



**SUROWCE ROŚLINNE I PRODUKTY  
NATURALNE – NOWE NADZIEJE DLA  
PRZYSZŁYCH POKOLEŃ**

PLANT MATERIALS AND NATURAL PRODUCTS -  
NEW HOPES FOR THE FUTURE GENERATIONS

**Magdalena Ligor<sup>1\*</sup>, Katarzyna Rafińska<sup>1,2</sup>,  
Olga Wrona<sup>3</sup>, Anna Kielbasa<sup>1</sup>, Aneta Krakowska-  
Sieprawska<sup>1</sup>, Bogusław Buszewski<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Gagarina 7, 87–100 Toruń*

<sup>2</sup>*Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Wileńska 4, 87–100 Toruń*

<sup>3</sup>*Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Nowych Syntez Chemicznych  
Al. Tysiąclecia Państwa Polskiego 13a, 24-110 Puławy*

*\*e-mail: mligor@umk.pl*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Surowce roślinne jako źródło związków biologicznie aktywnych
2. Metody wyodrębniania i oznaczania wybranych związków biologicznie aktywnych
  - 2.1. Ekstrakcja nadkrytycznym ditlenkiem węgla
  - 2.2. Ekstrakcja wspomagana enzymami

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr hab. Magdalena M. Ligor, prof. UMK**, jest pracownikiem naukowo-dydaktycznym w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydziału Chemii UMK w Toruniu. Zainteresowania naukowe: opracowanie metod izolowania i sposobów oznaczania związków wykazujących aktywność biologiczną z wykorzystaniem łączonych technik separacyjnych (GC/MS, TLC/MS, LC/MS), badanie właściwości antyoksydacyjnych związków polifenolowych pozyskiwanych z surowców roślinnych, żywność funkcjonalna.



<https://orcid.org/0000-0001-7059-907X>

**Dr hab. Katarzyna Rafińska** jest pracownikiem naukowo-dydaktycznym w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydziału Chemii UMK w Toruniu. Zainteresowania naukowe: analiza właściwości biologicznych wtórnych metabolitów roślinnych, ekstrakcja za pomocą ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym, ekstrakcja materiału roślinnego z wykorzystaniem enzymów, opracowanie metod przygotowania materiału roślinnego do izolowania związków biologicznie aktywnych, analiza cytotoxyczności z wykorzystaniem hodowli komórkowych, biotechnologia.



<https://orcid.org/0000-0002-3358-7317>

**Dr Anna Kielbasa** ukończyła studia w 2007 r. i przez 6 lat pracowała w akredytowanym laboratorium chemicznym, gdzie zdobywała doświadczenie jako chemik-analityk. W 2017 r. otrzymała tytuł doktora. Od 2013 r. jest pracownikiem w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii UMK w Toruniu. Jest współautorką wielu artykułów naukowych, jako wykonawca badań pracowała przy realizacji projektów Narodowego Centrum Nauki oraz Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Jej zainteresowania naukowe obejmują chromatografię cieczową i gazową, spektrometrię mas, certyfikowane materiały odniesienia oraz przygotowanie próbek.



<https://orcid.org/0000-0001-7655-928X>

**Mgr Aneta Krakowska-Sieprawska** od 2017 roku jest doktorantką w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii UMK w Toruniu. Jako kierownik oraz wykonawca badań pracowała przy realizacji projektów Narodowego Centrum Nauki oraz Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Zainteresowania naukowe: metody izolowania i oznaczanie składników aktywnych z materiału roślinnego z wykorzystaniem metod ekstrakcyjnych (SPE, ASE, SFE, EA-SFE) i chromatograficznych (SFC, LC/MS); badanie aktywności antyoksydacyjnej i biologicznej otrzymanych ekstraktów.



<https://orcid.org/0000-0002-5056-9014>

**Dr Olga Wrona**, jest pracownikiem naukowym Sieci Badawczej Łukasiewicz - Instytutu Nowych Syntezy Chemicznych w Puławach. Zainteresowania naukowe: optymalizacja parametrów ekstrakcji nadkrytycznym ditlenkiem węgla z wykorzystaniem metod matematyczno-statystycznych, badania powiększania skali procesu, opracowanie sposobów oznaczania związków wykazujących aktywność biologiczną z wykorzystaniem technik chromatograficznych oraz spektrofotometrycznych, od niedawna badanie właściwości mechanicznych oraz reologicznych tworzyw biodegradowalnych.



<https://orcid.org/0000-0003-1135-6849>

**Prof. zw. dr hab. dr h.c. Bogusław Buszewski, czł. koresp. PAN** w roku 1982 ukończył studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Skłodowskiej-Curie w Lublinie. W 1986 r. uzyskał stopień doktora nauk na Słowackim Uniwersytecie Technicznym w Bratysławie, w 1992 r. obronił pracę habilitacyjną, a w 1999 r. uzyskał tytuł profesora nauk chemicznych. Odbył liczne staże naukowe w prestiżowych ośrodkach naukowych. Jest kierownikiem Katedry Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, a także Przewodniczącym Komitetu Chemii Analitycznej PAN, członkiem PAN i EASA. Specjalności – chemia środowiska, fizykochemia powierzchni, chemia analityczna, chromatografia, spektroskopia i inne metody separacyjne (HPLC, GC, CZE), adsorpcja, przygotowanie próbek.



<https://orcid.org/0000-0002-5482-7500>

### ABSTRACT

The one of the many scientific tasks carried out in Department of Environmental Chemistry and Bioanalytics is the development of methodologies concern antioxidant properties and biological activity of compounds (mainly cyclitols, fatty acids, flavonoids, polyphenolic acids and saponins) separated from raw plant materials and natural products. Such investigations, in general important for human health, was carried out as part of the project entitled: *Cultivated plants and natural products as a source of biologically active substances assign to the production of cosmetic and pharmaceutical products as well as diet supplements*, attributed by the National Center for Research and Development (2016–2021).

The aim of the project was to develop a strategy for the comprehensive use of native plant materials and dissemination of valuable herbal plants in various industries, with particular emphasis on cosmetics, medical devices, dietary supplements, and as livestock feed and a source of biomass. Another important aspect was/is the use of the local potential of plant cultivation, taking into account the Polish production of plant material (limitation of import). Selected plant materials will be both nutritional value and the presence of biologically active ingredients, as well as treating the plant biomass as a renewable source of energy. The proposed technological solutions are located in the area of "green chemistry", an important aspect for the proecology. The plant materials which meet the aforementioned criteria and due to the presence of important active ingredients are: lucerne (*Medicago sativa* L.), liquorice (*Glycyrrhiza glabra*), *Lepidium sativum* and goldenrod (*Solidago* sp.), buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*), rape and kale, lacy phacelia, (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) as well as camelina (*Camelina sativa* L.). An implementation of the proposed research project was proceeded in different directions, based on the cooperation of research institutions with cosmetics and pharmaceutical industries, herbs and beekeepers from across Poland.

Keywords: biologically active compounds, extraction, analysis of plant extracts

Słowa kluczowe: związki biologicznie aktywne, ekstrakcja, analiza ekstraktów roślinnych

---

---

## WPROWADZENIE

*„Niechaj pożywienie będzie lekarstwem,  
a lekarstwo pożywieniem,,*

Hipokrates z Kos  
(ok. 460–370 p.n.e.)

