

# VYUŽITÍ SFE PRO IZOLACI SILICE Z OKVĚTNÍCH LÍSTKŮ RŮŽÍ

**KAŠPAROVÁ PAVLA, SURMOVÁ SILVIE, BAJEROVÁ PETRA\* a EISNER ALEŠ**

*Katedra analytické chemie*

\* *Garant*

## ÚVOD

Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) je moderní analytická technika, která je používána k extrakci látek z přírodních matric. Tato práce je zaměřena na využití extrakce nadkritickou tekutinou, pro izolaci silice z okvětních lístků růží.

SFE Extrakce je prováděna pomocí tekutiny, která se nachází v nadkritickém (superkritickém) stavu. Toho stavu lze dosáhnout, pokud látka přesáhne svůj kritický bod, který je definován pomocí kritické teploty a kritického tlaku. Nadkritická tekutina má některé vlastnosti jako kapalina jiné jako plyn. Je stlačitelná, její hustotu lze měnit a je velmi podobná hustotě kapaliny, viskozita je o jeden řád vyšší než viskozita kapalin, má vysokou difuzivitu a nemá povrchové napětí <sup>1</sup>.

## Nadkritický oxid uhličitý

Pro SFE se často používá nadkritický oxid uhličitý. Jeho kritická teplota je 304,1 K a kritický tlak 7,38 MPa. Tyto hodnoty jsou poměrně nízké a instrumentálně dosažitelné, což je jedna z výhod pro jeho použití pro SFE. Mezi další výhody patří netoxičita, nehořlavost, snadná čistitelnost CO<sub>2</sub>. Nevýhoda je, že je CO<sub>2</sub> nepolární. Pro zvýšení polaritě se používají modifikátory (methanol, acetonitril, voda a další). V nadkritickém oxidu uhličitém jsou velmi dobře rozpustné vonné látky, esenciální oleje, estery, alkoholy, aldehydy a ketony <sup>1,2</sup>.

## Provedení SFE

Existují dva typy provedení SFE a to statická a dynamická extrakce. U statické je extrakční nádobka naplněna vzorkem a poté extrakčním činidlem (nadkritická tekutina) a ponechána se v klidu, než dojde k ustanovení rovnováhy, poté je extrakt vypuštěn do sběrné nádoby. U dynamické extrakce je nadkritická tekutina čerpána neustále přes extrakční nádobku se vzorkem. Vzorek je tedy neustále v kontaktu s čerstvou tekutinou. V této práci byla použita dynamická extrakce pomocí oxidu uhličitého. SFE se provádí u pevných vzorků, u rostlinných vzorků se často provádí nejprve sušení vzorku <sup>3,4</sup>.

## Látky obsažené v růžích

Látky, které byly stanoveny v růžích pomocí jiných druhů extrakcí, jsou například citronellol, nonandekan, geraniol, heneikosan, eikosan, Fenylestylalkohol a další <sup>5</sup>.

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Extrakce byla prováděna na přístroji Se-1 (SEKO s.r.o. Brno). Dále byl k přístroji Se-1 připojen průtokoměr FMA 4000 Omega. Do přístroje byly vedeny 3 plyny, CO<sub>2</sub> vysoké čistoty pro extrakci, CO<sub>2</sub> potravinářský a N<sub>2</sub>. Extrakční přístroj se skládal z více částí. Jako jedna z hlavních částí je tlaková nádoba s posuvných pístem kam je přiváděn CO<sub>2</sub> vysoké čistoty. Zde je zkapalněn a ochlazen pomocí potravinářského CO<sub>2</sub> a N<sub>2</sub>. Odtud je CO<sub>2</sub> v nadkritickém stavu veden do vyhřívané extrakční nádoby kde probíhá extrakce. Oxid uhličitý obohacený o vyextrahované látky je dále veden kapilárou (restriktoem) do záchytné nádoby, ve které je záchytné rozpouštědlo. Za nádobku byl připojen průtokoměr, díky kterému bylo možné zjistit, kolik mililitrů oxidu uhličitého bylo použito při extrakci.

