

UNIwersytet PRZYRODniczy w LUBLINIE

Wydział Inżynierii Produkcji
Dyscyplina naukowa: inżynieria mechaniczna

mgr inż. Piotr Kamiński

Rozprawa doktorska

**Opracowanie podstaw technologii ekstraktów biologicznie aktywnych
z biomasy z użyciem wody w stanie podkrytycznym**

Ph.D. thesis title

**Development of the basis for the technology of biologically
active extracts from biomass using subcritical water**

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Podstaw Techniki

Promotor: Dr hab. inż. Zbigniew Kobus Prof. UP
Promotor pomocniczy: Dr Katarzyna Tyśkiewicz

Lublin, 2024 r.

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 06.12.2024 r.

Podpis promotora *Zbigniew Kobus*

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora oraz Promotora pomocniczego i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na pendrive wersją elektroniczną.

Data 06.12.2024 r.

Podpis autora *Piotr Kamiński*

PUBLIKACJE STANOWIĄCE ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

- P1 Kamiński P., Tyśkiewicz K., Fekner Z., Gruba M., Kobus Z.; “*The Influence of Subcritical Water Extraction Parameters on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Walnut (*Juglans regia L.*) Bark Extracts*”. Applied Sciences 2022, 12, 12490.
<https://doi.org/10.3390/app122312490>
(100 pkt. MNiSW, IF 2023: 2.8)
- P2 Kamiński P., Gruba M., Fekner Z., Tyśkiewicz K., Kobus Z.; „*The Influence of Water Extraction Parameters in Subcritical Conditions and the Shape of the Reactor on the Quality of Extracts Obtained from Norway Maple (*Acer platanoides L.*)*”. Processes 2023, 11, 3395.
<https://doi.org/10.3390/pr11123395>
(100 pkt. MNiSW, IF 2024: 2.8)
- P3 Kamiński P., Tyśkiewicz K., Fekner Z., Kobus Z., Gruba M.; „*The effect of reactor design and water extraction parameters under subcritical conditions on the quality of extracts from oak bark (*Quercus robur L.*)*”. Przemysł Chemiczny 103/6 (2024), 695-710.
[DOI: 10.15199/62.2024.6.5](https://doi.org/10.15199/62.2024.6.5)
(70 pkt. MNiSW, IF 2024: 0.5)

Artykuły stanowiące osiągnięcia naukowe przedstawiono w kolejności odpowiadającej głównym celom pracy. Punktację podano według listy czasopism punktowanych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW), a Impact Factor (IF) według Journal Citation Reports.

**Łączna punktacja publikacji naukowych wchodzących w skład
rozprawy doktorskiej wynosi 270 pkt. MNiSW, IF 6,1.**

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	5
ABSTRACT	7
1. Wprowadzenie	9
2. Problem i hipotezy badawcze	12
3. Metodyka badawcza	13
3.1. Materiał badawczy	13
3.2. Odczynniki	14
3.3. Plan eksperymentu	15
3.4. Przygotowanie ekstraktów do badań	16
3.5. Oznaczenia całkowitej zawartości polifenoli (TPC)	19
3.6. Oznaczenia całkowitej zawartości flawonoidów (TFC)	19
3.7. Oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej	19
3.8. Analiza chromatograficzna	20
4. Wyniki badań	22
4.1. Wydajność procesu ekstrakcji podkrytycznej	22
4.2. Całkowita zawartość polifenoli w badanych surowcach	23
4.3. Całkowita zawartość flawonoidów w badanych surowcach	30
4.4. Aktywność antyoksydacyjna (DPPH)	36
4.5. Analiza chromatograficzna związków polifenolowych w ekstraktach z kory czereśni (<i>Prunus avium</i> L.)	41
4.5.1. Zawartość apigeniny	43
4.5.2. Zawartość kwasu wanilinowego	44
4.5.3. Zawartość kwasu ferulowego	46
4.5.4. Zawartość kwasu p-kumarowego	47
4.5.5. Zawartość kwasu protokatechowego	49
4.6. Projekt konstrukcyjny celi ekstraktora ciśnieniowego	52
4.7. Projekt technologiczny instalacji do pozyskiwania substancji bioaktywnych w warunkach podkrytycznych	54
5. Wnioski	57
BIBLIOGRAFIA	59
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	61
OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI	65

