

5. Streszczenie

Celem niniejszej dysertacji było opracowanie nowych metodologii efektywnego pozyskiwania związków biologicznie aktywnych z matryc roślinnych z wykorzystaniem ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym oraz ich oznaczania za pomocą technik spektroskopowych, chromatograficznych, w tym również chromatografii w stanie nadkrytycznym. Ponadto podjęto badania nad powiększaniem skali procesu separacji związków bioaktywnych z matrycy roślinnej jaką stanowiła nawłóć olbrzymia, zapewniając największą wydajność procesu, jak również zawartość niepolarną grupy związków biologicznie czynnych. W pracy przedstawiono i zaprezentowano wyniki badań zawartych w sześciu publikacjach naukowych z listy filadelfijskiej.

W początkowym etapie badań został wykorzystany plan optymalizacyjny, *Box-Behnken design* (BBD), który umożliwił przygotowanie harmonogramu doświadczeń obejmujący cały zakres badanych parametrów procesu separacji z wykorzystaniem płynu w stanie nadkrytycznym. Plan składał się z piętnastu eksperymentów w różnych warunkach, którego przeprowadzenie umożliwiło późniejsze zastosowanie metod matematyczno-statystycznych do interpretacji wyników. Plan zrealizowano na instalacji ćwierć-technicznej z wykorzystaniem nawłoci olbrzymiej (*Solidago gigantea* Ait.) oraz lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.) jako materiału roślinnego, co pozwoliło również na przesłedzenie zasadności zastosowania tych metod statystycznych na instalacjach większych niż laboratoryjna. Poza punktem centralnym, powtórzonym trzykrotnie, w celu weryfikacji powtarzalności procesu, ekstrakcje przeprowadzano jednokrotnie.

Produkty pozyskane z obu matryc roślinnych poddano analizom jakościowym i ilościowym. Całkowita masa ekstraktu pozwoliła na oszacowanie wydajności procesu, co w późniejszym etapie zostało wykorzystane do badań powiększania skali. Spektroskopowe badania UV-Vis próbek pozwoliły na analizę całkowitej zawartości polifenoli, flawonoidów, chlorofilu oraz lipidów. Badania chromatograficzne z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem masy (GC-MS) pozwoliły na określenie zawartości kwasów tłuszczowych w ekstraktach. Polifenole (kwas salicylowy oraz ferulowy) jak również flawonoidy (apigenina, flavon oraz naringenina) zostały ilościowo oznaczone dzięki zastosowaniu nowej techniki analizy chromatograficznej wykorzystującej nadkrytyczny ditlenek węgla jako eluent (SFC). Dzięki właściwościom scCO₂, chromatografia w stanie nadkrytycznym zapewnia szybki rozdział składników próbki przy niskim udziale rozpuszczalników organicznych.

Uzyskane dane wraz z parametrami eksperymentów wg BBD umożliwiły interpretację wyników z wykorzystaniem metodologii powierzchni odpowiedzi (RSM). Równania proponowane przez metodę RSM tak dopasowują powierzchnię odpowiedzi wyznaczoną podczas realizacji planu doświadczalnego, aby symulowała ona rzeczywistą zakrzywioną powierzchnię w stanie granicznym i umożliwiała rzetelną analizę wyników. Finalnie, wykorzystano analizę wariancji (ANOVA) do otrzymania optymalnych wartości procesu, zapewniających maksymalną wartość analizowanych odpowiedzi, tj. wydajność procesu oraz zawartość poszczególnych grup związków bioaktywnych. Następnie parametry te weryfikowano poprzez ponowną ekstrakcję w warunkach optymalnych a ich poprawność umożliwiła przystąpienie do końcowego etapu badań jakim były prace nad powiększaniem skali procesu.

Powiększanie skali procesu ekstrakcji w stanie nadkrytycznym prowadzone były z wykorzystaniem odpowiedzi otrzymanych dla ekstrakcji nawłoci olbrzymiej. Skalę ekstrakcji powiększano w oparciu o stałość trzech kryteriów: stała masa rozpuszczalnika na masę użytego wsadu matrycy roślinnej ($S \text{ CO}_2/M$), stała szybkość przepływu rozpuszczalnika na masę wsadu ($Q \text{ CO}_2/M$) oraz stałość zarówno masy jak i szybkości przepływu rozpuszczalnika przeliczoną na masę surowca. Dwukrotnie powiększano skalę ekstrakcji nawłoci w oparciu o dwie odpowiedzi, uzyskane na instalacji ćwierć-technicznej: całkowita wydajność procesu oraz maksymalna zawartość kwasów tłuszczowych. W pierwszym przypadku powodzeniem zakończyło się powiększanie skali procesu, w którym zarówno masa rozpuszczalnika jak i jego szybkość zostały zachowane. W przypadku powiększania skali w oparciu o maksymalną zawartość kwasów tłuszczowych proces, w którym zachowane zostało kryterium stałości $S \text{ CO}_2/M$ zakończył się powodzeniem.