### Postup

Lístky růží byly nejprve sušeny a poté rozdrceny a rozemlety na jemný prášek. Navážka takto upraveného vzorku byla smíchána se sklářským pískem. Tato směs byla poté převedena do extrakční patronky. Patronka byla vložena do SFE extraktoru a byla provedena extrakce. Množství použitého oxidu uhličitého bylo sledováno pomocí průtokoměru. Průtok byl udržován mezi hodnotami 80 – 120 ml za minutu. Získaný extrakt byl poté analyzován pomocí GC/MS.

### Optimalizace metody

Pro optimalizaci metody byly zvoleny celkem čtyři parametry (teplota, tlak, množství oxidu uhličitého a vliv modifikátoru). Teplota byla nastavena v rozsahu od 36 do 103 °C, tlak byl zvolen v rozsahu od 11 do 38 MPa a množství oxidu uhličitého bylo od 990 do 6000 ml. Mezi testované modifikátory patřily methanol, acetonitril, toluen a bez přídavku modifikátoru. Optimalizace byla provedena na sušených a rozemletých lístcích růže *Rosa Mariyo*. Navážka vzorku byla 150 mg.

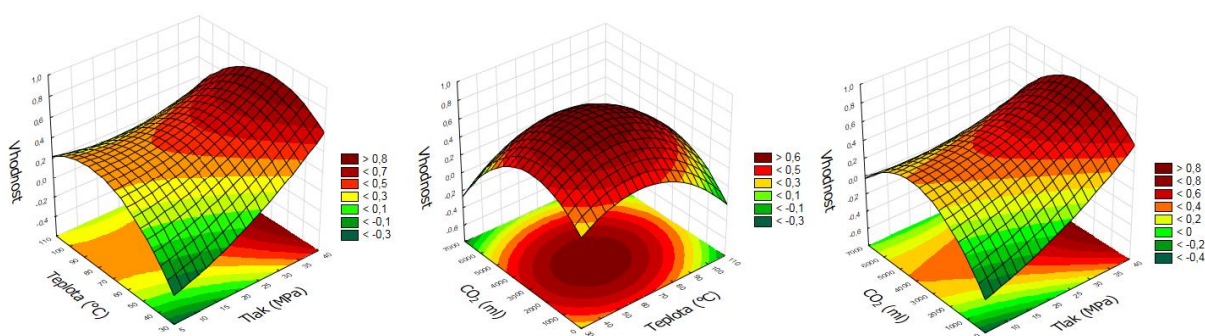
Pro extrakci bylo také nutné zvolit vhodné záchytné rozpouštědlo. Mezi testovaná záchytná rozpouštědla patřil methanol, hexan a toluen. Při použití methanolu jako záchytného rozpouštědla se při extrakci vytvořila bílá sraženina. Při použití hexanu se vytvořili dvě fáze. Jako nejhodnější rozpouštědlo byl tedy zvolen toluen (žádná sraženina ani dvě fáze).

Pro optimalizaci metody bylo celkem provedeno 19 extrakcí. V tabulce 1 jsou uvedeny všechny extrakce, které byly provedeny.

Získaný extrakt byl analyzován na plynovém chromatografu GC 2010, který byl spojen s hmotnostním spektrometrem QP2010 plus (obojí Shimadzu, Japonsko). Data z analyzovaných extraktů byla vyhodnocena ve statistickém programu Statistika 12. Použitá data pro program Statistika 12 byla počet píků, celková suma ploch píků, suma ploch alkoholů a suma ploch po odečtení alkanů. Optimální podmínky byly zvoleny ze sumy ploch píků po odečtení alkanů. Hodnoty nejhodnějších podmínek byly tlak 38 MPa, teplota 70 °C, 3500 ml oxidu uhličitého a extrakce bez přídavku modifikátoru. Grafické znázornění optimálních podmínek je vyobrazeno na obrázku 1.