STRESZCZENIE

Woda jest rozpuszczalnikiem, którego polarność zależy od parametrów procesu. Jest ona szczególnie przydatna do ekstrakcji związków chemicznych o dużym stopniu polarności, zwłaszcza z materiałów pochodzenia roślinnego. Ze względu na wyjątkowy charakter woda ciągle znajduje nowe zastosowania w technologiach ekstrakcji związków biologicznie aktywnych z surowców roślinnych. Związki polarne pochodzenia roślinnego stanowią ważną grupę antyoksydantów, są wykorzystywane w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym i paszowym. Zastosowanie ekstrakcji podkrytycznej wodą eliminuje użycie rozpuszczalników organicznych, wpływając na bezpieczeństwo, wysoką jakość oraz szerokie możliwości zastosowania ekstraktów roślinnych. Woda w stanie podkrytycznym umożliwia ekstrakcję zarówno substancji polarnych, jak i niektórych substancji niepolarnych. Zmiana parametrów procesowych istotnie wpływa na przebieg procesu ekstrakcji podkrytycznej.

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie podstaw technologii ekstraktów roślinnych wytwarzanych z biomasy przy użyciu wody w stanie podkrytycznym oraz przygotowanie projektu konstrukcyjnego ekstraktora ciśnieniowego w skali przemysłowej. Jednymi z najważniejszych kryteriów projektowych procesów technologicznych oraz dedykowanych im urządzeń są optymalne parametry procesowe, jak również optymalny kształt zastosowanych reaktorów. Odpowiednio dobrana technologia, jej parametry oraz poszczególne urządzenia pozwalają na pozyskanie pożądaných związków chemicznych w ekstraktach, przy minimalizacji nakładów inwestycyjnych i kosztów operacyjnych. Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie optymalnych parametrów prowadzenia procesu ekstrakcji substancji bioaktywnych z kory czterech gatunków drzew: czereśni (*Prunus avium* L.), orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.), klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) oraz dębu (*Quercus robur* L.). Badanymi zmiennymi procesowymi były temperatura rozpuszczalnika, wielkość frakcji surowca i czas trwania procesu. Badano również wpływ parametrów geometrycznych i kształtu celki ciśnieniowej na wydajność procesu ekstrakcji. Parametrami określającymi jakość ekstraktów pozyskanych przy różnych parametrach procesu były całkowita zawartość polifenoli, całkowita zawartość flawonoidów oraz aktywność antyoksydacyjna. W przypadku kory czereśni (*Prunus avium* L.) obserwowano wzrost wszystkich trzech parametrów określających jakość ekstraktu do osiągnięcia temperatury $140\pm 3^{\circ}\text{C}$, następnie obserwowano degradację jakości ekstraktu

objawiającą się spadkiem zawartości polifenoli, flawonoidów i aktywności antyoksydacyjnej. W przypadku kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) punktem granicznym (wzrost / spadek jakości ekstraktu) była temperatura 131,6°C, natomiast kory dębu (*Quercus* L.) 120±3,5°C. Badania ekstraktów z klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) wykazują wzrost zawartości polifenoli, flawonoidów i aktywności antyoksydacyjnej wraz ze wzrostem temperatury procesu w całym badanym zakresie zmienności tego parametru 110 do 170°C.

Badania wpływu wielkości frakcji surowca na całkowitą zawartość polifenoli, flawonoidów i aktywność antyoksydacyjną pozyskanych ekstraktów przy użyciu wody w warunkach podkrytycznych przeprowadzono na dwóch surowcach korze czereśni (*Prunus avium* L.) oraz orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.). W obu przypadkach wzrost wielkości frakcji surowca powodował spadek zawartości substancji bioaktywnych i aktywności antyoksydacyjnej.

W pracy przedstawiono również wyniki badań wpływu czasu trwania procesu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych na całkowitą zawartość polifenoli, flawonoidów i aktywność antyoksydacyjną pozyskanych ekstraktów. W przypadku kory czereśni (*Prunus avium* L.) zaobserwowano wzrost zawartości badanych substancji bioaktywnych i aktywności antyoksydacyjnej, natomiast w przypadku kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) spadek związany ze wzrostem czasu trwania procesu. Badania kory klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) i dębu (*Quercus robur* L.) nie wykazały istotnego statystycznie wpływu czasu trwania procesu na zawartość badanych substancji bioaktywnych i aktywności antyoksydacyjnej.