Znane od stuleci dobroczynne właściwości warzyw, owoców, ziół i przypraw oraz produktów naturalnych, takich jak miód i produkty pszczele, to wciąż bagatelizowany przez konsumentów, aspekt naszego życia. Dlatego niesłabnące zainteresowanie naukowców tematyką surowców roślinnych i produktów naturalnych, pozwala poszerzać wiedzę w tej dziedzinie i uzupełniać wiadomości, które będą służyły następnym pokoleniom. Takie wyzwania są codziennością dla Zespołu z Katedry Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii, UMK w Toruniu. Stąd też w ramach Konsorcjum Plantarum, którego liderem jest Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, wiodąca uczelnia w województwie kujawsko-pomorskim, prowadzono prace badawcze nad innowacyjnym wykorzystaniem rodzimych surowców roślinnych oraz produktów naturalnych, w pozyskiwaniu cennych składników biologicznie aktywnych i ich zastosowaniu do produkcji preparatów kosmetycznych, wyrobów medycznych i suplementów diety.

Celem Projektu Plantarum (pt. *„Rośliny uprawne oraz produkty naturalne jako źródła substancji biologicznie aktywne przeznaczone do produkcji preparatów kosmetycznych, farmaceutycznych i suplementów diety”* okres realizacji 2016–2021), było przygotowanie strategii kompleksowego wykorzystania surowców roślinnych i wartościowych roślin zielarskich, w różnych gałęziach przemysłu, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości wykorzystania ich jako preparaty kosmetyczne, wyroby medyczne, suplementy diety oraz jako karma dla zwierząt hodowlanych i źródło biomasy. Realizacja podjętych badań przebiegła wielokierunkowo, w oparciu o współpracę instytucji naukowo-badawczych, przedsiębiorstw, producentów ziół i drobiu oraz pszczelarzy z terenu całej Polski, a w szczególności z województwa kujawsko-pomorskiego. Zgodnie z założeniami projektu realizowano czternaście zadań z zakresu prac badawczych oraz przygotowania do wdrożenia. Kryterium wyboru surowców roślinnych były zarówno wartości odżywcze, występowanie składników biologicznie aktywnych, jak i potraktowanie biomasy roślinnej jako źródło energii odnawialnej. Oczekiwany efektem realizowanych zadań było w głównej mierze wytworzenie na bazie surowców roślinnych nowych wyrobów medycznych i kosmetycznych oraz suplementu diety, opracowanie innowacyjnych dodatków do mieszanek paszowych i nawozów, a także wykorzystanie biomasy roślinnej jako materiału energetycznego. Badania nad wyselekcjonowaniem rodzimych surowców roślinnych, bogatych w substancje biologicznie aktywne oraz pozyskanie substancji biologicznie aktywnych w czystej formie, na drodze wieloetapowych prac eksperymen-



talnych oraz oryginalnej technologii, pozwoliły wykorzystać w sposób praktyczny takie grupy związków jak: **cyklitole, kwasy tłuszczowe, flawonoidy, kwasy polifenolowe i saponiny** [1-13]. Badania naukowe polegały na opracowaniu metodyk wyodrębniania i pozyskiwania związków biologicznie aktywnych z roślin z rodziny bobowatych (lucerna, kozieradka), astrowatych (nawłóć), kapustowatych (rzeżucha, kapusta, lnianka, rzepak, brokuł), rdestowatych (gryka) i innych [14-20], co zostanie bardziej szczegółowo omówione w dalszej części pracy.

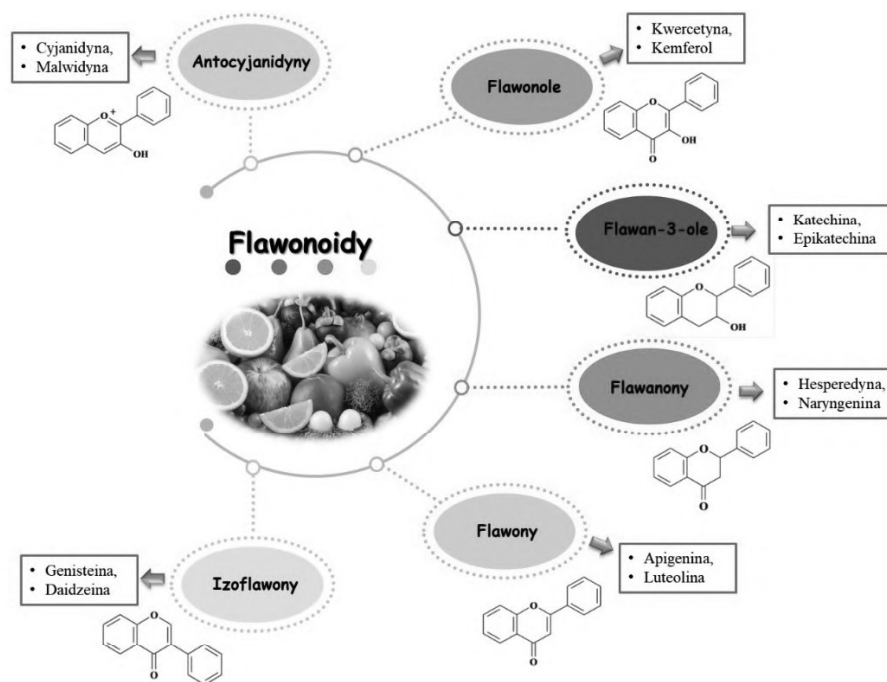
## 1. SUROWCE ROŚLINNE JAKO ŹRÓDŁO ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH

Za prozdrowotne działanie preparatów otrzymanych z materiałów roślinnych tj. warzyw, owoców, ziół czy innych roślin zielonych odpowiedzialne są zawarte w nich związki biologicznie aktywne, do których należy bardzo wiele grup substancji chemicznych. Wpływ związków bioaktywnych na organizmy żywe jest złożony, ściśle związany z budową chemiczną oraz obecnością konkretnych grup funkcyjnych w strukturze. Wykazano, że związki bioaktywne działają na wolne rodniki, które wytwarzane w wyniku przemian metabolicznych powodują poważne uszkodzenia tkanek w organizmie żywym, degradują DNA, RNA a ich utlenienie jest bezpośrednią przyczyną rozwoju wielu chorób m.in. choroby Alzheimera, nowotwory itp. Związki biologicznie aktywne wykazują zdolność do redukcji ilości wolnych rodników, co przyczynia się do poprawy stanu zdrowia oraz spadku prawdopodobieństwa zachorowalności. W porównaniu do sztucznie syntezowanych antyoksydantów, te pochodzenia naturalnego będą zawsze bardziej cenione, gdyż ich użycie nie niesie za sobą niepożądanych skutków ubocznych [21-23].

