byla zjištěna koncentrace vzorku v 1 mL. V případě převedení koncentrace z µg/mL na ng/mL došlo k násobení tisícem. V_r představuje v rovnici objem extraktu, který byl extrahován pomocí SFE, jímž bylo třeba násobit, abychom získaly reálnou koncentraci. Použité zředění bylo vždy deset na základě zakoncentrování vzorku.

4.6.2 Kvantifikace pomocí metody kalibrační přímky

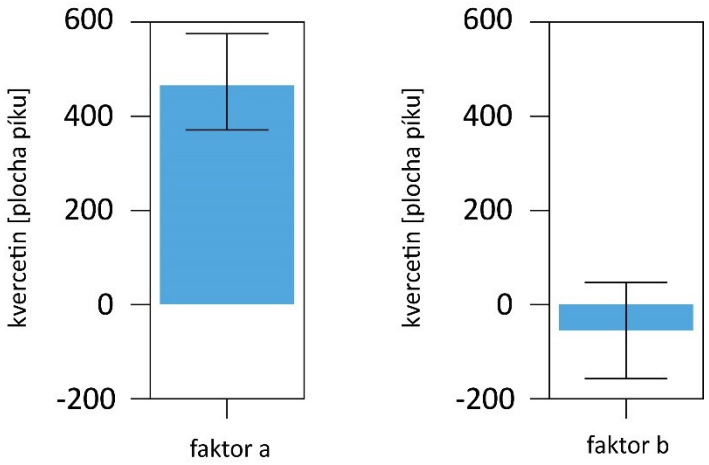
Kvantifikace pomocí metody kalibrační přímky byla využita při zjišťování opakovatelnosti metody a při kvantifikaci konečného vyhodnocení vzorků z dodaného rostlinného materiálu. Jedná se o metodu, při které se zjišťuje koncentrace požadovaných vzorků pomocí kalibrační přímky získané proměřením řady standardních roztoků. Linearita kalibrační závislosti je dána korelačním koeficientem. V ideálním případě se korelační koeficient r^2 blíží 1 (r^2 = 0,9999…). Rozsah kalibrační přímky byl při analýze stanoven na 5–1000 ng/mL proměřením standardních vzorků o koncentracích 1, 5, 10, 50, 100, 500 a 1000 ng/mL.

4.6.3 MODDE software

Pro hodnocení a správnou interpretaci výsledků při vývoji metody byl použit statistický software MODDE. Důležitým nástrojem, který tento program pro analýzu poskytoval, byla možnost vygenerování zanalyzovaných dat ve formě grafů. Pro vyhodnocení výsledků byly použity následující grafy:

- **Graf znázorňující vlivy faktorů** *(obr. č. 12)*

Hodnotí míru vlivu určitého faktoru na model měření (v našem případě výtěžnost extrakce) – signifikantním nálezem je takový nález, při kterém výška sloupce v grafu pro daný parametr dosahuje co nejvyšší plusové hodnoty na ose y a zároveň křivka rozsahu nejistoty neprotíná y = 0. Nesignifikantním nálezem je poté takový nález, jehož výška sloupce je blízko y = 0 a křivka rozsahu nejistoty protíná y = 0.

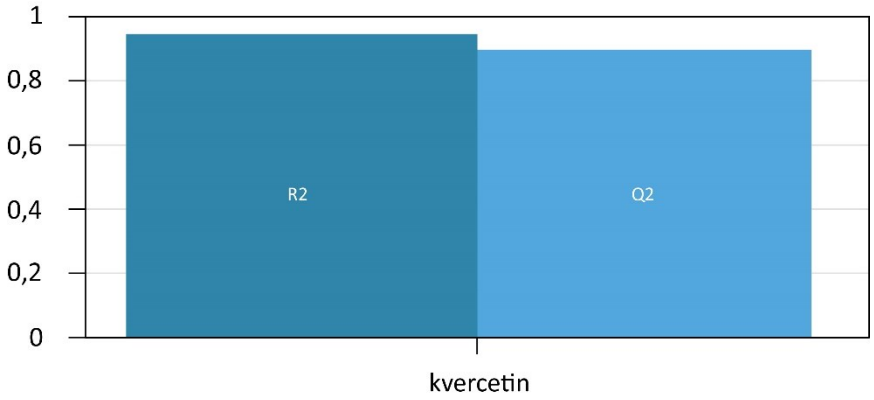


Obrázek 12: *Grafy znázorňující vlivy faktoru. Graf vlevo znázorňující signifikantní nález, graf vpravo nesignifikantní nález.*

- **Graf vhodnosti modelu** *(obr. č. 13)*

První sloupec (R2) znázorňuje koeficient determinace (jakou část z celkové variability se pomocí modelu podařilo vysvětlit), kdy R2 se pohybuje v rozmezí y = 0–1. Čím blíže se výška sloupce dostane k y = 1, tím více data korelují s daným modelem. Např. R2 = 0,8 znamená, že 80 % bodů je vysvětlitelných modelem. Sloupec by zároveň měl přesáhnout y = 0,5.

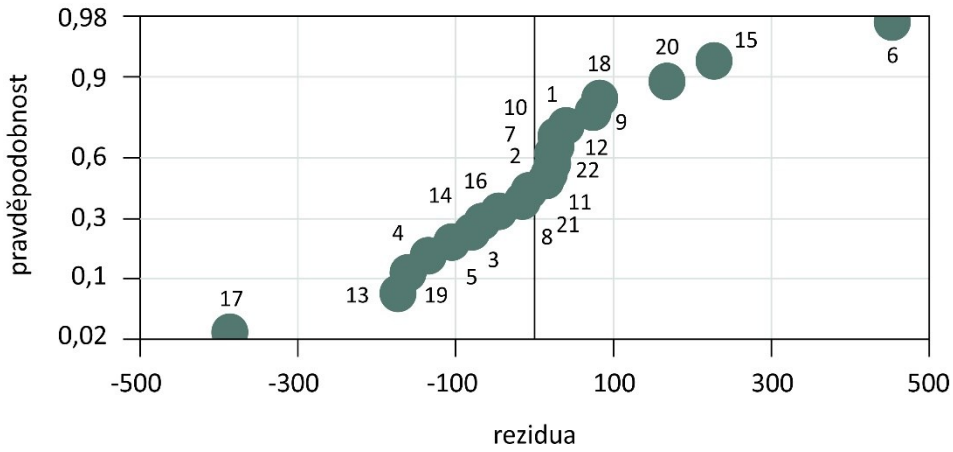
Druhý sloupec (Q2) zobrazuje odhad přesnosti budoucí predikce. Výška sloupce by měla být více než y = 0, pro dobrý model 0,5 a více. Zároveň rozdíl mezi R2 a Q2 by měl být menší než 0,3.



Obrázek 13: *Graf vhodnosti modelu*

- **Graf pravděpodobnosti** *(obr. č. 14)*

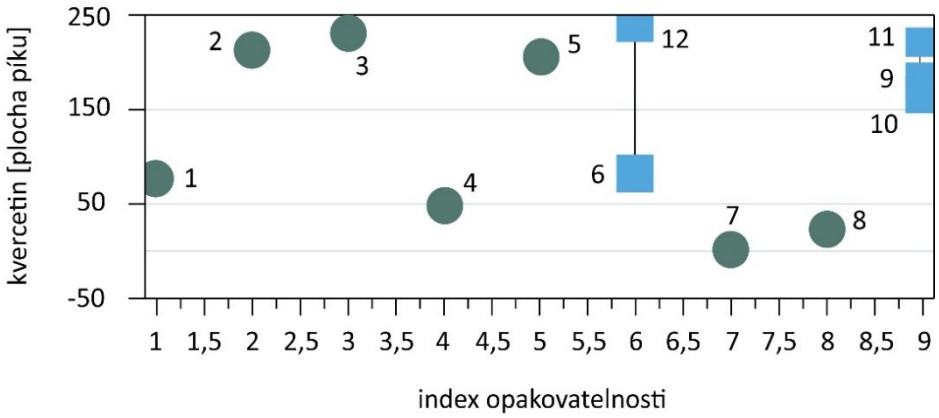
Body grafu pravděpodobnosti by mělo být možné proložit přímkou, pro ideální model lze všechny body proložit přímkou.



Obrázek 14: *Graf pravděpodobnosti*

Graf opakovatelnosti *(obr. č. 15)*

Graf opakovatelnosti by měl představovat ideální stav, a to takový stav, že variabilita opakovaných experimentů je menší než celková variabilita. Měření, která proběhla za zcela totožných podmínek, jsou v grafu vyznačena jako modré čtvercové body, kdy pro potvrzení opakovatelnosti by tyto body měly mít stejnou hodnotu na ose y (= plocha píku). V případě jejich rozestupu, viz body 6 a 17, se jedná o nežádoucí jev. Měření, která proběhla za rozdílných podmínek, jsou značena jako zelené kulaté body [38].



Obrázek 15: *Graf opakovatelnosti*

4.6.4 Směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka

Důležitým nástrojem pro hodnocení výsledků byl také výpočet směrodatné odchylky (SD – průměrná odchylku od průměru):

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

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

A výpočet relativní směrodatné odchylky (RSD – kolik procent z průměru představuje směrodatná odchylka):

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

5 Výsledky

5.1 Optimalizace základních parametrů

Pro optimalizaci klíčových parametrů ovlivňujících výtěžnost SFE bylo použito dvoukrokového designu experimentů (DoE).

5.1.1 Plackett-Burman design model

Prvním krokem optimalizace bylo testování základních parametrů, tj. složení extrakčního rozpouštědla (poměr CO_2 a kosolventu, obsah vody), extrakční teplota a tlak. K tomuto testování byl použit Plackett-Burman design model, který umožňuje odhalit vliv jednotlivých testovaných parametrů na extrakci, v tomto případě na její výtěžnost. Plackett-Burman design model je vhodný v případě malého počtu experimentů, nezohledňuje interakce mezi jednotlivými faktory a hlavním cílem je nalezení správného směru, kterým se při optimalizaci vydat, tzn. jaké faktory mají na extrakci vliv a jak velký tento vliv je. Tento blok měření sestával z jedenácti extrakcí *(tab. č. 2)*, kdy byly testovány následující parametry v uvedených rozmezích – teplota (30–80 °C), tlak (100–300 bar), extrakční rozpouštědlo tvořené směsí CO_2 a EtOH v poměrech 10/90 – 90/10, obsah vody v EtOH 0–20 %. Doba extrakce byla stanovena na 10 min a mód extrakce, stejně jako při extrakcích v následujících blocích měření, byl dynamický. Průtoková rychlost extrakčního činidla byla nastavena na 2 mL/min. Přídavná kapalina o průtoku 0,5 mL/min byla použita pouze v případě nízkého obsahu

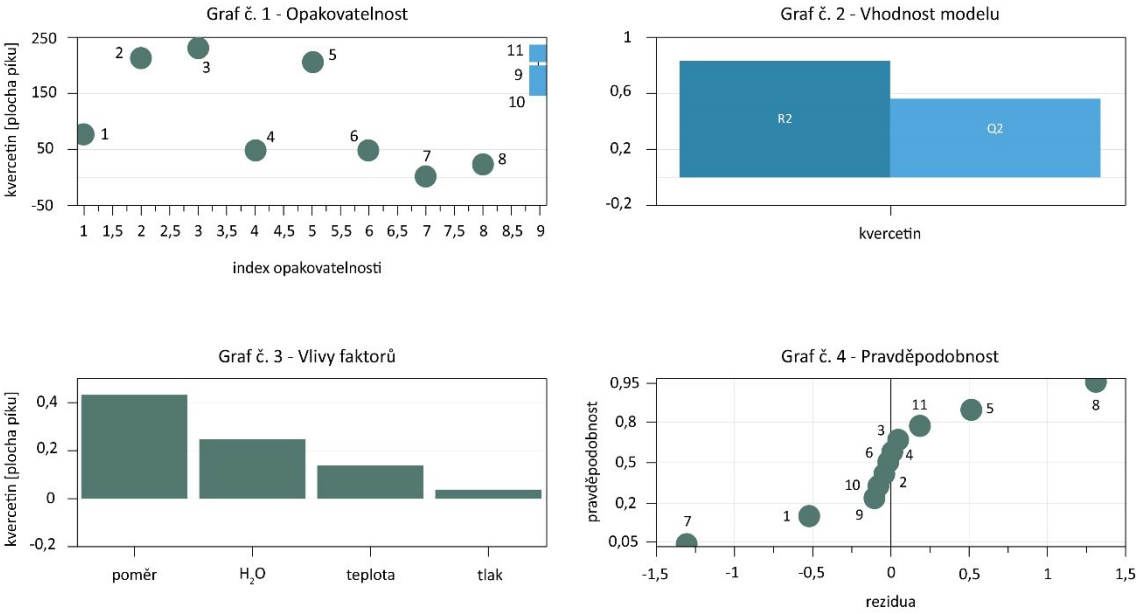
Tabulka 2: *Optimalizace základních parametrů – vstupní parametry a výstupní hodnoty v ng/0,5 g vzorku*

	EtOH [%]	obsah vody [%]	teplota [°C]	tlak [bar]	výtěžnost [ng/0,5 g]
N1	90	0	30	300	7,85
N2	90	20	30	100	21,39
N3	90	20	80	100	23,19
N4	10	20	80	300	4,95
N5	90	0	80	300	20,75
N6	10	20	30	300	4,85
N7	10	0	80	100	0,20
N8	10	0	30	100	2,30
N9	50	10	55	200	13,59
N10	50	10	55	200	17,15
N11	50	10	55	200	22,45

kosolventu v extrakčním činidle, kdy byly očekávány nízké finální objemy extraktu a hrozilo vysrážení extraktu v systému.