Badania wpływu parametrów geometrycznych i kształtu celki ciśnieniowej przeprowadzone przy użyciu kory dwóch gatunków drzew klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) i dębu (*Quercus robur* L.) nie wykazały istotnego statystycznie wpływu na wydajność procesu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych.

Wyniki przeprowadzonych prac badawczych przyczyniły się do usystematyzowania wiedzy na temat wpływu parametrów procesowych oraz geometrycznych celek ciśnieniowych na przebieg procesu ekstrakcji podkrytycznej oraz umożliwiły opracowanie założeń do konstrukcji ekstraktora ciśnieniowego. Rezultatem przeprowadzonych prac badawczych jest opracowanie projektu konstrukcyjnego celi ciśnieniowej o pojemności 40 dm³ oraz projektu technologicznego instalacji do pozyskiwania substancji bioaktywnych przy użyciu wody w warunkach podkrytycznych.

Słowa kluczowe: ekstrakcja, woda podkrytyczna, celi ekstrakcyjna, ekstraktor.

ABSTRACT

Water is a solvent with highly dependent polarity on the process parameters. It is particularly useful for the extraction of chemical compounds with a high degree of polarity, especially from plant materials. Due to its unique nature, water is constantly finding new applications in technologies for the extraction of biologically active compounds from plant materials. Polar compounds of plant origin are an important group of antioxidants, they are used in the food, cosmetics, pharmaceutical and feed industries. The application of subcritical water extraction eliminates the use of organic solvents, affecting the safety, high quality and wide range of applications of plant extracts. Subcritical water allows the extraction of both polar and some non-polar substances. A change in process parameters significantly affects the course of the subcritical extraction process.

The aim of this research was to develop the basis for the technology of plant extracts produced from biomass using subcritical water and to prepare an industrial-scale design of a extraction pressure cell. One of the most important design criteria for technological processes and dedicated equipment are optimal process parameters, as well as the optimal shape of the reactors used. Properly selected technology, its parameters and individual devices allow for the acquisition of the desired chemical compounds in extracts, while minimizing capital expenditures and operating costs. The conducted research allowed to determine the optimal parameters of the extraction process of bioactive compounds from the bark of four tree species: sweet cherry (*Prunus avium* L.), walnut (*Juglans regia* L.), norway maple (*Acer platanoides* L.) and oak (*Quercus robur* L.). The process variables studied were the solvent temperature, raw material fraction size and process duration. The influence of geometry and shape of the pressure cell on the efficiency of the extraction process was also investigated. The parameters determining the quality of extracts obtained at different process parameters were the total polyphenols content, total flavonoids content and antioxidant activity. In the case of cherry bark (*Prunus avium* L.), an increase in all three parameters determining the quality of the extract was observed until the temperature of $140\pm 3^{\circ}\text{C}$, followed by a degradation of the quality of the extract manifested by a decrease in the content of polyphenols, flavonoids and antioxidant activity. In the case of walnut bark (*Juglans regia* L.), the temperature of 131.6°C was the breaking point (increase/decrease in the quality of the extract), while in the case of oak bark (*Quercus robur* L.) it was $120\pm 3.5^{\circ}\text{C}$. Studies carried out on bark extracts of norway maple (*Acer platanoides* L.) indicates an increase in

the content of polyphenols, flavonoids and antioxidant activity with an increase in the process temperature in the entire range of variation of this parameter 110 to 170°C.

The study of the impact of the raw material fraction size on the total polyphenols content, total flavonoids content and antioxidant activity of the extracts obtained using water in subcritical conditions was carried out on two raw materials: cherry bark (*Prunus avium* L.) and walnut bark (*Juglans regia* L.). In both cases, an increase in the raw material fraction size resulted in a decrease in the content of bioactive substances and antioxidant activity.