Zagadnieniem współczesnej chemii analitycznej budzącym ogromne zainteresowanie jest analityka substancji biologicznie aktywnych izolowanych z roślin. Największą grupę związków bioaktywnych w roślinach stanowią polifenole - liczna i urozmaicona rodzina związków chemicznych, należących do metabolitów wtórnych roślinnych. Ze względu na budowę chemiczną polifenole dzielą się zasadniczo na dwie grupy: kwasy fenolowe i flawonoidy. Badania nad oddziaływaniem polifenoli na organizm ludzki wykazują, iż stanowią one ważne czynniki prozdrowotne, wykazujące m. in. działanie przeciwdrobnoustrojowe, antynowotworowe, przeciwutleniające i ochronne dla układu kostnego i krążenia. Z tego też względu polifenole często nazywane są fitaminami, czyli związkami pochodzenia roślinnego o działaniu zbliżonym do witamin. Ich biodostępność i przyswajalność jest większa w przypadku spożywania wraz z pokarmem [24-27].

Flawonoidy będące kolejną, a zarazem największą grupą polifenoli są związkami występującymi naturalnie w roślinach, gdzie spełniają funkcje przeciwutleniaczy, insektycydów, fungicydów i barwników. Wspólnym elementem

budowy flawonoidów są dwa aromatyczne pierścienie, pomiędzy które wpasowuje się pierścień piranu lub pironu. Różnice w rodzaju grup funkcyjnych przy tych pierścieniach są podstawą do podziału flawonoidów (Rys. 1). Flawonoidy wykazują szczególnie specyficzne działanie farmakologiczne i witaminopochodne. W przemyśle kosmetycznym wykorzystywane jest głównie ich silne działanie przeciwutleniające, w celu przedłużenia trwałości produktów kosmetycznych oraz zapobiegania przedwczesnemu starzeniu się skóry. Oprócz właściwości przeciwutleniających, flawonoidy wykazują również działanie przeciwzapalne, przeciwalergiczne, przeciwgrzybicze, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe. Ponadto, związki te są składnikami suplementów diety, stanowią nieodłączny element receptur kosmetyków i żywności funkcjonalnej [28-30].



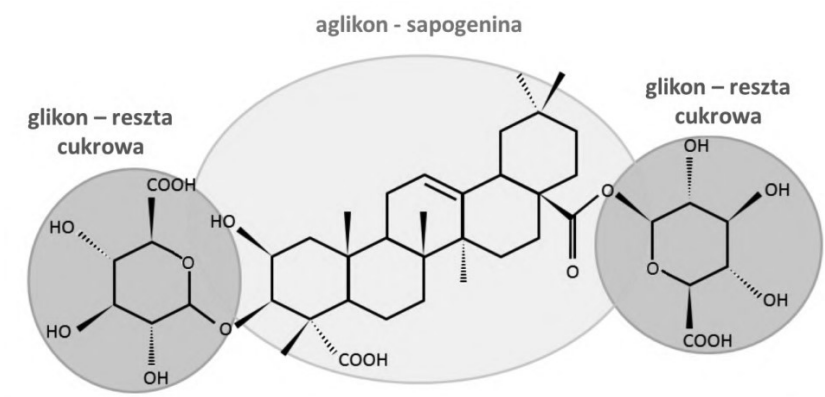
Rysunek 1. Grupy flawonoidów i ich przedstawiciele [1]

Figure 1. Groups of flavonoids and some examples [1]

Głównym problemem w pozyskiwaniu związków bioaktywnych stanowi ich niski poziom w materiale roślinnym, jak również trudności w ekstrakcji. Synteza i magazynowanie roślinnych substancji biologicznie aktywnych są procesami wieloetapowymi. Zachodzą one zarówno w wewnątrzkomórkowym systemie błonowym komórek roślinnych, jak i na terenie ścian komórkowych [31]. Stąd,

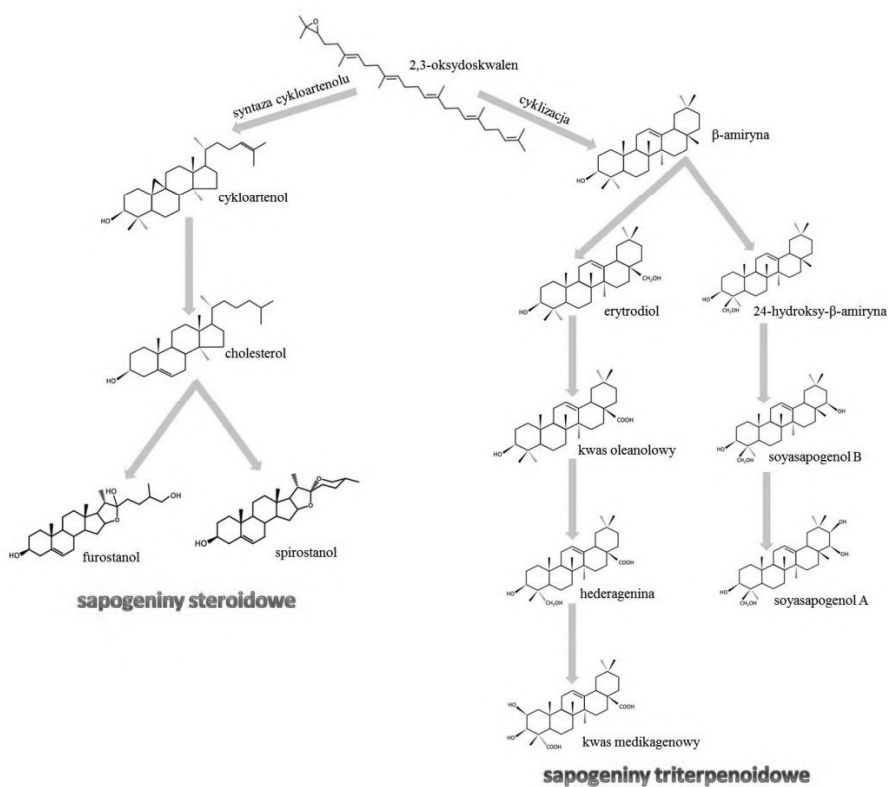
część związków biologicznie aktywnych jest zlokalizowana wewnątrzkomórkowo, a część związana jest za pomocą słabych oddziaływań m.in. hydrofilowych lub wiązań wodorowych ze składowymi ścian komórkowych m.in. pektynami, celulozą i hemicelulozą. W przypadku flawonoidów są one kowalencyjnie połączone wiązaniem glikozydowym z ugrupowaniami cukrowymi poprzez grupę -OH lub przez wiązania węgiel-węgiel. W związku z tym trudno jest je wyizolować za pomocą konwencjonalnych technik ekstrakcji z zastosowaniem tradycyjnych rozpuszczalników [32]. Tradycyjne metody ekstrakcji i oczyszczania mają wiele wad, które ograniczają pełne wykorzystanie produktów naturalnych. Są to m.in. niska wydajność oraz długi czas ekstrakcji, jak również produkt końcowy często zawiera śladowe ilości rozpuszczalników organicznych, które obniżają jakość produktu. Dlatego tak ważne jest opracowanie skutecznej i selektywnej metody ekstrakcji niekonwencjonalnej związków bioaktywnych. [15, 32-33].