Výstupní hodnoty měření sestávaly ze získaných ploch píků kvercetinu, které dále sloužily pro výpočet reálné koncentrace kvercetinu v daném vzorku. Podrobný postup výpočtu je uveden v kapitole 4.6.1 – Výpočet koncentrace vzorků. Získané výsledky byly dále zpracovány pomocí statistického software MODDE.

Ze získaných grafů *(obr. č. 16)* lze vyhodnotit, že nejvýraznější vliv na výtěžnost má dle výšky sloupce grafu Vlivu faktorů parametr – poměr CO_2/ethanol. Určitý vliv byl shledán u parametru obsah vody v ethanolu. Naopak parametry teplota a tlak se zdály být již pro ovlivnění výtěžnosti téměř zanedbatelné.

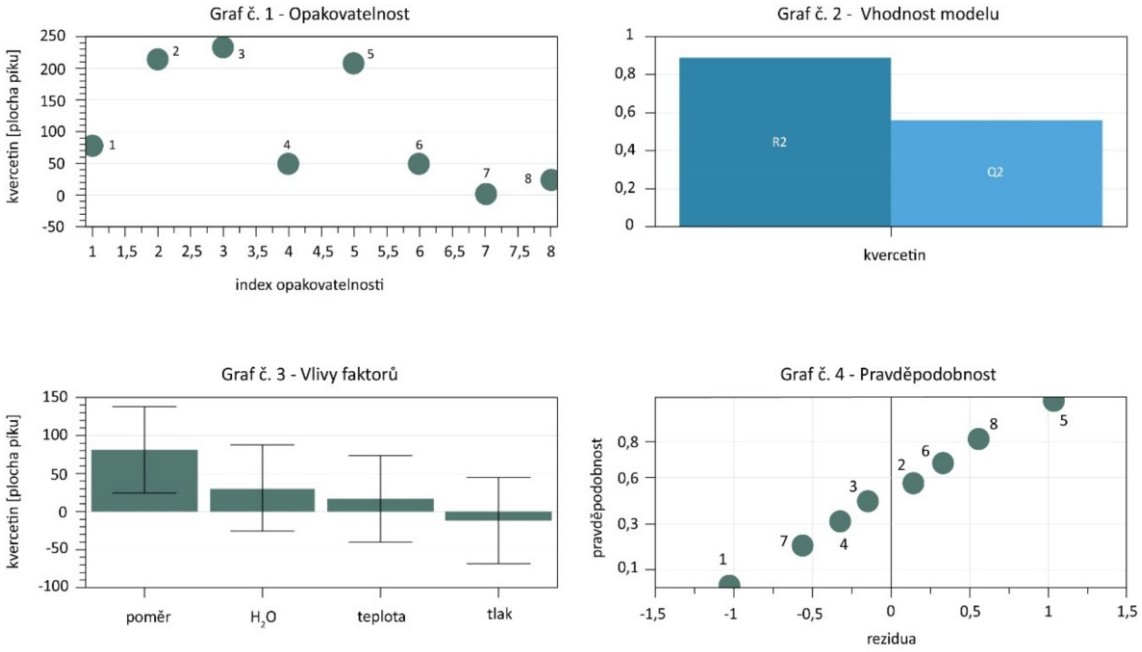


Obrázek 16: *Plackett-Burman design model*

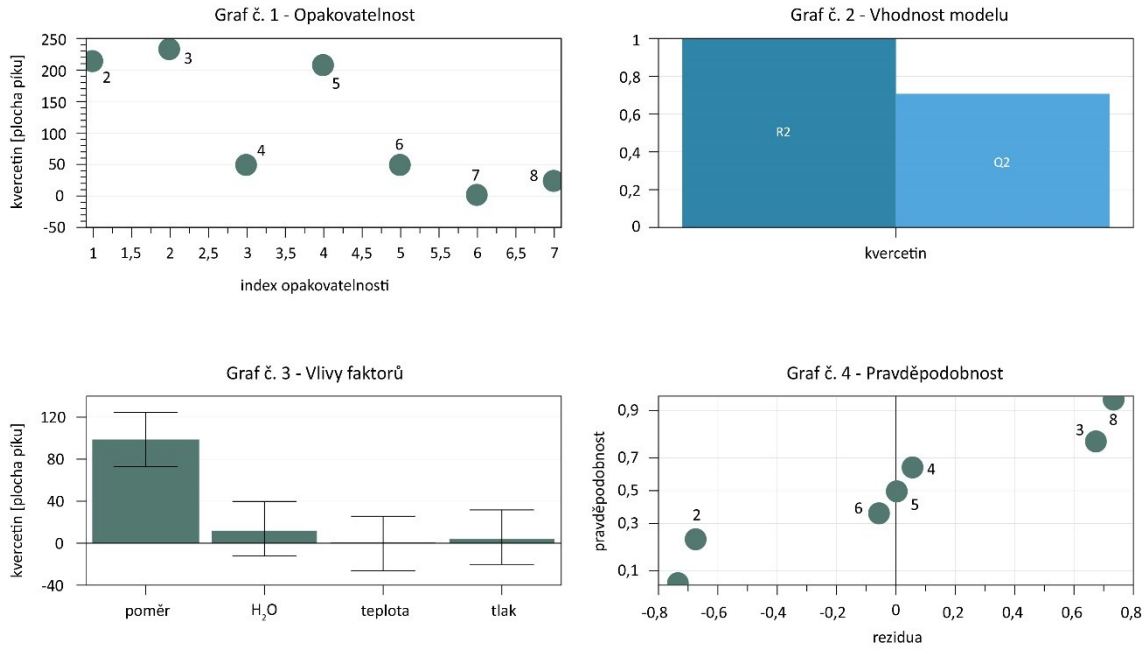
Pro zjednodušení analýzy byla v následujících grafech *(obr. č. 17–18)* vyřazena některá měření. U vzorků N9, 10, 11 měřených za stejných podmínek byla shledána opakovatelnost a pro přehlednost byly v dalších grafech vyřazeny. Následnou úpravou v analýze dat bylo také vyřazení vzorku N1 *(obr. č. 18)*, který vykazoval velké vychýlení od ostatních výsledků měřených za stejných hodnot poměru CO_2/ethanol.

Po proběhlých úpravách je patrné, že v grafu opakovatelnosti se veškeré hodnoty, u nichž vzorky byly extrahovány za stejného poměru CO_2/ethanol, nacházejí téměř v jedné rovině. Graf vhodnosti modelu ukazuje, že model poskytuje dostatečnou variabilitu (R2) a predikovatelnost výsledků (Q2). Graf znázorňující vlivy faktorů

potvrzuje značný vliv na výtěžnost extrakce u poměru CO_2/ethanol. Vyšší teploty a tlaky poskytly mírný nárust výtěžnosti, avšak s nesignifikantním vlivem. Kladně lze také hodnotit, že grafem pravděpodobnosti lze poměrně dobře proložit přímka. Na základě získaných výsledků bylo pokračováno v další optimalizaci SFE metody pro extrakci kvercetinu.



Obrázek 17: *Plackett-Burman design model (bez vzorků N9, N10, N11)*



Obrázek 18: *Plackett-Burman design model (bez vzorků N9, N10, N11, N1)*

5.1.2 Plně faktoriální design experimentů (full factorial design)

Na základě získaných výsledků z předchozích experimentů byla pomocí plně faktoriálního designu, který umožňuje odhalit i interakce mezi jednotlivými parametry, dokončena optimalizace základních parametrů, tj. složení extrakčního rozpouštědla (poměr CO_2 a kosolventu), extrakční teploty a tlaku. Z důvodu významného vlivu parametru poměru CO_2 a kosolventu bylo testováno stejné rozmezí od 10 po 90 % kosolventu smíseného s CO_2. Jako kosolvent byl zvolen ethanol s 10 % vody, který vykazoval nejvyšší výtěžnosti. Rozmezí testovaných hodnot teploty a tlaku bylo zúženo na 60–80 °C a 150–300 barů. Tento blok experimentů obsahoval 22 měření, testované parametry jsou shrnuty v *tab. č. 3.* Stejně jako v předchozím designu byla doba extrakce 10 min, průtoková rychlost rozpouštědla 2 mL/min. Přídavná kapalina o průtoku 0,5 mL/min byla použita pouze v případě nízkého obsahu kosolventu v extrakčním činidle, kdy byly očekávány nízké finální objemy extraktu a hrozilo vysrážení extraktu v systému.

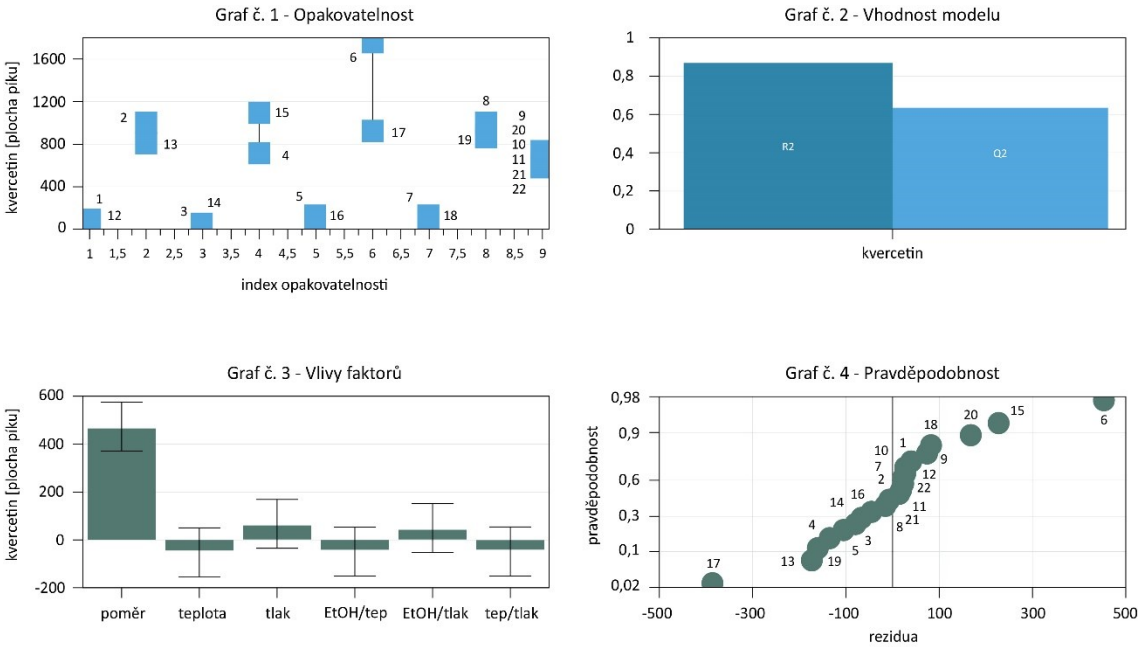
Po vyhodnocení zanalyzovaných extraktů byla data zpracována pomocí software MODDE. Obdobně jako u předchozích výsledků byly nejvyšší výtěžnosti *(tab. č. 3)*

Tabulka 3: *Plně faktoriální design experimentů – vstupní parametry a výstupní hodnoty v ng/0,5 g vzorku*