The research works includes also studies on the impact of the subcritical water extraction process duration on the total content of polyphenols, flavonoids and antioxidant activity of the extracts obtained. In the case of cherry bark (*Prunus avium* L.), an increase in the content of the tested bioactive substances and antioxidant activity was observed, while in the case of walnut bark (*Juglans regia* L.) a decrease was observed as a result of an increase in the process duration. Studies of norway maple bark (*Acer platanoides* L.) and oak bark (*Quercus robur* L.) did not indicate a statistically significant effect of the duration of the process on the content of the tested bioactive substances and antioxidant activity.

Studies on the impact of geometry and shape of the pressure cell carried out using the bark of two species of trees: norway maple (*Acer platanoides* L.) and oak (*Quercus robur* L.) did not indicate a statistically significant effect on the efficiency of the water extraction process in subcritical conditions.

The results of the research work contributed to the systematization of knowledge about the influence of process parameters and geometry of pressure cell on the course of the subcritical water extraction process and enabled the development of assumptions for the construction of a pressure cell for extraction system. The result of the research work is the development of a pressure cell design with a capacity of 40 dm³ and a technological diagram of a system for obtaining bioactive substances using water in subcritical conditions.

Keywords: extraction, subcritical water, extraction cell, extractor.

1. Wprowadzenie

Grupa Badawcza Ekstrakcja Nadkrytyczna jest jednym z głównych działów Sieci Badawczej Łukasiewicz - Instytutu Nowych Syntez Chemicznych. W grupie tej prowadzone są badania naukowe, prace badawczo-rozwojowe i wdrożeniowe w dziedzinie nauk chemicznych w zakresie ekstrakcji produktów roślinnych za pomocą CO₂ w stanie nadkrytycznym - produkcja związków biologicznie aktywnych. Aktualnie grupa ta dysponuje szerokim spektrum instalacji do przeprowadzania ekstrakcji związków bioaktywnych za pomocą CO₂. Dostępna w zakładzie technologia, pomimo wielu zalet obciążona jest również pewnymi ograniczeniami, do których należy ekstrakcja związków polarnych. Opracowanie technologii ekstraktów biologicznie aktywnych z biomasy z użyciem wody w stanie podkrytycznym pozwoli na prowadzenie prac badawczo-rozwojowych oraz wdrożeniowych dedykowanych dla przemysłu w zakresie związków polarnych, w tym ekstraktów biologicznie aktywnych o właściwościach bakterio- i wirusobójczych. Wdrożenie innowacyjnej technologii ekstrakcji przy użyciu wody pozwoli na rozszerzenie zakresu usług badawczo-rozwojowych oraz wdrożeniowych dla przemysłu spożywczego, chemicznego, kosmetycznego i farmaceutycznego.

Woda jest rozpuszczalnikiem, którego polarność zależy od parametrów procesu. Jest ona szczególnie przydatna do ekstrakcji związków chemicznych o dużym stopniu polarności, zwłaszcza z materiałów pochodzenia roślinnego. Ze względu na wyjątkowy charakter woda ciągle znajduje nowe zastosowania w nowoczesnych technologiach ekstrakcji związków biologicznie aktywnych z surowców roślinnych, umożliwiającymi zastosowanie tych związków w wielu dziedzinach przemysłu. Związki polarne pochodzenia roślinnego stanowią ważną grupę antyoksydantów, które są wykorzystywane w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym i paszowym. Aplikacja ekstrakcji podkrytycznej wodą eliminuje użycie rozpuszczalników organicznych, wpływając na bezpieczeństwo, wysoką jakość oraz szerokie możliwości zastosowania ekstraktów roślinnych. Woda w stanie podkrytycznym umożliwia ekstrakcję zarówno substancji polarnych, jak i niektórych substancji niepolarnych. Zmiana parametrów procesowych istotnie wpływa na przebieg procesu ekstrakcji podkrytycznej. Wyniki przeprowadzonych prac badawczych przyczyniły się do usystematyzowania wiedzy na temat wpływu parametrów procesowych oraz geometrycznych celek ciśnieniowych na przebieg procesu ekstrakcji podkrytycznej oraz umożliwiły opracowanie założeń do konstrukcji celki ciśnieniowej systemu ekstrakcji. Niniejsze prace badawcze poprzez eliminację użycia

rozpuszczalników organicznych wpisują się w koncepcję „Zielonej Chemii” (ang. Green Chemistry) zakładającej projektowanie i przeprowadzanie procesów chemicznych w taki sposób, aby ograniczyć użycie i powstawanie szkodliwych substancji, a także koncepcję "Zrównoważonego Rozwoju". Innowacyjne technologie wpisujące się w powyższe koncepcje są szczególnie istotne ze względu na konieczność transformacji istniejącego w kraju przemysłu chemicznego w celu sprostania wymaganiom obowiązującym na terenie Unii Europejskiej.