Kolejną ważną grupą związków bioaktywnych występujących w roślinach są saponiny. Saponiny to naturalne związki z grupy steroidów i triterpenoidów. Zaliczane są do grupy glikozydów. Składają się z części bezcukrowej - wielopierścieniowego aglikonu pochodzenia izoprenoidalnego (sapogenina) i związanych kowalencyjnie od jednej do kilku cząsteczek cukru (glikonu). Budowę saponin przedstawia Rys. 2. Liczba i długość przyłączonych łańcuchów sacharydowych determinują różnicowanie strukturalne tych związków. Długość łańcucha waha się od 1 do 11 reszt cukrowych, przy czym łańcuchy od 2 do 5 reszt są najczęściej spotykane. Glikony tworzą glukozę, galaktozę, ramnozę, ksylozę, fukozę, arabinozę, rzadziej kwas galakturonowy i glukuronowy. Dodatkowo wyróżnia się łańcuchy liniowe, jak i rozgałęzione. Mogą występować dwa lub trzy oddzielne łańcuchy cukrowe, stąd też saponiny o jednym łańcuchu nazywa się monodesmozydami, o dwóch – bidesmozydami, a o trzech – tridesmozydami.



Rysunek 2. Wzór strukturalny saponin na przykładzie 3-GlcA-28-GlcA-kwasu medikagenowego [1]  
Figure 2. Structural pattern of saponins and an example 3-GlcA-28-GlcA-medikagenic acid [1]

Aglikony (sapogeniny) pochodzą od 30-węglowego 2,3-oksydoskwalenu, który jest głównym metabolitem w biosyntezie steroli (Rys. 3). Saponiny triterpenoidowe są syntetyzowane z 2,3-oksydoskwalenu ulegającego cyklizacji do aglikonów triterpenowych, które zachowują wszystkie 30 węgli w swojej strukturze. Sapogeniny steroidowe pochodzą zaś ze związków pośrednich na szlaku przemian fitosteroli. Podczas syntezy steroidowy aglikon traci trzy grupy metylowe dając 27-węglowy szkielet. Cykloartenol jest prekursorem biosyntezy steroli u roślin. Cholesterol jest zaś prekursorem do syntezy saponin i glikoalkaloidów steroidowych.



Rysunek 3. Biosynteza dwóch rodzajów sapogenin [34]

Figure 3. Biosynthesis of two types of sapogenins [34]

Saponiny występują głównie (ale nie wyłącznie) w roślinach. Spotykane są także u zwierząt morskich. Kumulują się w sposób specyficzny dla danej części morfologicznej rośliny, a na ich zawartość wpływają czynniki rozwojowe. Wyizolowano różne rodzaje saponin z korzeni, łodyg, kory, liści, nasion, owoców,

kwiatów oraz z całych roślin. W wielu roślinach są syntetyzowane i przechowywane głównie w częściach podziemnych. Wpływa to na zróżnicowaną syntezę saponin, a także determinuje ich odrębne funkcje biologiczne. Do głównych właściwości saponin zalicza się działanie grzybobójcze, przeciwbakteryjne, cytotoksyczne, nicieniobójcze, przeciwwirusowe oraz antynowotworowe [14, 35]. Duża różnorodność struktur syntetyzowanych naturalnie i szerokie spektrum działań biologicznych pozwala zastosować saponiny w przemyśle farmaceutycznym (właściwości wykrztuśne i rozszerzające oskrzela, obniżanie poziomu cholesterolu), kosmetycznym (zdolność pienienia saponin spowodowana jest przez połączenie hydrofobowej sapogeniny i hydrofilowej części cukrowej), spożywczym (środki konserwujące, powierzchniowoczynne czy emulgatory), rolniczym i przemyśle ogrodnictwem w związku z ochroną roślin uprawnych [12, 34-38]. Saponiny wykazują interesujące działania w zastosowaniach klinicznych i są często oceniane pod kątem potencjalnych nowych terapii (Rys. 4).



Rysunek 4. Aktywność biologiczna saponin w komórkach zwierzęcych  
Figure 4. Biological activity of saponins in animal cells

## 2. METODY WYODRĘBNIANIA I OZNACZANIA WYBRANYCH ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH

Ekstrakcja i oznaczanie związków biologicznie aktywnych są skomplikowane i stanowią wyzwanie ze względu na różnorodność strukturalną wynikającą z występowania grup -OH, -CH<sub>3</sub> lub -COOH w strukturze aglikonu. Dodatkowo utrudnia to liczba, rozmieszczenie i orientacja reszt cukrowych, a także ilość i typy

dołączonych łańcuchów cukrowych. W większości przypadków wspomniane anality są związkami nielotnymi, nietrwałymi chemicznie i termicznie. W roślinach znajdują się w niskich stężeniach w postaci mieszanin związków podobnych strukturalnie i o podobnej polarności, co także znacząco utrudnia ich rozdzielanie. Kilka stosowanych metod ekstrakcji i oznaczania przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Stosowane metody ekstrakcji i oznaczania saponin w materiale roślinnym

Table 1. Applied methods used for the extraction and determination of saponins in plant material

Metody ekstrakcji	Metody oznaczania
maceracja	HPLC/DAD
ekstrakcja wspomagana ciśnieniem i temperaturą	HPLC/UV
ekstrakcja wspomagana mikrofalami	HPLC/ELSD
ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami	GC/FID
ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym	LC/MS
ekstrakcja w aparacie Soxhleta	GC/MS
ekstrakcja pod chłodnicą zwrotną	

## 2.1. EKSTRAKCYJA NADKRYTYCZNYM DITLENKIEM WĘGLA

Większość związków biologicznie aktywnych obecnych w roślinie jak i preparatach z niej otrzymanych, jest wrażliwa na czynniki zewnętrzne takie jak temperatura czy pH środowiska. Dlatego, w ramach Projektu Plantarum, podejmując próbę efektywnego pozyskania substancji bioaktywnych z materiału roślinnego, należało tak dobrać metodę ekstrakcyjną, aby nie powodowała ona degradacji naturalnego profilu najważniejszych biokomponentów rośliny. Jedną z takich technik, należących do grupy metod niekonwencjonalnych, wykorzystanych w Projekcie, była ekstrakcja czystym ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym (scCO<sub>2</sub>). Technika ta ze względu na niepolarny charakter scCO<sub>2</sub> do tej pory znajdowała szerokie zastosowanie w procesie separacji związków lipidowych z materiałów roślinnych, o czym świadczy bogactwo krajowych jak i zagranicznych publikacji [1, 12, 13, 15, 17, 21]. W ramach realizacji projektu Plantarum rozwinęliśmy tę technikę o ekstrakcję bardziej polarnych związków biologicznie aktywnych takich jak związki fenolowe i flawonoidy. Zaletą CO<sub>2</sub> jako rozpuszczalnika, jest niska wartość jego punktu krytycznego, tj. punktu powyżej którego ditlenek węgla przechodzi w stan nadkrytyczny, w którym przyjmuje właściwości uśrednione pomiędzy stanem gazowym i ciekłym (Tab. 2): ciśnienie krytyczne - 73,8 bar, temperatura krytyczna - 31,3°C. Dzięki tak niskim warto-

ściom, efektywny proces ekstrakcji może być prowadzony w obszarze niskich oraz średnich temperatur, co pozwala na ekstrakcję termolabilnych związków bioaktywnych. Dodatkowo ditlenek węgla, jako obojętne medium, nie reaguje z pozyskanymi związkami, dzięki czemu naturalna kompozycja ekstraktu zostaje zachowana. Ponadto, CO<sub>2</sub> jest przyjazny środowisku (*GRAS - Generally Regarded As Safe*), nie zanieczyszcza produktu końcowego, gdyż w warunkach otoczenia przechodzi w stan gazowy, samoistnie opuszczając środowisko procesu. Ditlenek węgla powstaje jako produkt uboczny w wielu procesach przemysłowych i może być łatwo zwracany do innego cyklu produkcyjnego, jest tani i łatwo dostępny.