**Tabulka 1:** Provedené extrakce pro optimalizaci.

Pokus č.	Tlak (MPa)	Teplota (°C)	Objem CO <sub>2</sub> (ml)
8	33	50	2000
15	25	70	990
10	25	70	3500
16	25	70	6000
13	25	36	3500
2	17	90	5000
4	33	90	2000
7	17	90	2000
6	17	50	5000
11	11	70	3500
5	25	70	3500
3	33	50	5000
12	38	70	3500
1	17	50	2000
14	25	103	3500
17	25	70	3500
9	33	90	5000
18	25	70	3500
19	25	70	3500

**Obrázek 1:** Grafické znázornění optimálních podmínek.

## GC/MS

Extrakty z optimalizace a extrakty reálných vzorků, byly proměřeny na plynovém chromatogramu GC 2010, který byl spojen s hmotnostním spektrometrem QP2010 plus (obojí Shimadzu, Japonsko). Hmotnostní spektrometr QP2010 zaznamenával látky v režimu SCAN v rozsahu efektivních hmotností ( $m/z$ ) od 45 do 500. Jednotlivé složky směsi byly

rozděleny na kapilární koloně Zebron ZB-5HT-INFERNO, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m tloušťka filmu od firmy Phenomenex (Torrance, CA, USA). V tabulce 2 je uveden teplotní program, který byl použit pro analýzu. Doba jednoho měření byla 33 minut. Jako nosný plyn pro chromatografii bylo použito helium. Teplota nástřiku na GC byla 180 °C a teplota převodníku do hmotnostního spektrometru 200 °C. Extrakt byl dávkován na kolonu v módu split (1 : 100). Záznam a zpracování dat bylo provedeno v programu GC/MS Real Time Analysis.

**Tabulka 2:** Teplotní program na kapilární koloně Zebron ZB-5HT-INFERNO, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m.

Teplotní nárůst (°C)	Konečná teplota (°C)	Čas udržení konstantní teploty (min)
-	40	5
20	300	15

### Analýza reálných vzorků

Vzorky pro analýzu byly *Rosa Tara*, *Rosa Deep Purple*, *Rosa Aqua* a *Rosa Naliba*. Navážka (150 mg) vzorku byla vždy smíchána se sklářským pískem a vložena do extrakční patronky a ta byla poté vložena do extraktoru. Do záchytné zkumavky bylo napipetováno 2,5 ml toluenu a vyznačena ryska, protože při extrakci docházelo k vypařování toluenu. Extrakce byla prováděna za podmínek, který byly v optimalizaci zvoleny za nejvhodnější (38 MPa, 70 °C, 3500 ml oxidu uhličitého, bez přísady modifikátoru). Získaná extrakt byl poté analyzován na GC/MS.

### VÝSLEDKY

Data byla vyhodnocena v programu GC/MS Postrun Analysis. Pro porovnání naměřených spekter byly použity knihovny spekter NIST 11, NIST 11s a FFNSC 2. Dále byl pro všechny látky vypočítán retenční index (tzv. Kovatsův index). Retenční index byl vypočítán z retenčních časů alkanů C8 - C40. Tyto alkany byly proměřeny za stejných podmínek jako vzorky. Pro co nejpřesnější identifikaci látek byla využívána nejen shoda hmotnostních spekter, ale také porovnání retenčních indexů. Identifikované látky ve vzorcích jsou uvedeny v tabulce 3.