Ekstrakcja wodą w warunkach podkrytycznych uważana jest za przyjazną dla środowiska naturalnego metodę separacji związków biologicznie aktywnych z surowców roślinnych. Metoda ta jest skalowalna do rozmiarów przemysłowych [1,2,3]. Wysoka polarność, temperatura wrzenia i stała dielektryczna to tylko niektóre z jej unikalnych właściwości w warunkach podkrytycznych [4]. Przenikalność elektryczna wody zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury, podczas gdy jej dyfuzyjność wzrasta, a lepkość i napięcie powierzchniowe maleją. W rezultacie wysoce polarne materiały, które są łatwo rozpuszczalne w wodzie w warunkach normalnych mogą być łatwiej odseparowane w niskich temperaturach niż cząsteczki niskopolarne, które potrzebują niskopolarnego medium występującego w wyższych temperaturach [5,6,7]. Podniesienie temperatury wody zwiększa szybkość dyfuzji i kinetykę desorpcji, co prowadzi do wzrostu dysocjacji związków. Wzrost temperatury procesu prowadzący do zmniejszenia lepkości i napięcia powierzchniowego znacznie poprawia jakość kontaktu między surowcem roślinnym a rozpuszczalnikiem. Biorąc pod uwagę wyżej wymienione zmiany właściwości wody związane ze wzrostem temperatury, zwiększenie temperatury procesu może poprawić szybkość i wydajność ekstrakcji. Należy jednak zwrócić uwagę na możliwość wystąpienia zjawiska degradacji termicznej pozyskanych ekstraktów w wysokich temperaturach procesu.

Ekstrakty pozyskiwane przy użyciu wody w warunkach podkrytycznych cechuje wysoka aktywność antyoksydacyjna. Wykazują one również silną zależność aktywności antyoksydacyjnej od temperatury procesu [7-12].

Obniżenie kosztów produkcji i zwiększenie wydajności procesu wymaga głębokiego zrozumienia wpływu parametrów takich jak temperatura, wielkość frakcji surowca i czas trwania procesu na zawartość związków bioaktywnych w ekstraktach. Informacje te są niezbędne jako wytyczne do projektowania optymalnych systemów ekstrakcji.

Dostępna literatura zawiera informacje na temat bioaktywności ekstraktów pozyskanych z różnych surowców roślinnych, lecz brakuje określenia wpływu zmiennych procesowych na wydajność i skład ekstraktów.

2. Problem i hipotezy badawcze

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie podstaw technologii ekstraktów roślinnych wytwarzanych z biomasy przy użyciu wody w stanie podkrytycznym oraz przygotowanie projektu konstrukcyjnego w skali przemysłowej ekstraktora ciśnieniowego. Zgodnie z założonym celem pracy postawiono następujące hipotezy badawcze:

- Hipoteza 1** Przeprowadzenie ekstrakcji biomasy przy podwyższonej temperaturze z użyciem wody w stanie podkrytycznym powoduje wzrost wydajności procesu ekstrakcji oraz jego szybkości.
- Hipoteza 2** Proces ekstrakcji biomasy prowadzony w środowisku wodnym przy podwyższonej temperaturze nie powoduje zmniejszenia aktywności biologicznej ekstraktów.
- Hipoteza 3** Parametry geometryczne i kształt celki ciśnieniowej mają wpływ na wydajność procesu ekstrakcji podkrytycznej.