Efektywny proces ekstrakcji, z konkretnym zamierzonym rezultatem, w ramach którego pozyskano między innymi ekstrakty z lucerny siewnej i nawłoci olbrzymiej, musiał zostać wcześniej zoptymalizowany. Mechanizm ekstrakcji płynem nadkrytycznym jest złożony. Skuteczność ekstrakcji determinowana jest przez transport masy substancji ekstrahowanej z powierzchni rośliny, następnie jej głębszych warstw, a finalnie z powierzchni kontaktu faz do rozpuszczalnika. Siła elucyjna danego rozpuszczalnika, a tym samym jego zdolność do selektywnego ekstrahowania materiału roślinnego, zależy od jego gęstości, ta z kolei zależy od wartości temperatury i ciśnienia procesu. Zmianą parametrów procesu, tj. temperatury i ciśnienia można wpłynąć na dyfuzję rozpuszczalnika jak i ekstrahowanych cząstek, lepkość czy napięcie powierzchniowe, które mogą znacznie ułatwić przenoszenie masy z materiału roślinnego. Stąd, kluczowe jest dobranie parametrów procesu, aby w jak najkrótszym czasie otrzymać najwyższą wydajność procesu czy maksymalną zawartość wybranych grup związków bioaktywnych przy optymalnych wartościach temperatury oraz ciśnienia.

Materiałem przeznaczonym do badań procesu ekstrakcji czystym nadkrytycznym ditlenkiem węgla była nawłoc olbrzymia (*Solidago gigantea* Ait.) oraz lucerna siewna (*Medicago sativa* L.). Nawłoc jest rośliną powszechnie rosnącą na terenach naszego kraju, dotychczas nie wykorzystaną gospodarczo w uprawach rolnych. Zaletą tej rośliny jest to, że jest ona bogata w związki biologicznie aktywne. Wykazano, że ekstrakty z liści nawłoci bogate są w związki fenolowe, taniny oraz flawonoidy, dzięki czemu wykazują aktywność antyoksydacyjną oraz mikrobiologiczną, przeciw takim bakteriom jak *Listeria monocytogenes* czy *Staphylococcus aureus*. Dodatkowo ekstrakty otrzymane przy wysokich ciśnieniach wykazały wysoką aktywność przeciw *Salmonella* spp. [40]. Substancjami czynnymi zawartymi we wszystkich gatunkach nawłoci są: flawonoidy (kwercetyna, rutyna, astragalina), olejki eteryczne, garbniki pirokatechinowe, żywice i śluzu [39, 21-23]. Liczne badania dowodzą, że zawarte związki czynne w liściach, łodygach oraz kwiatach nawłoci wykazują działanie przeciwutleniające (*antioxidant*), przeciwbakteryjne (*antimicrobial*), przeciwgrzybiczne (*antifungal*), przeciwzapalne (*anti-*

*inflammatory*), hipotensyjne (*antihypertensive*), przeciwnowotworowe (*antitumor*), chroniące pracę serca (*cardioprotective*), hamujące skurcze mięśni (*spasmolytic*) oraz moczopędne (*diuretic effects*) [40, 41]. Z kolei lucerna siewna jest rośliną uznawaną za tanie źródło białka. Poza białkiem bogata jest ona w metabolity wtórne takie jak flawonoidy, w tym m.in. medikarpinę, genisteinę czy daidzeinę oraz saponiny takie jak hederagenina oraz sojasapogenol. Ponadto, w ekstrakcie znajdują się inne grupy związków bioaktywnych: chlorofile, witaminy (C, E, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> oraz B<sub>12</sub>) czy  $\beta$ -karoten. Dzięki zawartości tych substancji ekstrakty z lucerny wykazują działanie przeciwwgrzybicze, przeciwbakteryjne (*anti-bacterial*), owadobójcze (*insecticidal*) czy nicieniobójcze (*nematicidal*) [42].

Jak wspomniano wcześniej, zaletą płynu nadkrytycznego jest to, że posiada właściwości uśrednione, odpowiadające obu stanom skupienia w jakich danym rozpuszczalnik może występować naturalnie, w przypadku ditlenku węgla jest to gaz oraz ciecz (Tab. 2). Gęstość ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym jest zbliżona do gęstości cieczy, dzięki temu ma on wysoką siłę wymywania związków z materiału roślinnego. Z drugiej strony jego lepkość i współczynnik dyfuzji zbliżone są do parametrów odpowiadających stanowi gazowemu, przez co napięcie powierzchniowe jest pomijalnie małe, co z kolei umożliwia szybkie przenikanie płynu przez złożę i finalnie skutkuje większą wydajnością procesu osiągniętą w krótszym czasie ekstrakcji [43-45].

Tabela 2. Właściwości fizyczne ditlenku węgla w różnych stanach skupienia  
Table 2. Properties of carbon dioxide in different states of aggregation

Parametr	Właściwości fizyczne CO <sub>2</sub>		
	gaz	płyn w stanie nadkrytycznym	ciecz
Gęstość, $\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	10 <sup>-3</sup>	0,3	1
Współczynnik dyfuzji, D (cm <sup>2</sup> /s)	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-3</sup>	5×10 <sup>-6</sup>
Lepkość, $\eta$ (g/cm·s)	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>

Zaletą płynów będących w stanie nadkrytycznym jest ich wysoka selektywność. Posiadają zdolność wybiórczego rozpuszczania związków o tej samej lotności, ale różnej strukturze chemicznej. Selektywność separacji związków zawartych w materiale roślinnym zależy od jego składu, struktury molekularnej, właściwości cząstek, a także parametrów ekstrakcji: temperatury, ciśnienia oraz właściwości rozpuszczalnika. Selektywność związana jest z rozpuszczalnością, im większa rozpuszczalność tym mniejsza selektywność. Jednak w przypadku SFE zależność selektywność–rozpuszczalność jest bardziej złożona. Dla wielkocząsteczkowych związków, jakimi są związki bioaktywne, selektywność rośnie z ciśnieniem w obszarze niskich jego wartości, osiągając maksimum, po



czym maleje wraz z dalszym wzrostem ciśnienia. Kluczem do efektywnego pozyskania bioaktywnych składników matryc roślinnych jest więc optymalizacja warunków procesu, tj. temperatury oraz ciśnienia.

Ponadto, szybkość przepływu rozpuszczalnika również wpływa na wydajność procesu, zbyt duża wartość przepływu może powodować odrywanie się od matrycy substancji nierozpuszczalnych w rozpuszczalniku bądź cząstek stałych, co skutkuje zawyżeniem wydajności. Jednocześnie obserwuje się rozcieńczenie układu, gdyż ilość wyekstrahowanych substancji czynnych przelicza się na zawyżoną masę ekstraktu. Stąd, trzecim parametrem optymalizowanym w ramach realizacji badań było natężenie przepływu rozpuszczalnika.