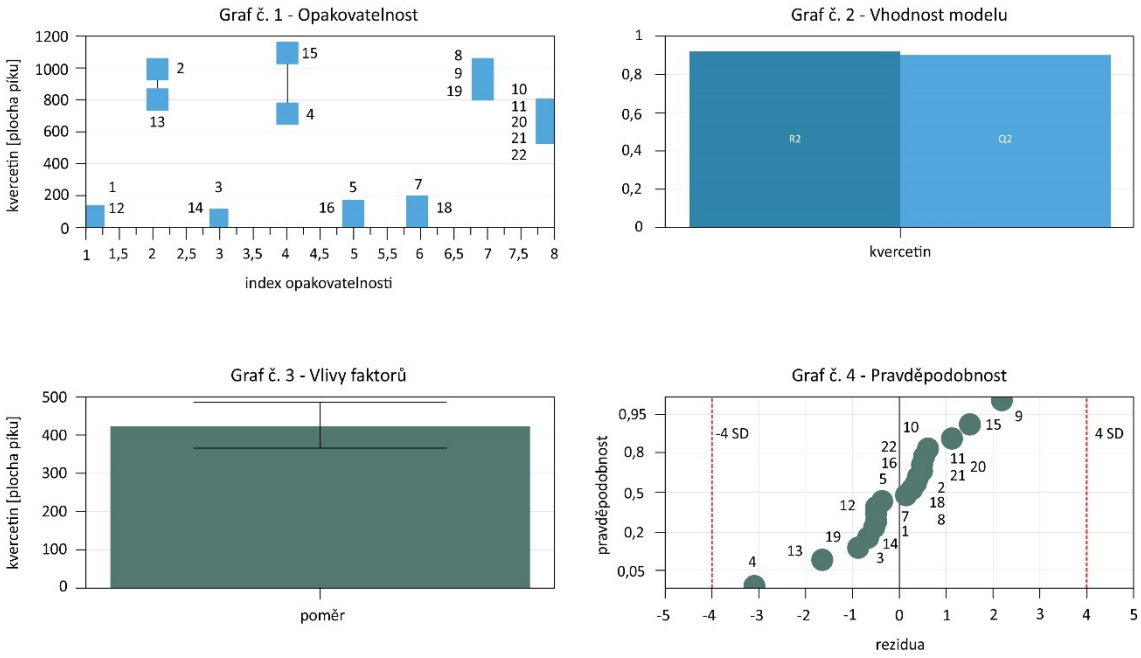
	EtOH [%]	obsah vody [%]	teplota [°C]	tlak [bar]	výtěžnost [ng/0,5 g]
N1	10	10	60	150	7,01
N2	90	10	60	150	99,81
N3	10	10	80	150	3,84
N4	90	10	80	150	70,79
N5	10	10	60	300	5,60
N6	90	10	60	300	175,64
N7	10	10	80	300	5,45
N8	90	10	80	300	99,14
N9	50	10	70	225	73,43
N10	50	10	70	225	59,35
N11	50	10	70	225	58,26
N12	10	10	60	150	5,69
N13	90	10	60	150	80,29
N14	10	10	80	150	5,15
N15	90	10	80	150	109,97
N16	10	10	60	300	11,88
N17	90	10	60	300	91,75
N18	10	10	80	300	13,19
N19	90	10	80	300	87,07
N20	50	10	70	225	64,76
N21	50	10	70	225	58,16
N22	50	10	70	225	58,67

pozorovány u extrakcí, kde bylo použito větší množství kosolventu. Nejnižší výtěžnosti v rozsahu 3,84–13,19 ng/0,5 g vzorku byly pozorovány při složení extrakčního rozpouštědla CO_2/ethanol + 10 % H_2O v poměru 90/10 (v/v). Naopak u poměru CO_2/ethanol + 10 % H_2O 10/90 (v/v) se pohybovaly v rozmezí 70,79–109,97 (175,64 ng/0,5 g vzorku – vzorek N6, který byl vyřazen). Poměr CO_2/ethanol + 10 % H_2O 50/50 (v/v) dosahoval výtěžností v hodnotách mezi předešlými dvěma poměry, a to hodnot v rozmezí 58,16–73,43 ng/0,5 g vzorku.

Z grafů zobrazujících statistické zpracování všech získaných dat na *obr. č. 19* je především z krabicových grafů vlivu faktorů patrné, že na výtěžnost extrakce má zásadní vliv poměr CO_2/kosolvent. Ostatní parametry, ani jejich interakce se nejeví jako významné. Obecně model vykazuje linearitu, dobrou opakovatelnost měření, predikovatelnost výsledků a validitu. Z důvodu velkého rozdílu výsledných hodnot koncentrací mezi vzorky N6 a N17, které byly extrahovány za stejných podmínek, byly tyto dva vzorky následně vyřazeny ze statistického hodnocení *(obr. č. 20)*. V porovnání s výsledky získanými analýzou všech dat došlo ke zlepšení validity, linearity i schopnosti predikovatelnosti výsledků.



Obrázek 19: *Plně faktoriální design experimentů*



Obrázek 20: *Plně faktoriální design experimentů (bez vzorků N6 a N17)*

5.1.3 Ověření zoptimalizovaných podmínek

Na základě předchozích dvou designů experimentů a jejich vyhodnocení bylo pomocí software MODDE vygenerováno několik podmínek, za kterých by mělo být dosaženo nejvyšší výtěžnosti extrakce. Souhrn těchto 12 metod je uveden v *tab. č. 4*. Všechny vzorky byly extrahovány kapalinou obohacenou oxidem uhličitým ve složení ethanol + 10 % H_2O / CO_2 v poměru 90/10 (v/v) za průtoku 2 mL/min po dobu 10 min. Rozmezí testovaných hodnot teploty a tlaku bylo 60–80 °C a 150–300 barů. Z důvodu velkého objemu získaného extraktu nebyla použita přídavná kapalina.

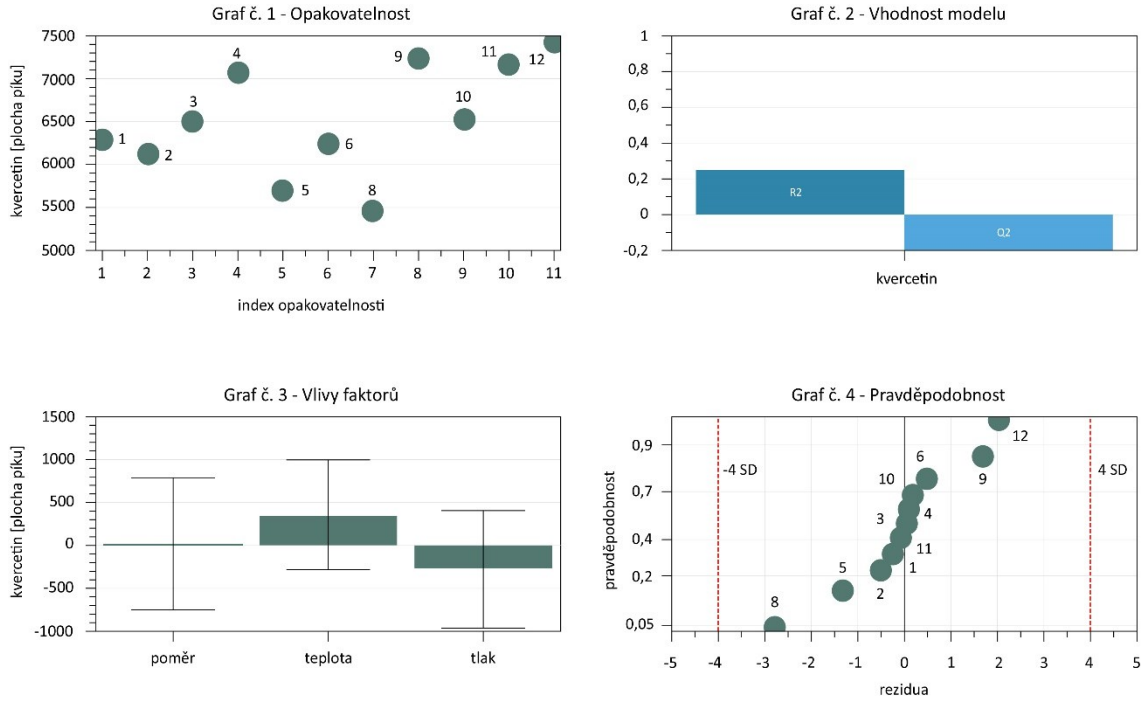
Tabulka 4: *Ověření zoptimalizovaných podmínek – vstupní parametry a výstupní hodnoty v ng/0,5 g vzorku*

	EtOH [%]	obsah vody [%]	teplota [°C]	tlak [bar]	výtěžnost [ng/0,5 g]
N1	90	10	65,9	223,3	62,88
N2	90	10	62,0	165,0	61,31
N3	90	10	79,2	259,0	65,10
N4	90	10	78,0	165,0	70,67
N5	90	10	70,6	294,7	56,90
N6	90	10	60,0	285,0	62,33
N7	90	10	79,6	299,1	87,08
N8	90	10	78,0	285,0	54,57
N9	90	10	70,2	255,8	72,41
N10	90	10	60,0	150,0	65,22
N11	90	10	80,0	150,0	71,58
N12	90	10	80,0	300,0	74,24

Na *obr. č. 21* vlevo je graficky znázorněna průměrná hodnota koncentrace kvercetinu spolu s chybovou úsečkou znázorňující směrodatnou odchylku. Průměrná výtěžnost činila 67,02 ng/0,5 g vzorku, směrodatná odchylka (SD) byla zanedbatelná a činila 8,81. Na *obr. č. 21* vpravo je poté graficky znázorněn rozdíl mezi minimální a maximální koncentrací kvercetinu, který byl také shledán zanedbatelným.

Obrázek 21: *Grafy znázorňující průměrnou hodnotu výtěžnosti a rozdíl mezi minimální a maximální výtěžností*

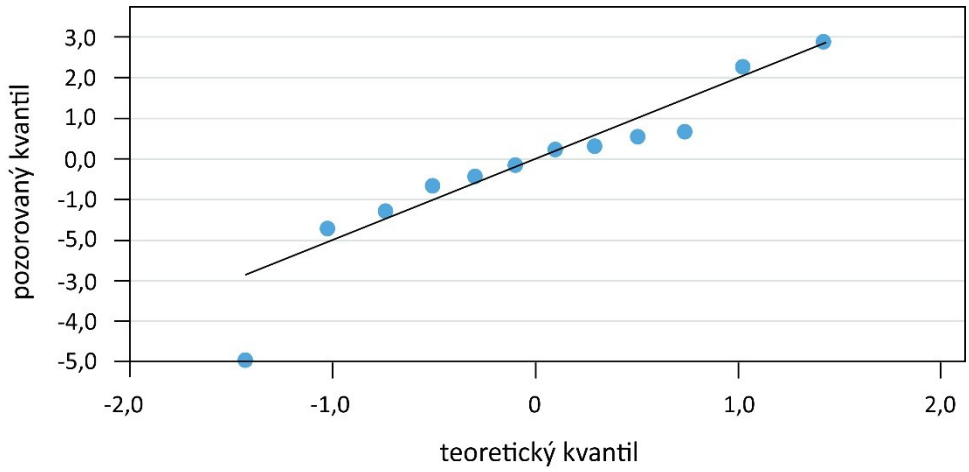
Na obr. č. 22 jsou znázorněny statistické údaje v grafické formě pro potvrzení, že ve výsledném modelu není žádný faktor, který by model významně ovlivnil. V případě, že by se nějaký trend našel, jednalo by se o negativní výsledek. Z toho důvodu lze kladně hodnotit R2 a Q2, které již nevykazují variabilitu ani predikovatelnost.



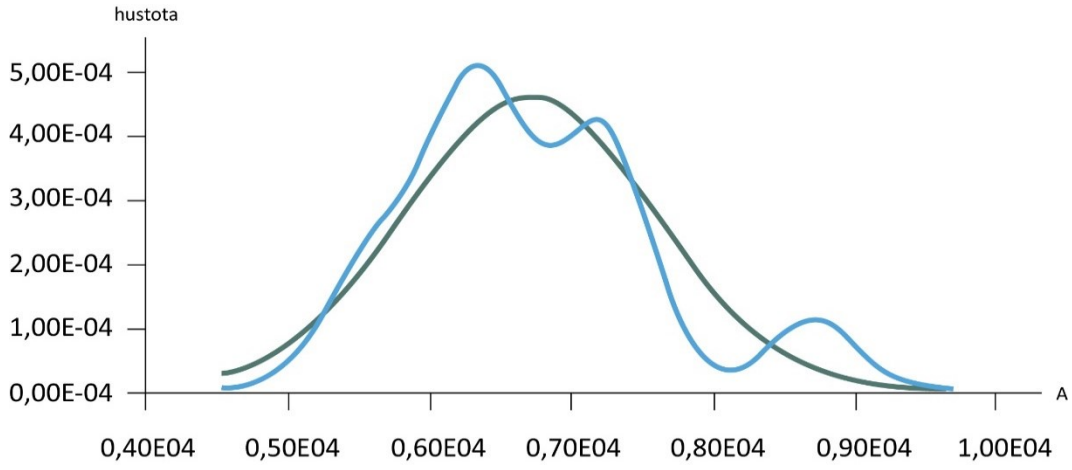
Obrázek 22: *Ověření zoptimalizovaných podmínek*

Prostřednictvím programu QCExpert byla ještě zkontrolována vhodnost vyšlých dat. Při zvolené hladině významnosti 0,05 byla naměřená data nezávislá. Test významnosti trendu je nevýznamný, v datech nebyl nalezen žádný trend. Pomocí testů normality byla prokázána normalita dat, grafické znázornění je vidět na *obr. č. 23, 24, 25.*