Uzyskane wyniki pozwolą na usystematyzowanie wiedzy na temat wpływu parametrów geometrycznych celek ciśnieniowych na przebieg procesu ekstrakcji podkrytycznej oraz umożliwią opracowanie założeń do konstrukcji ekstraktora ciśnieniowego. Ekstrakty uzyskane tą metodą, które ulegną rozpuszczeniu w wodzie, będą bogate w związki o charakterze polarnym. Natomiast pojawią się także substancje nierozpuszczalne w wodzie o charakterze niepolarnym, które trzeba będzie oddzielić od wody.

3. Metodyka badawcza

3.1. Materiał badawczy

Badania przeprowadzono na korze czterech gatunków drzew powszechnie występujących na terenie Polski: czereśni (*Prunus avium* L.), orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.), klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) oraz dębu (*Quercus robur* L.). Surowce do badań pozyskano z Lasów Państwowych – Nadleśnictwo Puławy oraz prywatnych upraw drzew owocowych. Korę dębu (*Quercus robur* L.) pozyskano z pni 30-letnich drzew pod nadzorem pracowników Nadleśnictwa Puławy w Lasach Państwowych (lokalizacja 51°25'59.1" N, 22°00'12.9" E). W ten sam sposób pozyskano do badań korę klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) w lokalizacji 51°26'02.2" N, 22°00'09.0" E. Okorowaniu poddano gałęzie 15-letniego drzewa. Korę orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) pozyskano w prywatnej uprawy znajdującej się w miejscowości Puławy woj. lubelskie. Okorowaniu poddano gałęzie 20-letniego drzewa. Korę czereśni (*Prunus avium* L.) do badań pozyskano również z prywatnej uprawy znajdującej się w miejscowości Janowiec woj. lubelskie (lokalizacja 51°32'01.4" N 21°88'91.3" E). Okorowaniu poddano gałęzie 20-letniego drzewa.

Pozyskany do badań materiał poddano suszeniu metodą konwekcji naturalnej w temperaturze 20°C. Korę orzecha włoskiego będącą pierwszym badanym surowcem poddano dalszemu suszeniu w temperaturze 45°C przez 24 godziny używając suszarki laboratoryjnej Memmert ULM500. Wstępnie wysuszony surowiec rozdrobniono używając młyna tnącego RETSCH SM100 wyposażonego w wirnik o średnicy 129,5mm, przy prędkości liniowej noży tnących wynoszącej 9,4 m/s. Rozdrobniony materiał poddano frakcjonowaniu przy użyciu wstrząsarki laboratoryjnej MULTISERV LPzE-2e przy amplitudzie wibracji 2,5mm oraz częstotliwości 50Hz przez okres 20÷30min. Wydzielone w ten sposób frakcje surowców 0÷0,9, 0,9÷1,4 oraz 1,4÷1,9mm poddano dalszemu suszeniu przy użyciu konwekcji naturalnej w temperaturze 20°C, uzyskując finalnie wilgotność surowców 6,9% dla *Prunus avium* L., 8,99% dla *Juglans regia* L., 8,09% dla *Acer platanoides* L. oraz 5,25% dla *Quercus robur* L.



Rysunek 1. Kora drzew liściastych użytych do badań: a) czereśnia (*Prunus avium* L.), b) orzech włoski (*Juglans regia* L.), c) klon zwyczajny (*Acer platanoides* L.), d) dąb (*Quercus robur* L.)

3.2. Odczynniki

Badania spektrofotometryczne przeprowadzono przy użyciu następujących odczynników: kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylo-chromano-2-karboksylowy (Trolox, >98%, Sigma Aldrich, Merck, Niemcy), odczynnik Folina i Ciocalteu (AKTYN, Polska), chlorek glinu (>98%, Sigma Aldrich, Merck, Germany), węglan sodu ($\geq 99\%$, Stanlab, Lublin, Polska), metanol ($\geq 99\%$, Stanlab, Lublin, Polska), kwas galusowy ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich, Merck, Niemcy), 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH, Sigma Aldrich, Merck, Niemcy), kwercetyna ($\geq 95\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany), katechina ($\geq 99,05\%$, Sigma Aldrich, Merck, Niemcy), 2,3,5-trifenylotetrazoliowy chlorek (TPTZ, Sigma Aldrich, Merck, Germany).