W ramach projektu Plantarum do celów optymalizacji wykorzystano metody matematyczno-statystyczne, ze względu na to, iż zapewniają one krótszy czas pracy, mniejsze zużycie materiałów roślinnych i rozpuszczalników, a finalnie niższy sumaryczny koszt procedury optymalizacyjnej. W przypadku badań projektowych wykorzystany został plan Boxa-Behnken'a, gdzie analizowano wpływ trzech zmiennych niezależnych tj. temperatury, ciśnienia oraz natężenia przepływu ditlenku węgla przez materiał roślinnych, na wybrane kryteria. Kompletny plan składał się z 15 eksperymentów w różnych warunkach, gdzie do późniejszej interpretacji danych zastosowano metodologię powierzchni odpowiedzi oraz analizę wariancji. Tak prowadzona procedura, umożliwiła uzyskanie optymalnych wartości parametrów procesu zapewniających maksymalną odpowiedź założonego kryterium.

W ramach realizacji projektu, powodzeniem zakończyła się optymalizacja warunków ekstrakcji ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym luczny oraz nawłoci, ze względu na maksymalną wydajność procesu, jak również maksymalną zawartość wybranych grup związków biologicznie aktywnych: całkowitą zawartość polifenoli oraz flawonoidów, lipidów w tym kwasów tłuszczowych czy chlorofili. Potwierdzono między innymi, że skład końcowego ekstraktu zależy od warunków procesu, jak również to iż z wykorzystaniem metod matematyczno-statystycznych możliwe jest przeprowadzenie procesu ekstrakcji, tak aby wzbogacić ekstrakt w wybrane grupy związków bioaktywnych. Jest to szczególnie ważne, z punktu widzenia dalszego ich zastosowania w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym czy spożywczym [16-18].

## 2.2. EKSTRAKcja WSPOMAGANA ENZYMAMI

Nowoczesna nauka i technologia pomogły przemysłowi spożywczemu, kosmetycznemu i innym przemysłom niespożywczym, w poprawie jakości produktów poprzez dostarczanie zaawansowanych urządzeń i składników. Aby sprostać pojawiającym się wymaganiom, potrzebne są nowe zaawansowane techno-

logie ekstrakcji. Ekstrakcja wspomagana enzymami to najnowsze podejście do ekstrakcji bioskładników z materiałów roślinnych. Metoda ta wykorzystuje enzymy degradujące ściany komórkowe takie jak pektynazy, celulazy, glukanazy oraz ksylanazy. Ekstrakcja wspomagana enzymatycznie jest doskonałą alternatywą dla konwencjonalnych technik ekstrakcji ze względu na wydajność, łagodne warunki prowadzonych procesów, jak również niską toksyczność dla środowiska. Metody ekstrakcji z zastosowaniem enzymów zaliczane są do obszaru tzw. „zielonej chemii”, ponieważ ograniczają zużycie toksycznych rozpuszczalników oraz energii niezbędnej do izolacji związków biologicznie aktywnych [11, 46].

Enzymy były używane od setek lat, a dziś ich stosowanie jest prawie nieograniczone. Historyczne zastosowania enzymów do produkcji piwa, wina, sera i chleba są eleganckimi przykładami przemysłowego wykorzystania ich mocy i selektywności. Enzymy są idealnymi katalizatorami wspomagającymi ekstrakcję, modyfikację lub syntezę złożonych bioaktywnych związków pochodzenia naturalnego. Ekstrakcja wspomagana enzymami opiera się na zdolności enzymów do katalizowania reakcji o wyjątkowej specyficzności, selektywności i zdolności do funkcjonowania w łagodnych warunkach przetwarzania. Metoda ta otwiera drogę do zastosowania łagodniejszych, mniej toksycznych rozpuszczalników, dzięki czemu ekstrakty będą mogły być wykorzystywane na szerszą skalę w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Zastosowane w ramach realizacji projektu Plantarum enzymy mają zdolność degradacji lub niszczenia ścian komórkowych, umożliwiając w ten sposób lepsze uwalnianie i bardziej wydajną ekstrakcję substancji bioaktywnych [47].

Zastosowanie hydrolizy enzymatycznej przed ekstrakcją może poprawić efektywność ekstrakcji dzięki lepszemu przenoszeniu masy, zmniejszeniu wielkości cząstek, zwiększeniu powierzchni kontaktu i poprawie dystrybucji rozpuszczalnika. Ponadto, trawienie enzymatyczne surowca skutkuje zmniejszeniem zużycia rozpuszczalnika, a także skróceniem czasu ekstrakcji [48-51]. Jednakże, główną wadą tej metody jest trudność w doborze odpowiednich warunków reakcji enzymatycznej. Skuteczność prowadzonych procesów enzymatycznych zależy w dużej mierze od rodzaju zastosowanego enzymu lub mieszanki enzymów oraz doboru optymalnych warunków ich działania (pH, siły jonowej, temperatury). Dla przykładu, celulaza jest skutecznym enzymem w ekstrakcji związków fenolowych z wyciągów winogron. Natomiast preparaty enzymatyczne z celulazą oraz beta glukozydazą zastosowane oddzielnie znacząco podnoszą wydajność ekstrakcji związków polifenolowych z liści guawy. Z literatury znany jest synergistyczny wpływ dwóch preparatów enzymatycznych: jednego wykazującego aktywność pektynazy oraz drugiego, wykazującego aktywność celulazy, w ekstrakcji soku winogronowego z winorośli lisiej (*Vitis labrusca* L.). Zastosowana mieszanina

poprawia wydajność pozyskiwania soku winogronowego oraz prowadzi do wzrostu zawartości związków polifenolowych [51-53].

Koszt enzymu jest jedną z głównych przeszkód na drodze do komercjalizacji zastosowania technologii enzymatycznej [11]. Jednakże, znany jest preparat wieloenzymatyczny zawierający ksylanazę, beta-glukanazę, celulazę, amylazę i proteazę, który poprawia skuteczność ekstrakcji związków polifenolowych z pozostałości po parzeniu czarnej herbaty oraz ze zmielonego materiału roślinnego lucerny siewnej. Preparat ten jest powszechnie stosowany w przemyśle rolnym w celu poprawy strawności pasz dla zwierząt. Jest niedrogi i dostępny w dużych ilościach. Z tego powodu można go zastosować na skalę przemysłową w celu poprawy wydajności ekstrakcji [11, 46].

W dzisiejszych czasach coraz większym zainteresowaniem cieszy się sprzężenie techniki ekstrakcji wspomaganej enzymami z innymi niekonwencjonalnymi technikami ekstrakcji, które pomagają w uzyskaniu dobrej wydajności i jednocześnie wymaganej selektywności, czyniąc proces bardziej ekologicznym. Stosowanie enzymów w przemyśle spożywczym i biotechnologicznym do ekstrakcji jest ekonomicznie efektywne i stanowi postęp w nowoczesnych procesach technologicznych [46].