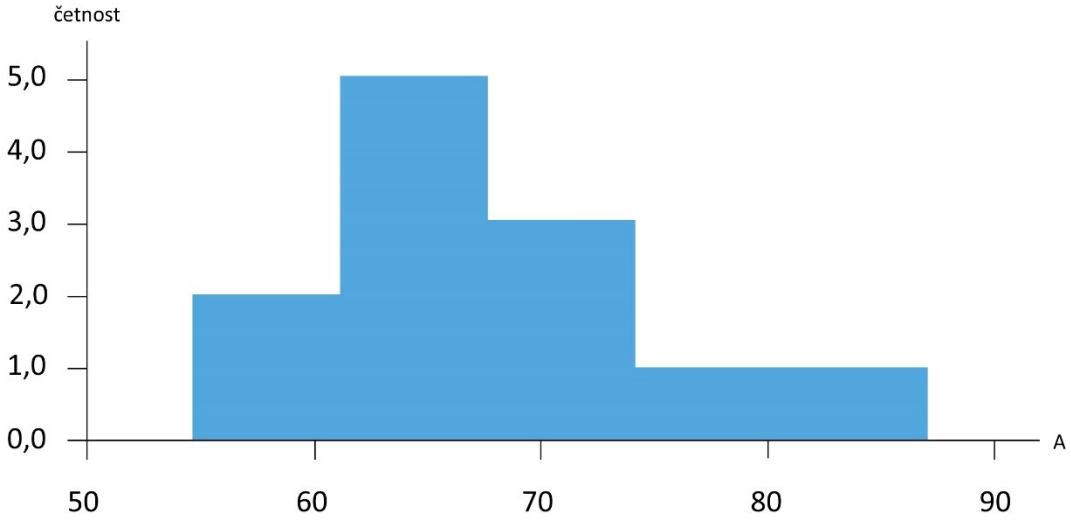
Z vypočítaných reálných koncentrací a porovnání výsledků bylo potvrzeno, že parametry teplota a tlak mají zanedbatelný vliv na výtěžnost. Z toho důvodu byly nakonec stanoveny podmínky extrakce jako střední hodnoty těchto parametrů, kterých se na instrumentaci dobře dosahovalo a které instrumentaci zbytečně příliš nezatěžovaly. Podmínky extrakce byly stanoveny následovně – teplota 66 °C, tlak 223 bar, rozpouštědlo pro extrakci CO_2/ethanol + 10 % H_2O (10/90, v/v).



Obrázek 23: *Normální rozdělení reziduí potvrzené Jarque-Berrův testem. Úsečka znázorňuje optimální rozdělení, modré body představují zpracovaná data a jejich reálné rozdělení.*



Obrázek 24: *Graf znázorňující ideální rozdělení (zelená křivka) a reálné rozdělení výsledných dat (modrá křivka)*



Obrázek 25: *Histogram – reálné rozložení dat*

5.2 Kinetika extrakce

Dalším krokem optimalizace SFE metody byla optimalizace průtokové rychlosti extrakčního činidla a stanovení času extrakce. Extrakce probíhala za následujících podmínek – poměr CO_2/ethanol + 10 % H_2O v poměru 10/90 (v/v), teplota 66 °C, tlak 223 bar. Testovány byly průtokové rychlosti 2, 3, 4, 5 mL/min, kdy za dané průtokové rychlosti byly provedeny tři měření. Doba extrakce byla 60 min. Extrakt se odebíral v pravidelných časových intervalech – 5, 10, 15, 30, 45, 60 min do jímacích baněk, jeho objem se změřil a část extraktu byla uchovávána pro následnou UHPLC-MS/MS analýzu.

Ze získaných ploch píků byly zjištěny reálné koncentrace v jednotlivých časech odběru *(tab. č. 5).* Hodnoty koncentrací se u každé trojice měření, které probíhaly za stejné průtokové rychlosti, zprůměrovaly, byla vypočítána směrodatná odchylka (SD), relativní směrodatná odchylka (RSD) *(tab. č. 6)* a pro snadnější interpretaci výsledků byly sestrojeny grafy *(obr. č. 26–27).*

Z výsledků je patrné, že výtěžnost extrakce se po 30 min již významně nezvyšovala *(obr. č. 26)*. Za použití průtokové rychlosti 2 mL/min bylo dosaženo nejnižší výtěžnosti (145,44 ng/0,5 g vzorku, RSD 32,59 %). V případě průtokové rychlosti 5 mL/min nebyla výtěžnost významně vyšší (153,95 ng/0,5 g vzorku, RSD 30,85 %). Zároveň odchylky mezi třemi extrakcemi u obou zmíněných průtokových rychlostí byly velmi výrazné. Extrakce za průtokové rychlosti 3 a 4 mL/min poskytovaly velmi podobné výtěžnosti (159,60 ng/0,5 g vzorku a 165,85 ng/0,5 g vzorku) s uspokojivými hodnotami

RSD (12,66 % a 9,77 %). V porovnání času extrakce bylo vyšší výtěžnosti v kratším čase 30 min dosaženo za použití průtokové rychlosti 3 mL/min a zároveň bylo spotřebováno menší množství rozpouštědla (90 mL oproti 120 mL za 30 min extrakce), proto byla nakonec tato hodnota vybrána jako finální.

Tabulka 5: *Reálná koncentrace vzorků v jednotlivých odběrových časech extrakce*

	čas [min]	**5**	**10**	**15**	**30**	**45**	**60**
N2(1)		67,27	86,52	102,11	174,88	177,56	183,17
N2(2)		51,57	64,46	84,10	91,36	98,54	102,91
N2(3)		52,42	71,86	82,25	170,08	178,73	186,71
N3(1)		54,61	127,41	140,00	151,30	162,10	174,17
N3(2)		65,28	128,51	135,48	142,72	149,95	161,90
N3(3)	**c [ng/ml]**	84,21	158,23	165,60	184,79	190,85	201,39
N4(1)		79,45	111,29	124,14	150,92	168,62	181,53
N4(2)		82,62	109,96	122,32	135,50	148,25	165,68
N4(3)		68,91	118,95	134,63	162,13	180,69	198,09
N5(1)		85,94	149,98	164,79	196,47	221,41	265,44
N5(2)		99,05	121,63	132,15	146,25	180,68	202,15
N5(3)		68,99	84,96	99,44	119,11	149,56	172,45

Tabulka 6: *Průměrné hodnoty koncentrací vzorků v časech odběrů za daných průtokových rychlostí; SD; RSD*

Koncentrace [ng/ml]

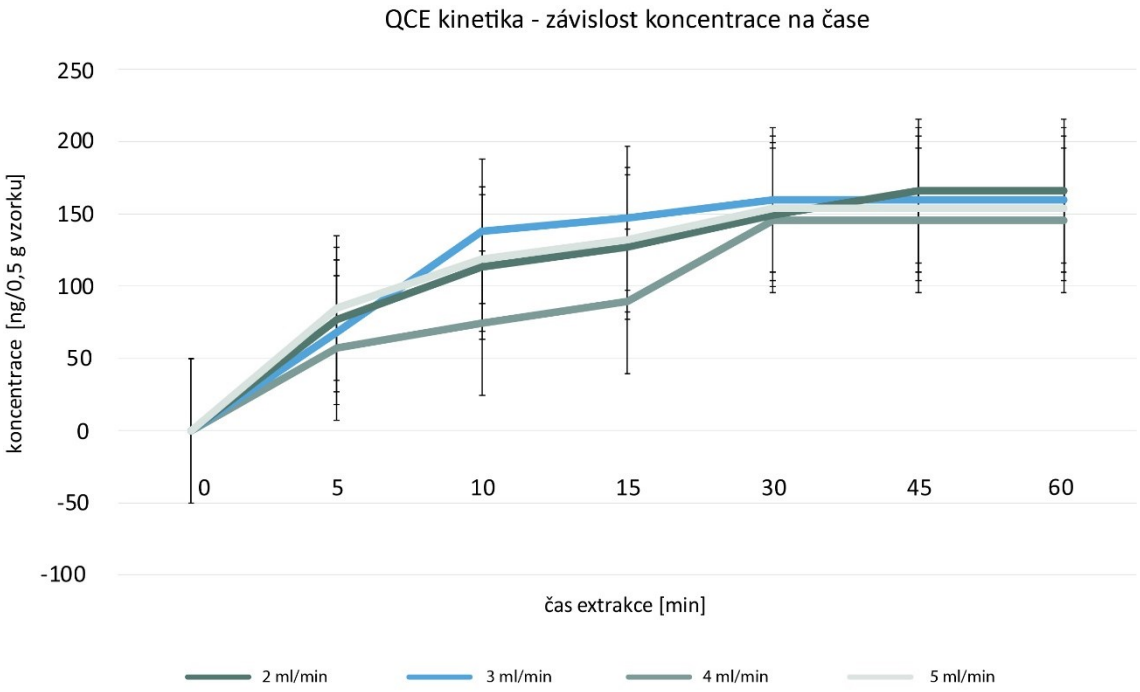
čas	**5**	**10**	**15**	**30**	**45**	**60**
2ml/min	57,08	74,28	89,49	145,44	145,44	145,44
3ml/min	68,03	138,05	147,03	159,60	159,60	159,60
4ml/min	77,00	113,40	127,03	149,52	165,85	165,85
5ml/min	84,66	118,86	132,13	153,95	153,95	153,95

SD

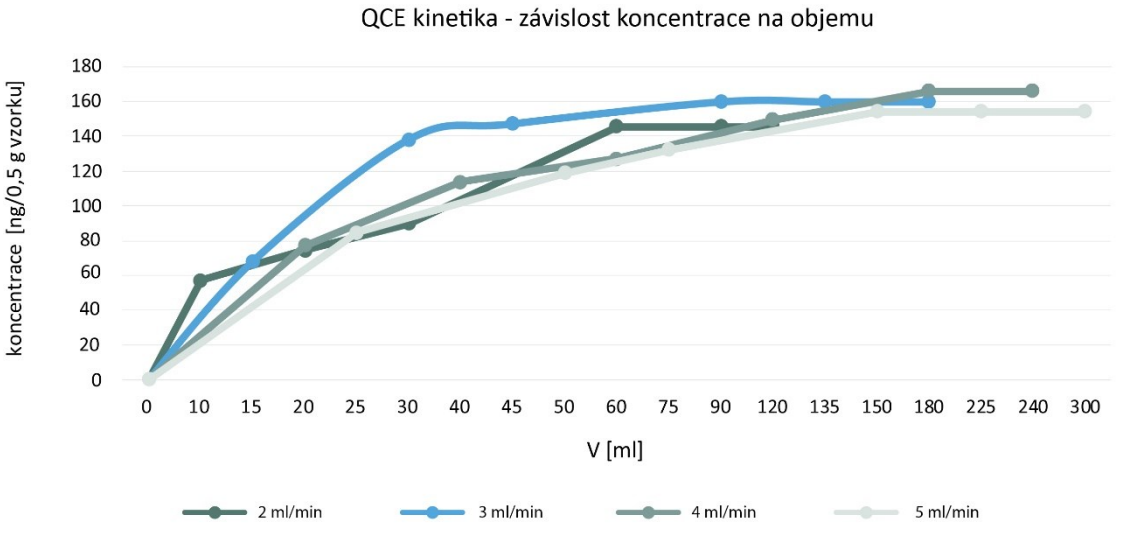
čas	**5**	**10**	**15**	**30**	**45**	**60**
2ml/min	8,83	11,23	10,97	46,90	45,96	47,39
3ml/min	14,99	17,48	16,25	22,23	21,00	20,21
4ml/min	7,18	4,85	6,65	13,37	16,40	16,21
5ml/min	15,07	32,60	32,68	39,25	36,03	47,49

RSD [%]

čas	**5**	**10**	**15**	**30**	**45**	**60**
2ml/min	15,47	15,12	12,26	32,25	31,60	32,59
3ml/min	22,03	12,66	11,05	13,93	13,16	12,66
4ml/min	9,32	4,28	5,23	8,94	9,89	9,77
5ml/min	17,80	27,43	24,73	25,49	23,41	30,85



Obrázek 26: *Graf závislosti koncentrace QCE na čase extrakce*



Obrázek 27: *Graf závislosti koncentrace QCE na spotřebě rozpouštědla*

5.3 Finální optimalizace

5.3.1 Vliv velikosti kuliček v extrakční cele na výtěžnost extrakce

Výtěžnost extrakce může být také ovlivněna velikostí skleněných kuliček, kterými je doplňováno množství vzorku v extrakční cele. Kuličky a prostory mezi nimi mohou způsobovat změny v proudění extrakční tekutiny, a tak ovlivňovat kontakt extrakční kapaliny se vzorkem. Proto bylo poslední součástí optimalizace ověření vlivu velikosti, respektive průměru kuliček, na výtěžnost kvercetinu. Byl zkoumán vliv kuliček o průměru 2, 3, 5 mm. Pro každý rozměr kuliček byly provedeny dvě extrakce. Stejně jako v předchozích optimalizačních experimentech byla doba extrakce 10 min a ostatní parametry byly nastaveny dle výsledků optimalizace.