Wyniki doświadczeń prowadzonych zarówno w skali ćwierć- jak i pół-technicznej przedstawione w pracy stanowią potwierdzenie złożoności procesu separacji płynem nadkrytycznym bioaktywnych składników zawartych w matrycy roślinnej. Z powodzeniem zastosowano metody matematyczno-statystyczne do przygotowania planu doświadczeń oraz interpretacji danych w skali większej niż laboratoryjna. Jednak ich różnorodność dla obu surowców narzuca konieczność optymalizacji separacji indywidualnej grupy związków dla każdego surowca oddzielnie. Finalnie, w pracy potwierdzono, iż zastosowanie technik separacyjnych płynem nadkrytycznym stwarza nowe możliwości pozyskiwania i sterowania składem w obrębie badanej grupy związków zapewniając najwyższą jakość i czystość produktu końcowego.

Olga Wrona

6. Abstract

The aim of this dissertation was to develop new methodologies for efficient extraction of biologically active compounds from plant materials using supercritical extraction and their determination by spectroscopic and chromatographic techniques, including supercritical chromatography. Furthermore, the upscaling of supercritical carbon dioxide extraction of goldenrod was investigated, providing the highest efficiency of the process, as well as the concentration of a non-polar group of biologically active compounds in extract. The paper presents the results of research coming out of the six scientific publications.

In the first stage of the research, a statistical plan, the Box-Behnken design (BBD) was used for the preparation of a plan of experiments covering the entire range of investigated parameters of the separation process using a supercritical fluid. The plan consisted of fifteen experiments in different conditions, which later allowed for application of mathematical and statistical methods to interpret the results. The plan was implemented on a quarter-technical plant using goldenrod (*Solidago gigantea* Ait.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.), which also allowed to trace the legitimacy of using these statistical methods on larger than laboratory plants. Except for the focal point, extractions were randomly repeated to verify reproducibility of the process.

Obtained products from both plant materials were subjected to qualitative and quantitative analyzes. The total mass of the extract made it possible to estimate the process efficiency (yield), which later was used for scale-up studies. The spectroscopic UV-Vis analysis of samples have allowed to estimate the total content of polyphenols, flavonoids, chlorophylls and lipids. Chromatographic analysis, specified gas chromatography coupled with a mass spectrometer (GC-MS) have allowed to determine the content of fatty acids in the extracts. Polyphenols (salicylic and ferulic acid) as well as flavonoids (apigenin, flavon and naringenin) were identified and quantified by using a new chromatographic technique using supercritical carbon dioxide as eluent (SFC).

The both investigated process parameters and obtained results allowed to the response surface methodology (RSM) for further interpretation. The equations proposed by the RSM method adjust the response surface determined during the experiments so that it simulates the real curved surface in the limit state and allows reliable analysis of the results. Finally, analysis of variance (ANOVA) was used to obtain optimal process parameters providing the maximum content of the analyzed responses, i.e. process efficiency (yield) and content of individual groups of bioactive compounds. Then, these parameters were verified by caring out

the extractions and their correctness allowed to go to the final stage of research, which was study on upscaling of the extraction.

The scale-up procedures of the supercritical carbon dioxide extraction were carried out with the use of the responses obtained for studies with goldenrod. Scale of the extraction was increased based on the constant value of three criteria: constant mass of the solvent per mass of the feedstock ($S \text{ CO}_2/\text{M}$), constant solvent flow rate per mass of plant material ($Q \text{ CO}_2/\text{M}$) and constancy of both mass and solvent flow rate per mass of raw plant materials. The scale-up procedure was investigated for two different responses obtained for goldenrod at the quarter-technical plant: the yield of the extraction and the maximum content of fatty acids. In the first case, the upscaling process has ended successfully for both constant criteria: constant mass and solvent flow rate of scCO_2 . For the maximum content of fatty acids, the upscaling procedure has ended successfully for the process carried out with constant $S \text{ CO}_2 / \text{M}$.

The results of experiments conducted on a quarter- and half-technical scale presented in the paper confirm the complexity of the separation process with supercritical fluid of bioactive components of plant materials. Mathematical and statistical methods were successfully used on a larger scale than the laboratory to prepare a plan of experiments and to interpret the final data. However, the diversity for both plant materials imposes the necessity for process optimization for an individual group of compounds as well as for each plant material separately. Finally, the work presents that the use of separation techniques with supercritical fluid creates new possibilities for obtaining and controlling the composition of the final product within the examined group of compounds.

Olga Wrona