## UWAGI KOŃCOWE












Podsumowując, wiedza jaką zgłębiano w trakcie realizacji Projektu Plantarum, pozwoliła na wyciągnięcie daleko idących wniosków, dostarczyła nowych informacji o właściwościach ekstraktów pozyskiwanych z roślin i miodu [3, 5, 9, 10, 54, 55], a przede wszystkim otworzyła nowe możliwości wykorzystania składników występujących w pozyskanych ekstraktach (związki biologicznie aktywne), w takich dziedzinach jak: medycyna, farmacja i kosmetyka (Tab. 3).






Finalnie w Projekcie, dokonano klasyfikacji wybranych surowców roślinnych, wskazano składniki mające wartość odżywczą, określono ich właściwości fizykochemiczne i biologiczne. Podjęto próby określenia zależności między sposobem uprawy a jakością plonów, z uwzględnieniem hodowli roślin o dedykowanych i zwiększonych zawartościach substancji biologicznie aktywnych. Ważnym etapem były badania nad przygotowaniem wyrobu medycznego wspomagającego proces leczenia zmian łuszczykowych, gdzie jako substancję czynną zastosowano, należący do cyklitolii, D-chiro-inozytol. Na bazie ekstraktu z lucerny opracowano suplement diety wspomagający leczenie poważnych chorób cywilizacyjnych tj. dyslipidemii oraz miażdżycy. Pozostałości poekstrakcyjne z surowców roślinnych (lucerna, nawłóć), wykorzystano w opracowaniu innowacyjnych dodatków do mieszanek paszowych dla zwierząt hodowlanych oraz jako dodatek do nawozów mikroelementowych przeznaczo-

nych dla rolnictwa. Przetworzona biomasa roślinna, jak to zostało udowodnione, może być z powodzeniem wykorzystywana jako materiał wysokoenergetyczny (w postaci pelletu), a tym samym jest źródłem energii odnawialnej.

Tabela 3. Właściwości i możliwości wykorzystania związków biologicznie aktywnych, pochodzenia roślinnego lub wyodrębnionych z ekstraktów z produktów naturalnych; opracowanie własne, częściowo wg [56]

Table 3. Properties and applications of biologically active compounds from plant origin or extracted from natural products; own study, partly according to [56]

Źródła związków biologicznie aktywnych - surowce roślinne i produkty naturalne	Obszary działania	
<p style="text-align: center;"><b>Cyklitole, flawonoidy, kwasy polifenolowe i saponiny</b> występowanie: owoce, warzywa, zioła, przyprawy, miód, produkty pszczele, preparaty ziołowe, napary, odwary, octy aromatyczne, nalewki (tinkury), maceraty</p> 	Poprawiają funkcje dróg oddechowych (klirens śluzoworzęskowy)	
	Ułatwiają odkrztuszanie i łagodzą kaszel	
	Poprawiają przepuszczalność naczyń	
	Wykazują właściwości przeciwwirusowe	
	Wykazują właściwości przeciwzapalne	
	Zwiększają fagocytozę	
	Poprawiają wydolność płuc	
	Zmiatają wolne rodniki (właściwości przeciwutleniające)	
	Pozytywnie wpływają na mikrobion jelitowy	
	Poprawiają wydolność organizmu (krótszy czas leczenia pacjentów)	

	Wpływają na zmniejszenie liczby infekcji	
	Wspomagają odporność organizmu na infekcje bakteryjne i wirusowe	
	Zmniejszają insulinooporność	
	Poprawiają jakość snu	

Biorąc pod uwagę potrzebę wprowadzania nowych rozwiązań, w Polsce i na świecie prowadzona jest polityka innowacyjności, zmierzająca ku temu, aby rozwój gospodarczy był bardziej efektywny poprzez wspieranie nowatorskich rozwiązań opracowanych przez naukowców, ale także poprzez właściwe zarządzanie przedsiębiorstwami i wprowadzanie nowych technologii. Najbardziej sprawdzoną formułą wsparcia innowacyjności jest współpraca ośrodków naukowych z przedsiębiorstwami. Taka wizja rozwoju dotyczy również położonego w środkowej części Polski, województwa kujawsko-pomorskiego (Rys. 5). Istotnym dla rozwoju gospodarczego tego województwa jest dobrze rozwinięte rolnictwo, co ma związek z licznymi inwestycjami w przemysł spożywczy. Należy zwrócić szczególną uwagę na umiejscowienie na obszarze całego województwa gospodarstw zajmujących się produkcją owoców i warzyw, plantacji ziół i pasiek, które mogą być źródłem zaopatrzenia w Polsce i za granicą. Położenie geograficzne sprawia, że krzyżują się tu ważne szlaki transportowe, co ułatwia dostęp do rynków i dostawców polskich oraz zagranicznych. Dobry jest także dostęp do jednostek medycznych i uzdrowiskowo-sanatoryjnych. Liczne zabytki, a wśród nich zespół staromiejski Torunia, który został wpisany na Listę światowego dziedzictwa UNESCO oraz walory przyrodnicze, stwarzające doskonałe możliwości dla rozwoju turystyki. Kujawsko-pomorskie to także tradycje przemysłowe i rozwój takich gałęzi jak: przemysł chemiczny, środków transportu, elektroniki, nawozów azotowych i tworzyw sztucznych. Warunki środowiskowe sprzyjają również rozwojowi energetyki odnawialnej. Województwo kujawsko-pomorskie posiada bogate zaplecze naukowo – badawcze. Istotnym dla rozwoju województwa jest obecność wiodących ośrodków naukowych, które wspierają

przepływ nowoczesnych rozwiązań z nauki do przemysłu. (m. in. program Zdrowa i bezpieczna żywność).



Rysunek 5. Strategia rozwoju województwa kujawsko-pomorskiego, opracowanie własne  
Figure 5. Kujawsko-Pomeranian Voivodeship development strategy, own study

### PODZIĘKOWANIA

Badania, których wyniki są opisane w tej pracy były finansowane ze środków grantu: „Rośliny uprawne oraz produkty naturalne jako źródła substancji biologicznie aktywnych przeznaczonych do produkcji preparatów kosmetycznych, farmaceutycznych i suplementów diety” (nr BIOSTRATEG2/298205/9/NCBR/2016) przyznanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, okres realizacji 2016-2021.

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Ligor, I.-A. Ratiu, A. Kielbasa, H. Al Suod, B. Buszewski, *Electrophoresis*, 2018, **39**, 1860.
- [2] H. Al-Suod, M. Ligor, I.-A. Račiu, K. Rafińska, R. Górecki, B. Buszewski, *Phytochem. Lett.*, 2017, **20**, 507.
- [3] H. Al-Suod, I.-A. Ratiu, M. Ligor, T. Ligor, B. Buszewski, *J. Sep. Scie.*, 2018, **41**, 1118.
- [4] I.-A. Ratiu, H. Al-Suod, M. Ligor, T. Ligor, V. Railean-Plugaru, B. Buszewski, *Electrophoresis*, 2018, **39**, 1966.
- [5] H. Al-Suod, I.-A. Ratiu, M. Ligor, T. Ligor, B. Buszewski, *J. Sep. Scie.*, 2018, **41**, 1118.
- [6] H. Al-Suod, P. Pomastowski, M. Ligor, V. Railean-Plugaru, B. Buszewski, *Phytochem. Anal.*, 2018, **29**, 528.