Po zprůměrování dvou měření *(tab. č. 7)*, která probíhala s kuličkami o stejném průměru, bylo zjištěno, že nejlepší výtěžnost vychází u kuliček o velikosti 2 mm, kdy bylo dosaženo koncentrace 73,15 ng/0,5 g. Kuličky využívané po celou dobu v předchozích měřeních, tedy kuličky o velikosti 3 mm vykazovaly nejnižší výtěžnost (65,12 ng/0,5 g). U největších kuliček, 5 mm kuliček, byl shledán velký rozdíl mezi dvěma měřeními, což dokazují hodnoty SD (23,69) a RSD (32,51 %). Z toho důvodu tyto hodnoty nelze považovat za signifikantní.

Tabulka 7: *Výstupní hodnoty měření zjišťující vliv velikosti kuliček na výtěžnost extrakce.*

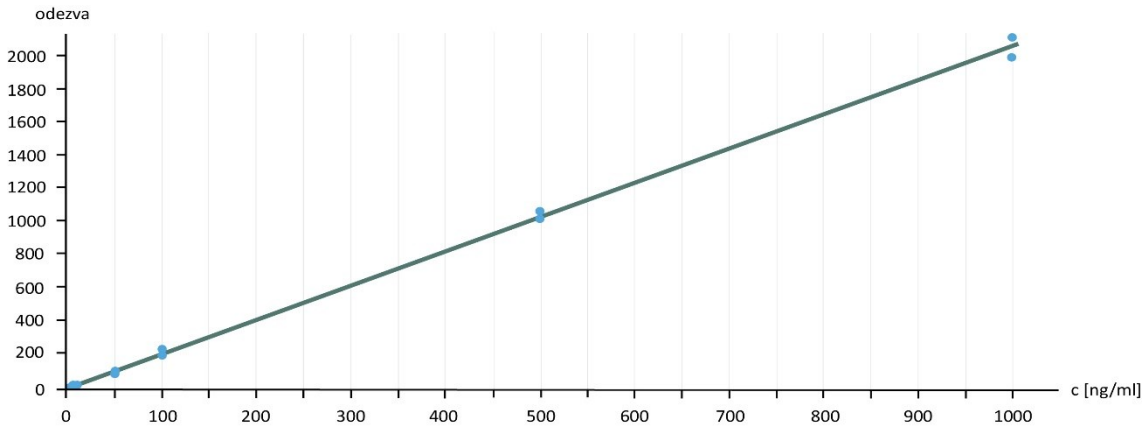
	průměr [mm]	A	V extraktu [ml]	c [ng/ml]	x [ng/ml]	SD	RSD [%]
N1	2	262,42	16,00	75,53	73,15	3,37	4,61
N2	2	228,03	17,25	70,76			
N3	3	214,5	16,25	62,71	65,12	3,42	5,25
N4	3	227,55	16,50	67,54			
N5	5	288,79	17,25	89,62	72,87	23,69	32,51
N6	5	201,24	15,50	56,11			

5.3.2 Finální podmínky a opakovatelnost extrakce

Pro zjištění vhodnosti optimalizované metody bylo důležitým krokem potvrzení opakovatelnosti měření za stanovených finálních podmínek. Měření proběhlo ve třech po sobě jdoucích dnech, kdy v každém dni byly extrahovány tři vzorky. Výsledky byly vyhodnoceny metodou standardní kalibrační přímky *(obr. č. 28).* Získané hodnoty výtěžnosti jsou zaznamenány v *tab. č. 8*. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 147,8 ng/0,5 g vzorku a odchylka RSD byla 20,82 %.

Tabulka 8: *Opakovatelnost extrakce – vstupní parametry a výstupní hodnoty v ng/0,5 g vzorku.*

	EtOH [%]	obsah vody [%]	teplota [°C]	tlak [bar]	V extraktu [ml]	výtěžnost [ng/0,5 g]
N1	90	10	66	223	80,0	197,2
N2	90	10	66	223	80,0	138,0
N3	90	10	66	223	80,0	155,2
N4	90	10	66	223	80,0	177,2
N5	90	10	66	223	80,0	129,6
N6	90	10	66	223	80,0	130,0
N7	90	10	66	223	80,0	136,8
N8	90	10	66	223	79,5	137,1
N9	90	10	66	223	81,0	123,5



Obrázek 28: *Kalibrační přímka: QCE, SRM1 přechod. Korelační koeficient r = 0,998965; r^2 = 0,997931.*

5.4 Aplikace metody na rostlinné vzorky s obsahem kvercetinu

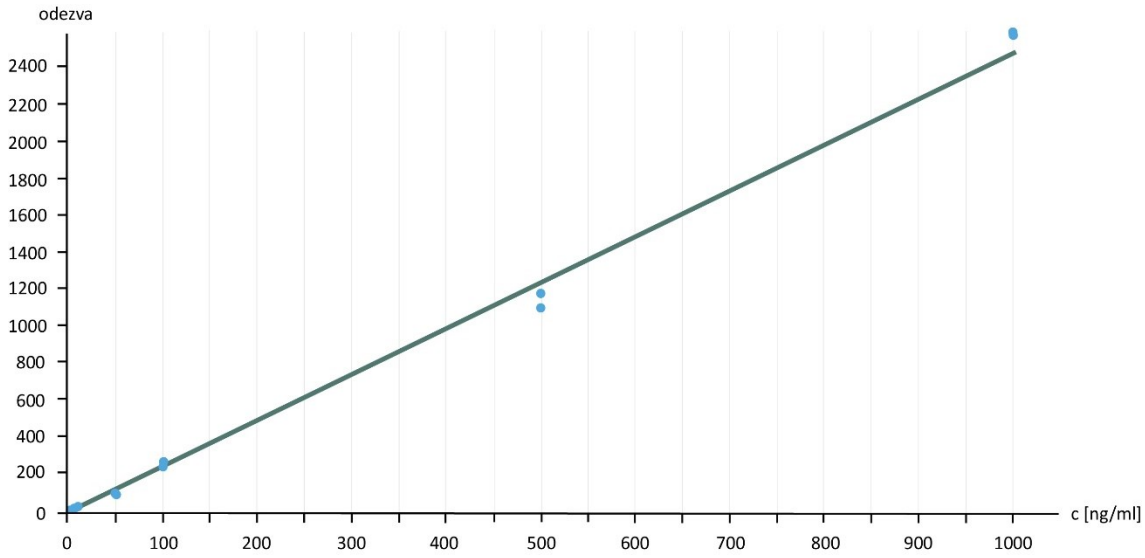
Na základě spolupráce s Univerzitou Palackého v Olomouci a Výzkumným centrem pro růst rostlin Univerzity of KwaZulu-Natal Pietermaritzburg v Jihoafrické republice byla finální zoptimalizovaná metoda SFE použita pro extrakci dalšího rostlinného materiálu, u kterého byl předpokládán obsah kvercetinu. Cílem analýzy bylo stanovení obsahu kvercetinu v daných rostlinách. Seznam rostlin je uveden v *tab. č. 9*. Z velké většiny se jedná o lokální subtropické cibulnaté rostliny, které se vyskytují převážně v Jižní Africe. Zároveň s nimi byl zaslán i nový vzorek kdoule. Všechny rostliny byly zaslány ve vysušené formě, kdy kromě kdouloně (plod) a kigelie africké (plod) se jednalo o vysušené cibule *(obr. č. 29)*.

Tabulka 9: *Seznam rostlin a jejich dodané množství.*

	latinský název	český název	dodané množství [g]
1	***Ornithogalum longibracteatum***	Snědek ocasatý	0,6300
2	***Merwilla natalensis***	-	2,0926
3	***Bulbine natalensis***	-	0,7653
4	***Scadoxus puniceus***	Krvokvět	3,1537
5	***Drimia robusta/elata***	Drimie (Urginea)	1,0045
6	***Eucomis pole-evansii***	Chocholatice	1,5574
7	***Albuca nelsonii***	-	0,9842
8	***Tulbaghia violacea***	Česnek pokojový	1,5432
9	***Boophone haemanthoides***	-	0,8253
10	***Bowiea volubilis***	-	1,4181
11	***Cyrtanthus***	Cyrtantus	1,0363
12	***Haemanthus***	Bělokvět	1,4578
13	***Clivia miniata***	Řemenatka červená	1,9998
14	***Agapanthus africanus***	Kalokvět africký	0,6178
15	***Kigelia africana***	Kigelie africká	1,4532
16	***Allium cepa***	Cibule kuchyňská	1,0546
17	***Cydonia oblonga***	Kdouloň obecná	1,8946

Obrázek 29: *Fotky dodaného rostlinného materiálu ve vysušené formě před drcením a homogenizací*

Usušené rostliny se nadrtily a zhomogenizovaly, bylo zjištěno jejich dodané množství a stanoven počet extrakcí, který půjde z daného množství uskutečnit. Jednalo se buď o jednu extrakci nebo o extrakce dvě. Extrakty byly upraveny a podobně jako v předchozích analýzách nastřikovány na kolonu dvakrát. Kvantifikace množství kvercetinu ve vzorcích byla provedena metodou kalibrační přímky, kdy se pro její získání proměřila řada standardních roztoků kvercetinu o koncentracích 5, 10, 50, 100, 500, 1000 ng/mL *(obr. č. 30).* Limit detekce stanovený na základě kalibrační přímky byl 5 ng/mL. Hodnoty koncentrací u stejných vzorků se zprůměrovaly a vypočetly se reálné koncentrace.



Obrázek 30: *Kalibrační přímka: QCE, SRM1 přechod. Korelační koeficient r = 0,997378; r^2 = 0,994762.*

Na základě detekovaného a stanoveného množství kvercetinu je možné vzorky rozdělit na následující skupiny. První skupinou jsou vzorky, u kterých nebyl kvercetin detekován, jeho množství ve vzorku bylo nižší než námi určená LOD. Druhou skupinou jsou vzorky, u kterých se hladina kvercetinu pohybovala okolo LOD s S/N = 3, kdy byl kvercetin detekován, ale nebyl kvantifikován. Poslední skupinou vzorků jsou ty vzorky, kde se hladina kvercetinu pohybovala okolo LOQ a výše a kvercetin bylo možné kvantifikovat. Stanovená koncentrace kvercetinu ve vzorcích je shrnuta v *tab. č. 10*.

Z celkových sedmnácti vzorků byl ve třinácti detekován či kvantifikován kvercetin. Třináct rostlin, v jejichž extraktech byl detekován signifikantní signál odpovídající kvercetinu, jsou prezentovány prostřednictvím vyexportovaných chromatogramů na *obr. č. 31–37.*

Tabulka 10: *Výtěžnost kvercetinu v rostlinných vzorcích.*
N/A – kvercetin nedetekován, LOD – kvercetin nekvantifikován

	latinský název	český název	stanovené množství [ng/0,5 g vzorku]
1	***Ornithogalum longibracteatum***	Snědek ocasatý	69,0
2	***Merwilla natalensis***	-	178,6
3	***Bulbine natalensis***	-	909,8
4	***Scadoxus puniceus***	Krvokvět	200,0
5	***Drimia robusta/elata***	Drimie (Urginea)	216,1
6	***Eucomis pole-evansii***	Chocholatice	379,4
7	***Albuca nelsonii***	-	N/A
8	***Tulbaghia violacea***	Česnek pokojový	LOD
9	***Boophone haemanthoides***	-	50,9
10	***Bowiea volubilis***	-	11,2
11	***Cyrtanthus***	Cyrtantus	LOD
12	***Haemanthus***	Bělokvět	13,3
13	***Clivia miniata***	Řemenatka červená	N/A
14	***Agapanthus africanus***	Kalokvět africký	16 416,4
15	***Kigelia africana***	Kigelie africká	54,1
16	***Allium cepa***	Cibule kuchyňská	5 096,7
17	***Cydonia oblonga***	Kdouloň obecná	862,9

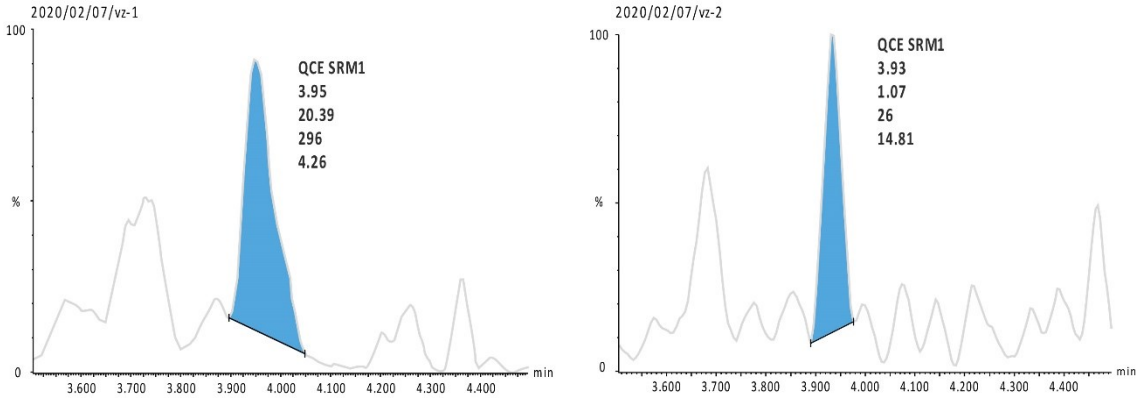
Nejvyšší obsah kvercetinu, a to značně vyšší než u ostatních vzorků, byl zjištěn u cibule z rostliny *Agapanthus africanus* (kalokvět africký). Výtěžnost činila 16 416,4 ng/0,5g vzorku. V porovnání s výtěžky kvercetinu z kdoule, které byly prezentovány v předchozích kapitolách, se jedná až o stokrát vyšší množství. V porovnání s kdoulí, která byla extrahována nyní, se však jednalo o dvacetkrát vyšší výtěžnost, která činila 862,9 ng/0,5 g vzorku. Důvodem může být fakt, že se jedná o nový materiál oproti původní kdouli, se kterou se pracovalo po dobu jednoho roku.