Analizy chromatograficzne otrzymanych ekstraktów przeprowadzono przy użyciu następujących odczynników. Ultraczysta woda z systemu Labconco Water Pro Ps (Kansas City, MO, USA), acetonitryl ($\geq 99,9\%$, czystość LC/MS LiChrosolv, Sigma Aldrich, Merck, Germany), kwas mrówkowy ($\geq 95\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany), kwas wanilinowy

($\geq 97\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany), kwas p-kumarowy ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany), kwas trans-ferulowy ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany), kwas protokatechowy ($\geq 98\%$, PhytoLab, Merck, Germany), apigenina ($\geq 95\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany). Podstawowe roztwory wzorcowe (1 mg/ml) przygotowywano w acetonitrylu i przechowywano w zamrażarce.

3.3. Plan eksperymentu

Plan eksperymentu wygenerowano na bazie metody Boxa-Behnkena w oprogramowaniu Design Expert wersja 13.0 (Stat-Ease, Minneapolis, MN). Model eksperymentu bazuje na trzech zmiennych (procesowych) dla których przyjęto trzy poziomy wartości. Wartości te przyjęto jako minimalną, maksymalną oraz średnią dla badanego przedziału zmienności. Zmiennymi zależnymi były natomiast całkowita zawartość polifenoli (TPC – Total Polyphenols Content), całkowita zawartość flawonoidów (TFC – Total Flavonoids Content) oraz aktywność antyoksydacyjna pozyskanych ekstraktów. W tabeli 1 przedstawiono zmienne procesowe wraz z odpowiadającymi im wartościami dla każdego badanego surowca.

Tabela 1. Zmienne procesowe wraz z przyjętymi wartościami.

Surowiec	Zmienna procesowa / wartość zmiennej											
	Temperatura [°C]			Wielkość frakcji surowca [mm]			Czas trwania procesu [min.]			Średnica reaktora [mm]		
	min.	średnia	max.	min.	średnia	max.	min.	średnia	max.	min.	średnia	max.
Orzech włoski <i>Juglans regia</i> L.	110	140	170	0,9	1,4	1,9	10	30	50	-	-	-
Klon zwyczajny <i>Acer platanoides</i> L.	110	140	170	-	-	-	5	10	15	10	19,4	28,8
Dąb <i>Quercus robur</i> L.	110	130	150	-	-	-	5	10	15	10	19,4	28,8
Czereśnia <i>Prunus avium</i> L.	110	130	150	0,9	1,4	1,9	5	10	15	-	-	-

Plany eksperymentu zawierały od 3 do 5 powtórzeń punktu centralnego (średnich wartości zmiennych procesowych) w celu określenia błędów pomiarowych zmiennych zależnych. Przykładowy plan eksperymentu przygotowany na potrzeby badań kory czereśni (*Prunus avium* L.) przedstawiono w tabeli 2.

Tabla 2. Plan badań dla kory czereśni (*Prunus avium* L.).

Zestaw	Temperatura [°C]	Wielkość frakcji surowca [mm]	Czas trwania procesu [min.]
1	110	1,4	15
2	130	1,4	10
3	130	1,4	10
4	110	1,9	10
5	130	1,4	10
6	110	0,9	10
7	130	1,9	15
8	130	1,4	10
9	150	1,4	5
10	150	1,9	10
11	150	0,9	10
12	110	1,4	5
13	150	1,4	15
14	130	1,9	5
15	130	1,4	10
16	130	0,9	5
17	130	0,9	15

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń zostały poddane analizie wariancji ANOVA. Test F wykorzystano w celu określenia istotności statystycznej współczynników regresji. Wartość p (p-value) dla przeprowadzonych analiz założono na poziomie $p < 0.05$.