- [7] A. Owczarczyk-Saczonek, L.B. Lahuta, M. Ligor, W. Placek, R.J. Górecki, B. Buszewski, *Nutrients*, 2018, **10**, 1891.
- [8] H.H. Al-Suod, I.-A. Ratiu, R. Górecki, B. Buszewski, *J. Sep. Scie.*, 2019, **42**, 1265.
- [9] I.-A. Ratiu, H. Al-Suod, M. Ligor, T. Ligor, A. Krakowska, R. Górecki, B. Buszewski, *Food Anal. Meth.*, 2019, **12**, 1466.
- [10] I.-A. Ratiu, H. Al-Suod, M. Bukowska, M. Ligor, B. Buszewski, *Molecules*, 2020, **25**, 34.
- [11] A. Krakowska, K. Rafińska, J. Walczak, B. Buszewski, *Ind. Crops Prod.*, 2018, **124**, 931.
- [12] A. Kielbasa, A. Krakowska, K. Rafińska, B. Buszewski, *J. Sep. Scie.*, 2019, **42**, 465.
- [13] A. Kielbasa, A. Krakowska-Sieprawska, T. Kowalkowski, K. Rafińska, B. Buszewski, *J. Sep. Scie.*, 2020, **43**, 671.
- [14] K. Rafińska, P. Pomastowski, O. Wrona, R. Górecki, B. Buszewski, *Phytochem. Lett.*, 2017, **20**, 520.
- [15] A. Krakowska, K. Rafińska, J. Walczak, T. Kowalkowski, B. Buszewski, *J. AOAC Int.*, 2017, **100**, 1681.
- [16] O. Wrona, K. Rafińska, C. Możejki, B. Buszewski, *Ind. Crops Prod.*, 2019, **130**, 316.
- [17] O. Wrona, K. Rafińska, C. Możejki, B. Buszewski, *J. AOAC Int.*, 2017, **6**, 1624.
- [18] O. Wrona, K. Rafińska, C. Możejki, B. Buszewski, *Ind. Crops Prod.*, 2019, **142**, 111787.
- [19] K. Rafińska, P. Pomastowski, J. Rudnicka, A. Krakowska, A. Maruška, M. Narkutė, B. Buszewski, *Food Chem.*, 2019, **289**, 16.
- [20] B. Buszewski, K. Rafińska, A. Cvetanović, J. Walczak, A. Krakowska, J. Rudnicka, Z. Zeković, *Phytochem. Lett.*, 2019, **30**, 338.
- [21] A. Issaoui, H. Ksibi, M. Ksibi, *Arabian J. Chem.*, 2017, **10**, 3967.
- [22] K.A. Wojtunik-Kulesza, A. Oniszczuk, T. Oniszczuk, M. Waksmundzka-Hajnos, *Biomed. Pharmacother.*, 2016, **78**, 39.
- [23] S. Losada-Barreiro, C. Bravo-Díaz, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **133**, 379.
- [24] A. Krakowska, B. Buszewski, *Analityka*, 2016, **4**, 4.
- [25] S. Sasidharan, Y. Chen, D. Saravanan, K.M. Sundram, L. Yoga Latha, *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, 2011, **8**, 1.
- [26] R. Glinka, J. Góra, *Związki naturalne w kosmetyce*. Wydawnictwo Warsaw Voice Warszawa, 2000.
- [27] F. Shahidi, M. Naczk, *Phenolics in food and nutraceuticals*, CRC Press LLC, Boca Raton, 2004.
- [28] R.A. Baxter, *J. Cosmet. Dermatol.*, 2008, **7**, 2.
- [29] C. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, **20**, 933.
- [30] D. Raffa, B. Maggio, M.V. Raimondi, F. Plescia, G. Daidon, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **142**, 213.
- [31] T.M. Kutchan, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2005, **8**, 292.
- [32] S.S. Nadar, P. Rao, V.K. Rathod, *Food Res. Int.*, 2018, **108**, 309.
- [33] M. Puri, D. Sharma, C.J. Barrow, *Trends Biotechnol.*, 2012, **30**, 37.
- [34] T. Moses, K.K. Papadopoulou, A. Osbourn, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2014, **49**, 439.
- [35] J.M. Augustin, V. Kuzina, S.B. Andersen, S. Bak, *Phytochem.*, 2011, **72**, 435.
- [36] K. Jateczak, G. Gryniewicz, *Acta Biochim. Pol.*, 2014, **61**, 227.
- [37] Ch.Y. Cheok, H.A.K. Salman, R. Sulaiman, *Food Res. Int.*, 2014, **59**, 16.
- [38] G. Pappalardo, J.L. Lusk, *Food Qual. Prefer.*, 2016, **53**, 151.
- [39] M.A. Rostagno, J.M. Prado, *Natural product extraction principles and applications*, RSC Publishing, Brasil, 2013.
- [40] G. Paun, E. Neagu, C. Albu, G.L. Radu, *J. Herb. Med.*, 2016, **6**, 180.
- [41] M. Amtmann, *J. Food Compos. Anal.*, 2010, **23**, 122.
- [42] G. Bruner, *Gas extraction. An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes*, Springer-Verlag, New York, 1994.

- [43] R.B. Gupta, J.J. Shim, *Solubility in supercritical Carbon Dioxide*, CRC Press, Taylor & Francis Group, London, 2007.
- [44] M. Saito, Y. Yoshio, *Supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography for preparative separation*. Jasco Report Publisher, Hachioji, Tokyo, 1990.
- [45] B. Wenclawiak, *Analysis with supercritical fluids: extraction and chromatography*, Springer-Verlag, Berlin, 1992.
- [46] A. Krakowska-Sieprawska, K. Rafińska, J. Walczak-Skierska, B. Buszewski, *Molecules*, 2020, **25**, 2074.
- [47] K.C. Baby, T.V. Ranganathan, *Chemical Weekly*, 2013, **1**, 213.
- [48] Y.J. Fu, W. Liu, Y-G. Zu, M-H. Tong, Sh-M. Li, M-M. Yan, T. Efferth, H. Luo, *Food Chem.*, 2008, **111**, 508.
- [49] M. Mushtaq, B. Sultana, S. Akram, F. Anwar, A. Adnan, S.S.H. Rizvi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 3645.
- [50] J.H. Cho, B. Saurabh, O. Tae-Jin, H.J. Jong, *MBL*, 2013, **41**, 236.
- [51] B.B. Li, B. Smith, M.M. Hossain, *Sep. Purif. Technol.*, 2006, **48**, 189.
- [52] R. Gómez-García, G.C.G. Martínez-Ávila, C.N. Aguilar, *3 Biotech*, 2012, **2**, 297.
- [53] L. Wang, Y. Wu, Y. Liu, Z. Wu, *Molecules*, 2017, **22**, 1648.
- [54] B. Buszewski, M. Bukowska, M. Ligor, I. Staneczko-Baranowska, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2019, **26**, 34723.
- [55] M. Ligor, M. Bukowska, I.-A. Ratiu, R. Gadzała-Kopciuch, B. Buszewski, *Molecules*, 2020, **25**, 5817.
- [56] A. Tahir, M. Javed, Z. Hussain, *Int. J. Funct. Nutr.*, 2020, **1**, 1-6.

Praca wpłynęła do Redakcji 12 maja 2021 r.