Kalokvět africký je rostlina, která je původem podobně jako většina extrahovaných rostlin z Jižní Afriky, avšak lze ji již nalézt jako okrasnou květinu na našem území. Tradičně byla využívána v subtropech jako fytofarmakum pro léčbu onemocnění spojených s těhotenstvím a používána k vyvolávání porodu. Její vodné extrakty z listů byly např. testovány na krysách a byl u nich prokázán agonistický vliv na muskarinové

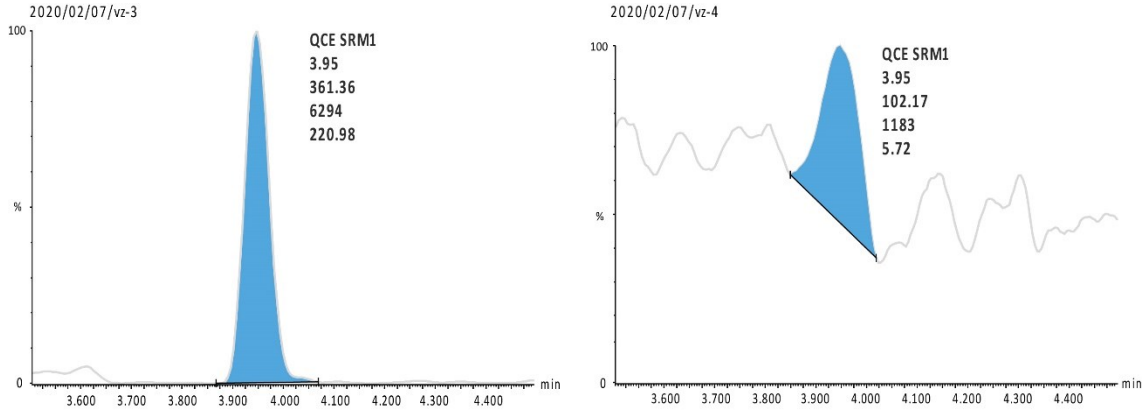
receptory v děloze, a tím spuštění syntézy prostaglandinů. Jiné zdroje uvádějí, že má kalokvět vliv na onemocnění kardiovaskulárního systému, což by mohlo mít spojitost s antioxidační aktivitou kvercetinu [39] [40].

Druhý nejvyšší obsah kvercetinu (5096,7 ng/0,5g vzorku) byl shledán u *Allium cepa* (cibule kuchyňská), což nebylo překvapivým zjištěním, jelikož cibule je známa svým obsahem kvercetinu. Výtěžnost 909,8 ng/0,5 g vzorku byla zjištěna u cibule *Bulbine natalensis*, rostliny, která je také tradiční jihoafrickou bylinou s antidiabetickými, antirevmatickými a antikonvulzivními vlastnostmi, využívána dále jako afrodisiakum, srdeční stimulátor či ke snadnějšímu hojení ran. [41].

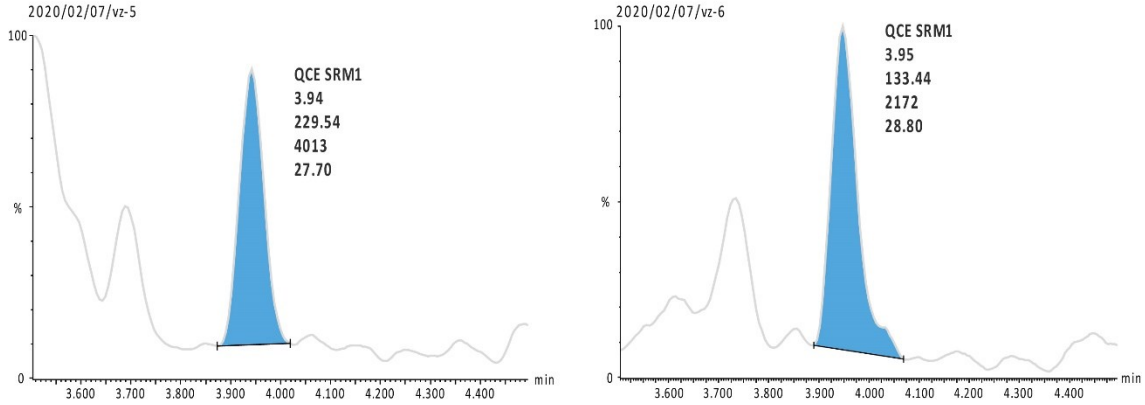
U čtyř rostlin nebyl nalezen signifikantní nález přítomnosti kvercetinu, jednalo se o rostliny – *Albuca nelsonii (obr. č. 37), Tulbaghia violacea, Cyrtanthus a Clivia miniata*.



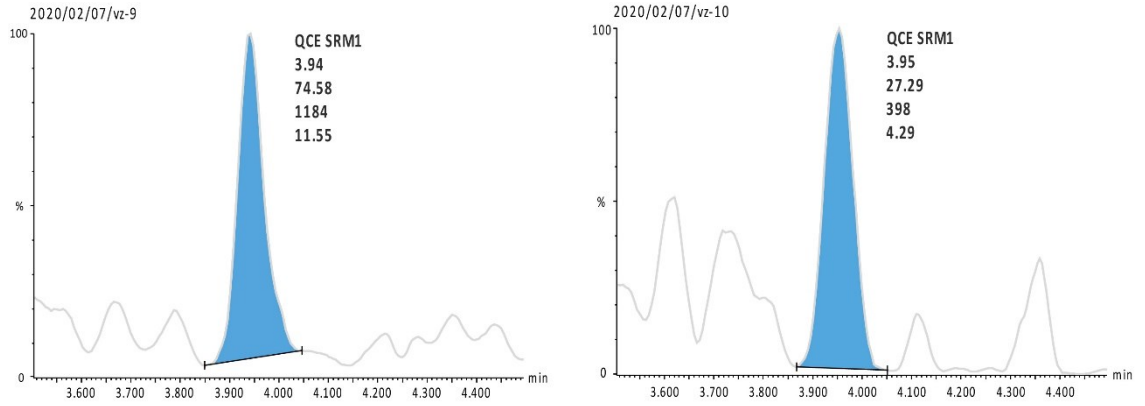
Obrázek 31: *Chromatogramy vzorků N1: Ornithogalum longibracteatum a N2: Merwilla natalensis*



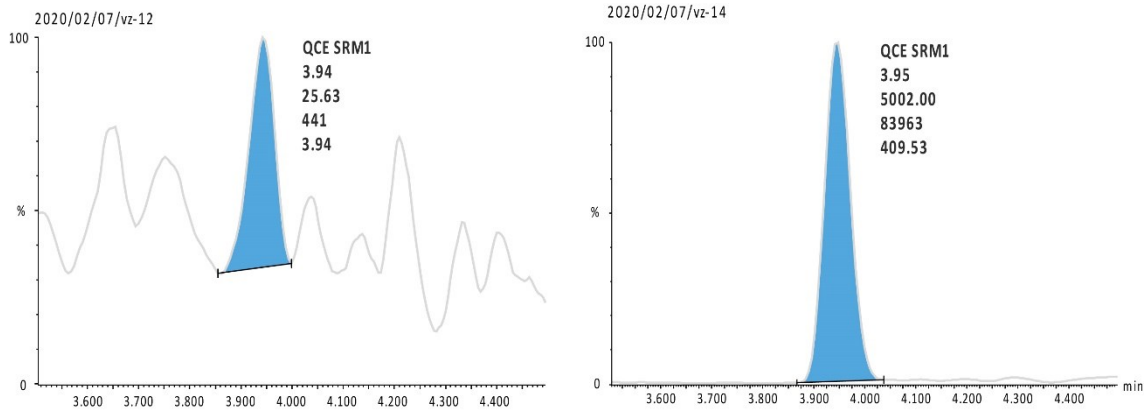
Obrázek 32: *Chromatogramy vzorků N3: Bulbine natalensis a N4: Scadoxus puniceus*



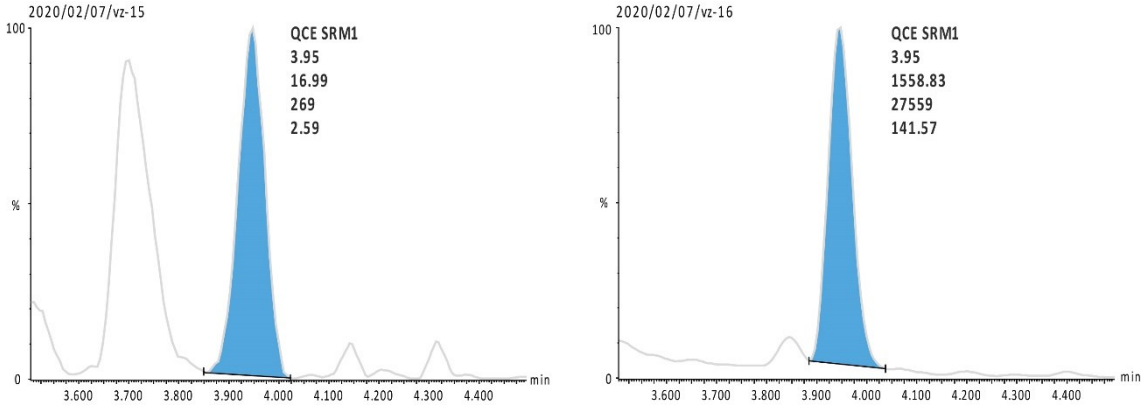
Obrázek 33: *Chromatogramy vzorků N5: Drimia robusta/elata a N6: Eucomis pole-evansii*



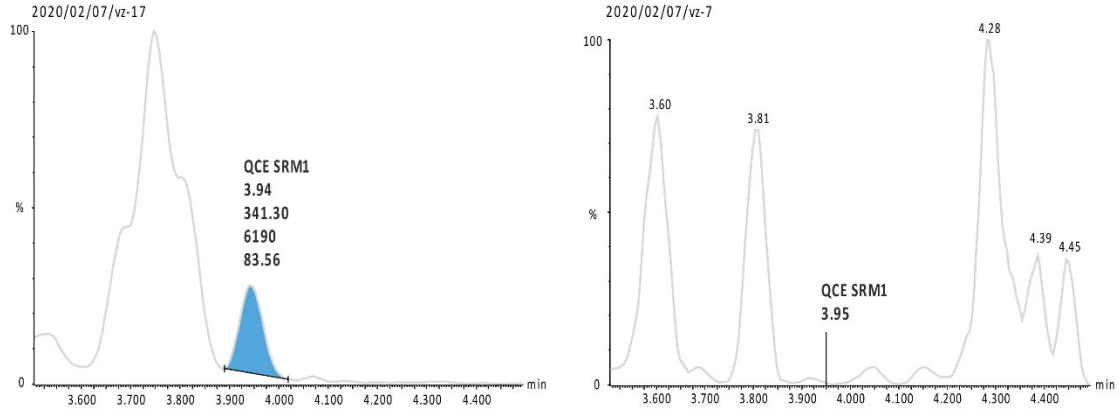
Obrázek 34: *Chromatogramy vzorků N9: Boophone haemanthoides a N10: Bowiea volubilis*



Obrázek 35: *Chromatogramy vzorků N12: Haemanthus a N14: Agapanthus africanus*



Obrázek 36: *Chromatogramy vzorků N15: Kigelia africana a N16: Allium cepa*



Obrázek 37: *Chromatogramy vzorků N17: Cydonia oblonga a N7: Albuca nelsonii – chromatogram přidán na ukázku vzorku, ve kterém nebyl nalezen žádný kvercetin*

6 Závěr

Byla vyvinuta extrakční metoda využívající SFE instrumentaci, jejímž účelem je extrakce kvercetinu ze sušeného rostlinného materiálu. Dle předem stanovených cílů došlo k optimalizaci metody tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší výtěžnosti kvercetinu z kdoule a aby byla zachována ekologičnost metody oproti jiným konvenčním technologiím extrakce. Mezi výhody zoptimalizované metody patří zejména možnost používání rozpouštědel šetrných k životnímu prostředí (recyklovatelný CO_2 a ethanol s vodou), krátká doba extrakce, malá spotřeba rozpouštědla, hodnoty tlaků a teploty, kterých se na instrumentaci snadno dosahuje, a potřeba malého množství sušeného rostlinného materiálu pro přípravu vzorku.