**Tabulka 3:** Látky identifikované v reálných vzorcích.

CAS číslo	Název	Retenční index vypočítaný	Retenční index látky	<i>Rosa Aqua</i>	<i>Rosa Deep Purple</i>	<i>Rosa Tara</i>	<i>Rosa Naliba</i>
100 - 52 - 7	Benzaldehyd	971	960	I den	I den	I den	I den
100 - 51 - 6	Benzyl alkohol	1045	1040	I den	I den	I den	I den
60 - 12 - 8	Fenylethyl Alkohol	1124	1136	-	-	I den	-
36653 - 82 - 4	1-Hexadekanol	1881	1884	I den	-	I den	I den
124 - 19 - 6	Nonadekan	1111	1107	-	-	I den	-
57 - 10 - 3	n-Hexadekanová kyselina	1961	1968	I den	I den	I den	I den
112 - 95 - 8	Eikosan	2000	2009	-	-	I den	-
112 - 92 - 5	1-Oktadekanol	2083	2074	I den	I den	I den	-
629 - 94 - 7	Heneikosan	2101	2109	I den	I den	I den	I den
150 - 86 - 7	Phytol	2127	2122	-	-	I den	-
60 - 33 - 3	Kyselina linolová	2142	2140	I den	-	-	I den
57 - 11 - 4	Kyselina Stearová	2162	2165	I den	I den	I den	I den
629 - 97 - 0	Dokosan	2200	2200	I den	I den	I den	I den
638 - 67 - 5	Trikosan	2301	2300	I den	I den	I den	I den
646 - 61 - 1	Tetrakosan	2401	2400	I den	I den	I den	I den
629 - 99 - 2	Pentakosan	2500	2500	I den	I den	I den	I den
23470 - 00 - 0	Hexadekanová kyselina, 2-hydroxy-1-(hydroxy methyl)ethyl ester	2529	2519	I den	-	-	I den
630 - 01 - 3	Hexakosan	2601	2606	I den	I den	I den	I den
506 - 51 - 4	1-Tetrakosanol	2642	2650	-	-	-	I den
593 - 49 - 7	Heptakosan	2701	2705	I den	I den	I den	I den
3443 - 84 - 3	9,12-Oktadekadienová kyselina (Z,Z)-, 2-hydroxy-1- (hydroxymethyl)ethyl ester	2716	2705	-	-	I den	I den
630 - 02 - 4	Oktakosan	2801	2804	I den	I den	I den	I den
111 - 02 - 4	Squalen	2848	2847	I den	I den	I den	-
297 - 03 - 0	Cyklotetrakosan	2872	2878	I den	I den	I den	I den
630 - 03 - 5	Nonakosan	2900	2904	I den	I den	I den	I den
638 - 68 - 6	Triakontan	3001	3003	I den	I den	I den	I den
557 - 61 - 9	1-Oktakosanol	3050	3047	I den	I den	I den	I den
630 - 04 - 6	n-Hentriakontan	3101	3100	I den	I den	I den	I den
58 - 95 - 7	Vitamin E	3171	3150	I den	I den	I den	I den
544 - 85 - 4	n-Dotriakontan	3202	3200	I den	I den	-	-
630 - 05 - 7	n-Tritriakontan	3301	3300	I den	I den	I den	I den

## ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na využití extrakce nadkritickou tekutinou, pro izolaci silic z okvětních lístků růží a nalezení optimálních podmínek pro extrakci. Byly určeny optimální podmínky pro SFE a to tlak 38 MPa, teplota 70 °C, 3500 ml oxidu uhličitého a extrakce bez přídavku modifikátoru. V reálných vzorcích bylo celkem identifikováno 29 látek. Nejčastěji se jednalo o aldehydy, kyseliny a alkoholy. Některé látky, které jsou typické pro silice růží (citronellol, geraniol, linaloon) nebyly v extraktu identifikovány. Nonadekan, heikosan a eikosan byly ve vzorcích identifikovány.

## LITERATURA

1. *Superkritická fluidní extrakce*. Dostupné z:  
[http://sch.vscht.cz/materialy/stud\\_mgr/sfe\\_web\\_2014.pdf](http://sch.vscht.cz/materialy/stud_mgr/sfe_web_2014.pdf)
2. Sovová H., Stateva R.P.: *Rev. Chem. Eng* 27, 79 (2011).
3. *Superkritické kapaliny*. Dostupné z:  
[https://is.muni.cz/th/77987/prif\\_m/superkriticke\\_kapaliny.pdf](https://is.muni.cz/th/77987/prif_m/superkriticke_kapaliny.pdf)
4. Nik Norulaini N.A., Anuar O., Abbas F.M.A., Fatehah M.O., Mohd Omar A.K., Sahena F., Zaidul I.S.M.: *Food Bioprod. Process.* 87, 152 (2009).
5. Jirovetz L., Buchbauer G., Stoyanova A., Balinova A., Guangjiun Z. and Xihan M.: *Flavour Frag. J.* 20, 7 (2005).