Z důvodu poměrně vysoké polarity struktury kvercetinu extrakce neprobíhaly v nadkritickém stavu za použití scCO_2 jako běžné SFE, ale docházelo k extrakcím za použití tekutiny obohacené oxidem uhličitým (CXLE). Předpokládalo se a nakonec bylo potvrzeno experimentální studií, že tlak a teplota nemají na výtěžnost extrakce tak zásadní vliv, jako by měly, kdyby se jednalo právě o extrakce za použití samotného oxidu uhličitého v nadkritickém stavu. Nejzásadnější vliv na výtěžnost extrakce byl shledán ve složení rozpouštědla. Nejlepší výtěžnost poskytoval přídavek 90 % kosolventu, extrakční rozpouštědlo bylo nakonec tvořeno směsí CO_2/ethanol + 10 % H_2O (10/90, v/v).

Finální podmínky optimalizace extrakce kvercetinu byly stanoveny následovně: doba extrakce – 30 min, průtoková rychlost – 3 mL/min, teplota – 66 °C, tlak – 223 bar, rozpouštědlo pro extrakci – CO_2/ethanol + 10 % H_2O (10/90, v/v), 2 mm skleněné kuličky pro doplnění objemu extrakční cely. Zároveň byla ověřena opakovatelnost metody (147,8 ng/0,5 g vzorku, RSD 20,82 %).

Vyvinutá metoda umožní stanovit množství kvercetinu v různých rostlinných materiálech, jako jsou cibule a plody, ve velmi krátkém čase, jak bylo dokázáno aplikací na vzorky rostlin původem z Jihoafrické republiky.

7 Seznam použité literatury

[1] https://www.zahradaweb.cz/kdoule-mene-rozsireny-druh-ovoce/
přístup získán dne: 4. 9. 2019

[2] L. Jahodář, Farmakobotanika: Semenné rostliny, Karolinum, 2012, s. 107–108.

[3] A. Radović, D. Nikolić, D. Milatović, V. Rakonjac, I. Bakić, Growth and yield characteristics of quince cultivars, Acta horticulturae, 1139 (2016) 209–212.

[4] S. Sut, S. Dall'Acqua, G. Poloniato, F. Maggic, M. Malagolia, Preliminary evaluation of quince (Cydonia oblonga Mill.) fruit as extraction source of antioxidant phytoconstituents for nutraceutical and functional food applications, Journal of the Science of Food and Agriculture, 99 (2019) 1046–1054.

[5] B.M. Silva, P.B. Andrade, R.C. Martins, P. Valentao, F. Ferreres, R.M. Seabra, M.A. Ferreira, Quince (Cydonia oblonga Miller) fruit characterization using principal component analysis, J. Agric. Food Chem., 53 (2005) 111–122.

[6] B.T. Stojanovic, S.S. Mitíc, G.S. Stojanovic, M.N. Mitic, D.A. Kostic, D.Đ. Paunovic, B.B. Arsic, A.N. Pavlovic, Phenolic profiles and metal ions analyses of pulp and peel of fruits and seeds of quince (Cydonia oblonga Mill.), Food chemistry, 232 (2017) 466–475.

[7] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin?fbclid=IwAR3u_Ioq1N9Tlctxlg8H4LwOFGED74WshMKpKN76Ei6IJU0v2UbYTnf5-Fc
přístup získán dne: 6. 9. 2019

[8] W. Wang, C. Sun, L. Mao, P. Ma, F. Liu, J. Yang, Y. Gao, The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin, Trends in Food Science & Technology, 56 (2016) 21–38.

[9] P.M. Coates, M.R. Blackman, G.M. Cragg, M. Levine, J. Moss, J.D. White, Encyclopedia of Dietary Supplements, Marcel Dekker, New York, 2005, s. 579.

[10] R.P.F.F. da Silva, T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Supercritical fluid extraction of bioactive compounds, Trends in Analytical Chemistry, 76 (2016) 40–51.

[11] http://tresen.vscht.cz/kot/wp-content/uploads/2010/01/SFE_2014-podklady-3x2.pdf
přístup získán dne: 9. 9. 2019

[12] L.P. Cunico, Ch. Turner, Supercritical Fluids and Gas-Expanded Liquids, The Application of Green Solvents in Separation Processes, Lund University, Lund, Sweden, 2017, s. 155–159.

[13] V. Abrahamsson, Fundamental research on supercritical fluid extraction kinetics: From on-line measurements to inverse modeling, Lund University, Lund, Sweden, 2016, s. 9–27.

[14] V. Pilařová, S. Al Hamimi, L.P. Cunico, L. Nováková, Ch. Turner, Extending the design space in solvent extraction – from supercritical fluids to pressurized liquids using carbon dioxide, ethanol, ethyl lactate, and water in a wide range of proportions, Green Chemistry, 21 (2019) 5427–5436.

[15] A.J. Hunt, T.M. Attard, Supercritical and Other Highpressure Solvent Systems For Extraction, Reaction and Material Processing, Velká Británie, 2018, s. 512–519.

[16] R.C. Martínez, E.R. Gonzalo, P.R. Ruiz, J.H. Méndez, Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples, Journal of Chromatography A, 1089 (2015) 1–17.

[17] https://www.youtube.com/watch?v=LQfVJ0MvqEo
přístup získán dne: 10. 9. 2019

[18] https://www.waters.com/waters/en_US/SFE-extractionequipment/nav.htm?cid=134614431&locale=en_US
přístup získán dne: 10. 9. 2019

[19] M.M.R. de Melo, I. Portugal, A.J.D. Silvestre, C.M. Silva, Chapter 11 - Environmentally Benign Supercritical Fluid Extraction, The Application of Green Solvents in Separation Processes, Elsevier, Nizozemsko, 2017, 325–348.

[20] P. G. Jessop, B. Subramaniam, Chemical Reviews, 107 (2007) 2666–2694.

[21] Calista, M.S. Tjipto, J.N. Putro, A.T. Nugraha, F.E. Soetaredjo, Y.H. Ju, Ismadji, Suryadi, Supercritical CO_2 extraction of bioactive compounds from Stachytarpheta jamaicensis (L) Vahl, International Food Research Journal, 23 (2016) 2144–2150.

[22] E.D. Stojkovic, Z. Zdravkovski, Supercritical Fluid Extraction of Quercetin and Rutin from Hyperici Herba, Journal of liquid chromatography & related technologies, 15 (2003) 2517–2533.

[23] A.M. Farias-Campomanes, M.A. Rostagno, M.A.A. Meireles, Production of polyphenol extracts from grape bagasse using supercritical fluids: Yield, extract composition and economic evaluation, The Journal of Supercritical Fluids, 77 (2013) 70–78.

[24] S.M. Ghoreishi, A. Hedayati, S.O. Mousavi, Quercetin extraction from Rosa damascena Mill via supercritical CO_2: Neural network and adaptive neuro fuzzy interface system

modelingand response surface optimization, The Journal of Supercritical Fluids, 112 (2016) 57–66.

[25] T. Hatami, R.N. Cavalcanti, T.M. Takeuchi, M.A.A. Meireles, Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from Macela (Achyrocline satureioides) flowers: Kinetic, experiments and modeling, The Journal of Supercritical Fluids, 65 (2012) 71–77.

[26] A. Chafer, M.C. Pascual-Mart, A. Salvador, A. Berna, Supercritical fluid extraction and HPLC determination of relevant polyphenolic compounds in grape skin, Journal of separation science, 28 (2005) 2050–2056.

[27] T.S. Tunna, Z.I. Sarker, K. Ghafoor, S. Ferdosh, J. Md Jaffri, F.Y Al-Juhaimi, E. Ali, J.H. Akanda, S. Awal, Q.U. Ahmed, J. Selamat, Enrichment, in vitro, and quantification study of antidiabetic compounds from neglected weed Mimosa pudica using supercritical CO_2 and CO_2 – Soxhlet, Separation Science and Technology, 53 (2018) 243–260.

[28] J. Li, J. Zhang, M. Wang, Extraction of Flavonoids from the Flowers of Abelmoschus manihot (L.) Medic by Modified Supercritical CO_2 Extraction and Determination of Antioxidant and Anti-Adipogenic Activity, Molecules, 21 (2016) 810.

[29] K.G. Martino, D. Guyer, Supercritical fluid extraction of Quercetin from onion skins, Journal of food process engineering, 27 (2004) 17–28.

[30] M.A. Meneses, G. Caputo, M. Scognamiglio, E. Reverchon, R. Adami, Antioxidant phenolic compounds recovery from Mangifera indica L. by-products by supercritical antisolvent extraction, Journal of Food Engineering, 163 (2015) 45–53.

[31] M. Radojkovic, Z. Zekovic, P. Maškovic, S. Vidovic, A. Mandic, A. Mišan, S. Durovic, Biological activities and chemical composition of Morus leavesextracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction, The Journal of Supercritical Fluids, 117 (2016) 50–58.

[32] A. Rahmawati, D. Pang, Y. Ju, F.E. Soetaredjo, O.L. Ki, S. Ismadji, Supercritical CO_2 Extraction of Phytochemical Compounds from Mimosa pudica Linn, Chemical Engineering Communications, 202 (2015) 1011–1017.

[33] M. Antunes-Ricardo, J.A. Gutiérrez-Uribe, D. Guajardo-Flores, Extraction of isorhamnetin conjugates from Opuntia ficus-indica (L.) Mill using supercritical fluids, The Journal of Supercritical Fluids, 119 (2017) 58–63.

[34] C. Rodríguez-Pérez, J.A. Mendiola, R. Quirantes-Piné, E. Ibánez, A. Segura-Carretero, Green downstream processing using supercritical carbon dioxide, CO_2-expanded ethanol and pressurized hot water extractions forrecovering bioactive compounds from Moringa oleifera leaves, The Journal of Supercritical Fluids, 116 (2016) 90–100.

[35] Xiao Ruan, Liu-Ye Yan, Xian-Xian Li, Ben Liu, Huan Zhang and Qiang Wang, Optimization of Process Parameters of Extraction of Amentoflavone, Quercetin and Ginkgetin from Taxus chinensis Using Supercritical CO_2 Plus Co-Solvent, Molecules, 19 (2014) 17682-17696.

[36] T.M. Takeuchi, M.L. Rubano, M.A.A. Meireles, Characterization and Functional Properties of Macela (Achyrocline satureioides) Extracts Obtained by Supercritical Fluid Extraction Using Mixtures of CO_2 Plus Ethanol, Food Bioprocess Technol, 3 (2010) 804–812.

[37] V. Pilařová, K. Plachká, L. Chrenková, I. Najmanová, P. Mladěnka, F. Švec, O. Novák, L. Nováková, Simultaneous determination of quercetin and its metabolites in rat plasma by using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spektrometry, Talanta, 185 (2018) 71–79.

[38] https://blog.umetrics.com/hubfs/Download%20Files/MODDE%2012.0.1%20User%20Guide.pdf
přístup získán dne: 24. 11. 2019

[39] http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Agapanthus+africanus
přístup získán dne: 22. 2. 2020

[40] D.J.H. Veale, I.Havlik, D.W. Oliver, T.G. Dekker, Pharmacological effects of *Agapanthus africanus* on the isolated rat uterus, Journal of Ethnopharmacology, 66 (1999) 257–262.

[41] https://www.ayurtimes.com/bulbine-natalensis-benefits-dosage-side-effects/
přístup získán dne: 22. 2. 2020

8 Přílohy

8.1 Seznam tabulek

Tabulka 1: Podmínky extrakce kvercetinu z rostlinného materiálu pomocí SFE 24
Tabulka 2: Optimalizace základních parametrů 35
Tabulka 3: Plně faktoriální design experimentů 38
Tabulka 4: Ověření zoptimalizovaných podmínek 40
Tabulka 5: Reálná koncentrace vzorků v jednotlivých odběrových časech extrakce 44
Tabulka 6: Průměrné hodnoty koncentrací vzorků v časech odběrů za daných průtokových rychlostí; SD; RSD 44
Tabulka 7: Výstupní hodnoty měření zjišťující vliv velikosti kuliček na výtěžnost extrakce. 46
Tabulka 8: Opakovatelnost extrakce 47
Tabulka 9: Seznam rostlin a jejich dodané množství. 48
Tabulka 10: Výtěžnost kvercetinu v rostlinných vzorcích 51

8.2 Seznam obrázků

Obrázek 1: Kyselina kávová, kyselina p-kumarová, kyselina jablečná, kyselina chinová 13
Obrázek 2: Kvercetin a jeho glykosidické formy 13
Obrázek 3: Struktura rutinu, kempferolu, (+)-katechinu, (-)-katechinu 13
Obrázek 4: Struktura flavonolu, kvercetinu 14
Obrázek 5: Fázový diagram tlak-teplota nadkritické tekutiny 16
Obrázek 6: Nadkritické tekutiny a jejich vybrané vlastnosti 17
Obrázek 7: Změny ve vlastnostech rozpouštědla s postupně přibývajícím obsahem organické složky ... 19
Obrázek 8: Schéma SFE instrumentace 20
Obrázek 9: Vliv rozdílné velikosti částic a mezičásticových prostor na průtok rozpouštědla vzorkem 21
Obrázek 10: Soubor grafů – počet měření za daného tlaku, průtokové rychlosti a teploty 23
Obrázek 11: Průřez naplněnou extrakční celou 28
Obrázek 12: Grafy znázorňující vlivy faktoru 32
Obrázek 13: Graf vhodnosti modelu 33
Obrázek 14: Graf pravděpodobnosti 33
Obrázek 15: Graf opakovatelnosti 34
Obrázek 16: Plackett-Burman design model 36
Obrázek 17: Plackett-Burman design model (bez vzorků N9, N10, N11) 37
Obrázek 18: Plackett-Burman design model (bez vzorků N9, N10, N11, N1) 37
Obrázek 19: Plně faktoriální design experimentů 39
Obrázek 20: Plně faktoriální design experimentů (bez vzorků N6 a N17) 40

Obrázek 21: Grafy znázorňující průměrnou hodnotu výtěžnosti a rozdíl mezi minimální a maximální výtěžností. 41
Obrázek 22: Ověření zoptimalizovaných podmínek 41
Obrázek 23: Normální rozdělení reziduí potvrzené Jarque-Berrův testem 42
Obrázek 24: Graf znázorňující ideální rozdělení a reálné rozdělení výsledných dat 42
Obrázek 25: Histogram – reálné rozložení dat 43
Obrázek 26: Graf závislosti koncentrace QCE na čase extrakce. 45
Obrázek 27: Graf závislosti koncentrace QCE na spotřebě rozpouštědla. 45
Obrázek 28: Kalibrační přímka: QCE, SRM1 přechod. Korelační koeficient r = 0,998965; r^2 = 0,997931 47
Obrázek 29: Fotky dodaného rostlinného materiálu ve vysušené formě před drcením a homogenizací. 49
Obrázek 30: Kalibrační přímka: QCE, SRM1 přechod. Korelační koeficient r = 0,997378; r^2 = 0,994762 50
Obrázek 31: Chromatogramy vzorků N1: Ornithogalum longibracteatum a N2: Merwilla natalensis 52
Obrázek 32: Chromatogramy vzorků N3: Bulbine natalensis a N4: Scadoxus puniceus 53
Obrázek 33: Chromatogramy vzorků N5: Drimia robusta/elata a N6: Eucomis pole-evansii 53
Obrázek 34: Chromatogramy vzorků N9: Boophone haemanthoides a N10: Bowiea volubilis 53
Obrázek 35: Chromatogramy vzorků N12: Haemanthus a N14: Agapanthus africanus 54
Obrázek 36: Chromatogramy vzorků N15: Kigelia africana a N16: Allium cepa 54
Obrázek 37: Chromatogramy vzorků N17: Cydonia oblonga a N7: Albuca nelsonii 54

8.3 SFC 2019, Philadelphia, USA

Carbon dioxide expanded liquid as a powerful solvent for the extraction of quercetin from quince fruit

Veronika Pilařová [1], Lukáš Kuda [1], Karel Doležal [2], Johannes van Staden [3], Lucie Nováková [1]

[1] *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic*

[2] *Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71, Olomouc, Czech Republic*

[3] *Research Centre for Plant Growth and Development, School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal Pietermaritzburg, South Africa*

Email: pilarovv@faf.cuni.cz

Supercritical fluid extraction (SFE) is an approach commonly used for the extraction of nonpolar active compounds from various matrices. To change polarity, mass transfer, extraction power, and analytes solubility, the organic solvent is very often added to non-polar CO_2. Depending on the amount of added organic solvent, SFE, SFE with modifier, CO_2 expanded liquid extraction (CO_2-XLE), and pressurized liquid extraction are recognized. The neat CO_2 is not an optimal choice to extract polar compound, thus CO_2-XL in mixture with organic solvent such as methanol, ethanol, isopropanol, is very often used as an extraction solvent in this case. To improve the extraction recovery, the parameters including temperature, pressure, and type of extraction could be also tuned.

In this study, we optimized the method for the extraction of quercetin from quince fruit. At first, the effect of following parameters was tested using simple Placket Burman model. Ethanol with 0 – 20% water was chosen as a green organic solvent added to CO_2 in ratio 10 – 90 %. The temperature was tested in the range 30 – 80 °C, and pressure in the range 100 – 300 bar. After its evaluation, the water amount in ethanol was finally set up on 10% due to low effect of this parameter and for all other tested parameters, he tested ranges were narrowed. After the solvent, temperature, and pressure optimization by DoE, 4 different flow rates (1, 2, 3, and 4 mL/min) were explored to find the final extraction conditions.

Optimized method used CO_2/EtOH + 10% H_2O (10/90, v/v) at 66 °C, 223 bar, and 4 mL/min flow rate. In 30 min, it provided extraction of quercetin in 30 minutes with recoveries 120 ng with 22% RSD (n=9, 3 different days) per 0.5 g of sample.

This method will be used for the isolation of quercetin from different varieties of quince fruit to compare them in the term of quercetin level.

The study was supported by the project STARSS reg. no.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465 funded by ERDF.

8.4 SFC 2019, Philadelphia, USA, sekce plakátových sdělení

CARBON DIOXIDE EXPANDED LIQUID AS A POWERFUL SOLVENT FOR THE EXTRACTION OF QUERCETIN FROM QUINCE FRUIT

Veronika Pilařová [1], Lukáš Kuda [1], Karel Doležal [2], Johannes van Staden [3], Lucie Nováková [1]

[1] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

[2] Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71, Olomouc, Czech Republic

[3] Research Centre for Plant Growth and Development, School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal Pietermaritzburg, South Africa

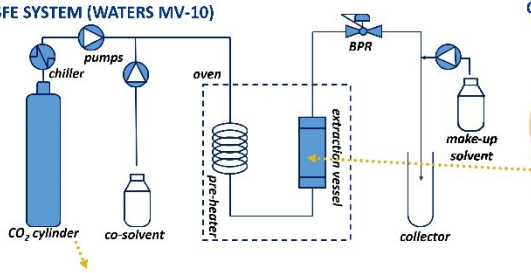
E-mail: pilarovv@faf.cuni.cz

INTRODUCTION

Carbon dioxide expanded liquid (CXL) is a mixed solvent containing a compressible CO_2 which is dissolved in organic solvent. The use of CXL has many advantages including improved mass transfer, reduced viscosity, increased diffusivity, reduced energy and costs, and also lower pressure used for the extraction. Due to the physico-chemical properties of CXL, they are successfully used for the extraction of wide range of compounds from various matrices. In our study we optimized CXL extraction (CLXE) for isolation of quercetin from quince fruit which is a natural source of many antioxidants and other substances beneficial for human health.

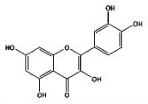
SAMPLES AND METHOD OPTIMIZATION

SFE SYSTEM (WATERS MV-10)



QUINCE FRUIT

Water (80%)
Carbohydrates (15%)
Organic acids, aminoacids, fatty acids
Vitamin C and B
Flavonoids, polyphenols, carotenoids, sterols
Minerals



quercetin
MW: 302.04
Log P: 1.99
pK_A: 6.31

1. PRELIMINARY TESTING - DOE
(Placket—Burman design model)

co-solvent: ethanol
co-solvent amount: 10—90 %
temperature: 30—80 °C
pressure: 100—300 bar
water content in co-solvent: 0-20 %
make-up solvent: ethanol; 0.2 mL/min
extraction time and flow rate: 10 min, 2mL/min

2. MAIN OPTIMIZATION - DOE
(full factorial design)

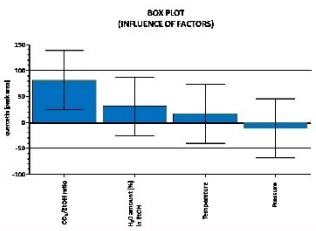
co-solvent: ethanol + 10% H_2O
co-solvent amount: 10—90 %
temperature: 60—80 °C
pressure: 150—300 bar
make-up solvent: ethanol; 0.2 mL/min
extraction time and flow rate: 10 min, 2mL/min

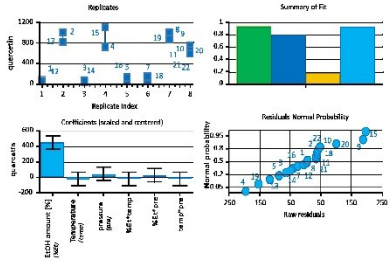
3. OPTIMIZED CONDITIONS, EXTRACTION KINETICS

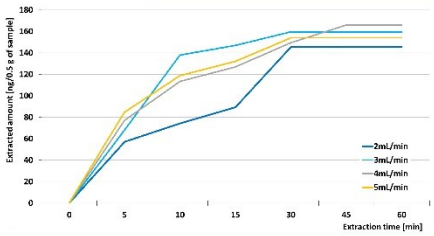
co-solvent: ethanol + 10% H_2O
CO_2/co-solvent ratio: 10/90 (v/v)
temperature: 66 °C
pressure: 223 bar
extraction time: 60 min
flow rate: 2, 3, 4, and 5 mL/min

UHPLC-MS/MS ANALYSIS

SP: Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (50 x 2.1 mm, 1.7 µm)
MP: 0.1% formic acid in water (eluent A) and MeOH (eluent B), gradient elution with flow rate: 0.35 µL/min
MS/MS detection in ESI$^+$
3 SRM transitions were observed: 302.91 → 136.92; 302.91 → 152.87, 302.91 → 229.1.







RESULTS AND CONCLUSIONS

FINAL CXLE CONDITIONS

	quercetin
co-solvent	Ethanol + 10 % water
CO_2/ co-solvent ratio	10/90
T [°C]	66
p [bar]	223
flow-rate [mL/min]	3
time [min]	30

Repeatability (n=3)
Day 1: 91 ng/ 0.5 g (RSD 27.8%)
Day 2: 87.0 ng/ 0.5 g (RSD 15.2%)
Day 3: 72.1 ng/ 0.5 g (RSD 24.7%)
Total:
Recovery: 83.56 ng/ 0.5g sample (RSD 22.78%)

We optimized fast and effective CXLE method using green solvent consisting of EtOH, water, and CO_2 enabling the extraction of quercetin from dried quince fruit. The obtained extract is fully compatible with UHPLC-MS/MS system. Optimized method provided satisfactory repeatability and recovery.
The method will be used to compare different varieties of quince fruit to compare them in the term of quercetin level.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the STARSS project (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465) co-funded by ERDF.

EUROPEAN UNION
European Structural and Investment Funds
Operational Programme Research, Development and Education

8.5 10. postgraduální a 8. postdoktorandská konference 2020, FaF UK, HK

CARBON DIOXIDE EXPANDED LIQUID AS A SOLVENT FOR THE EXTRACTION OF QUERCETIN FROM PLANT MATERIAL

PILAŘOVÁ, V., [1], KUDA, L., [1], NOVÁKOVÁ, L.,[1], VAN STADEN, J., [2], DOLEŽAL K., [3]

[1] Department of Analytical, Chemistry Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Czech Republic

[2] Research Centre for Plant Growth and Development, School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal Pietermaritzburg, South Africa

[3] Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

e-mail: pilarovv@faf.cuni.cz

Supercritical fluid extraction (SFE) using non-polar CO_2 as an extraction solvent is commonly used approach to extract bioactive compounds from natural sources such as dried leaves, herbs, fruits, and flowers. Neat CO_2 is an optimal choice to extract non-polar compounds. Thus, an organic solvent is often added to CO_2 to achieve extraction of more polar compounds. Methanol, ethanol (EtOH), isopropanol, and small water proportion are usually added to change polarity, mass transfer, extraction yield, and analytes solubility. Depending on the amount of added organic solvent, we recognize SFE, SFE with modifier, CO_2 expanded liquid extraction, and pressurized liquid extraction. Other parameters including temperature, pressure, and type of extraction can also improve the extraction yield. In our study, we optimized method for the extraction of quercetin from quince fruit. Placket-Burman model was used to determine the effect of addition of 0- 20 % water in EtOH as a green organic solvent added to CO_2 in ratio 10 – 90 %. We used temperatures in a range of 30 – 80 °C and a pressure of 100 – 300 bar. After its evaluation, the water amount in ethanol was set up on 20% due to low effect of this parameter. The tested ranges were consequently narrowed for other parameters using design of experiment. Then, 4 different flow rates in a range of 1-4 mL min^{-1} were explored to find the final extraction conditions. Optimized method used CO_2/EtOH + 20% H_2O (10/90, v/v) at 66 °C, pressure of 223 bar, and flow rate of 4 mL min^{-1}. These conditions enabled extraction of quercetin in 30 min with recoveries of 120 ng (22% RSD, n=9, 3 different days) from 0.5 g sample.

The study was supported by the project STARSS reg. no.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465 funded by ERDF.