3.4. Przygotowanie ekstraktów do badań

Ekstrakty do badań przygotowano używając systemu przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikowej Dionex ASE350. Jako rozpuszczalnika użyto ultraczystej wody o przewodności $0,09 \mu\text{S/cm}$. W systemie ekstrakcyjnym przedstawionym na rysunku 2 możliwe jest zastosowanie temperatury rozpuszczalnika do 200°C i ciśnienia do $10,34 \text{ MPa}$ w celu zwiększenia efektywności procesu ekstrakcji. System przygotowania rozpuszczalnika do procesu ekstrakcji jest wyposażony w mieszalnik umożliwiający automatyczne wykonywanie mieszaniny na bazie trzech komponentów. Przed ekstrakcją celka ciśnieniowa jest wypełniana rozpuszczalnikiem o ciśnieniu zabezpieczającym przed jego wrzeniem, a następnie podgrzewana w komorze grzewczej do wymaganej temperatury procesu. Po zakończeniu procesu ekstrakcji celka jest opróżniona poprzez wymycie rozpuszczalnika zawierającego wyekstrahowane substancje do naczynia zbiorczego. System Dionex ASE 350 jest wyposażony w obrotowe podajniki, górny na 24 celki ekstrakcyjne o pojemnościach od 1mL do 100mL. Dolny podajnik zawiera naczynia zbiorcze

o pojemności 60mL i 250mL do których przetłaczany jest rozpuszczalnik po procesie ekstrakcji.



Rysunek 2. Ekstraktor Dionex ASE 350 [13]

Podczas badań celki ekstrakcyjne zabezpieczono przed przedostaniem się ekstrahowanego surowca poza celkę ciśnieniową poprzez zastosowanie filtrów z włókna szklanego na króćcach wlotowym i wylotowym rozpuszczalnika. Zmienność kształtu celki ciśnieniowej uzyskano poprzez modyfikację stosunku jej wysokości do średnicy wewnętrznej. W tym celu zastosowano celkę ciśnieniową o pojemności 100mL i średnicy wewnętrznej 28,8mm oraz wkładane do celki tuleje modyfikujące jej średnicę wewnętrzną o pojemnościach 45mL (średnica wewnętrzna 19,4mm) oraz 12mL (średnica wewnętrzna 10mm). Celkę ciśnieniową wraz z tulejkami przedstawiono na rysunku 3. Ilość surowca została dobrana tak, by zachować stały stosunek masy ekstrahowanego surowca do objętości celki ciśnieniowej (zastosowanego rozpuszczalnika) i wynosiła: 16,67g dla 100 mL, 7,50g dla 45mL, i 2,00g dla 12 mL. Proces ekstrakcji przeprowadzono zgodnie z planem eksperymentu przygotowanym dla każdego surowca. Po zakończeniu procesu ekstrakcji rozpuszczalnik odparowywano przy użyciu wyparki próżniowej w temperaturze 40°C. Przygotowane w ten sposób ekstrakty przechowywano w lodówce laboratoryjnej w temperaturze 2°C.



a)



b)



c)



d)

Rysunek 3. Celka ciśnieniowa użyta do badań procesu ekstrakcji podkrytycznej:
a) celka ciśnieniowa o średnicy $\text{Ø}28,8\text{mm}$, b) celka ciśnieniowa z tulejkami,
c) celka ciśnieniowa zmodyfikowana do średnicy $\text{Ø}19,4\text{mm}$,
d) celka ciśnieniowa zmodyfikowana do średnicy $\text{Ø}10\text{mm}$.

3.5. Oznaczenia całkowitej zawartości polifenoli (TPC)

Jakość ekstraktów otrzymanych dla każdego zestawu zmiennych procesowych oceniono przy użyciu metody spektrofotometrycznej. Całkowitą zawartość polifenoli oznaczono metodą Folina-Ciocalteu i wyrażono w mg(GAE)/g suchej masy surowca. Jako wzorca odniesienia użyto kwasu galusowego. Oznaczenia wykonano wykorzystując metodę opisaną przez Sahina i in. [7]. Całkowitą zawartość polifenoli określono na podstawie krzywej kalibracyjnej o następującym równaniu.

$$TPC = 0,1074 A + 0,0585 (R^2 = 0,9963) \quad (1)$$

gdzie: TPC – całkowita zawartość polifenoli [10^{-6} g(GAE)/mL], A – absorbancja [bezwym.].

3.6. Oznaczenia całkowitej zawartości flawonoidów (TFC)

Całkowita zawartość flawonoidów została wyznaczona przy użyciu metody spektrofotometrycznej, stosując katechinę jako wzorzec odniesienia. W badaniach zastosowano metodę opisaną przez Aryal i in. [12] z niewielkimi modyfikacjami [14]. Próbkę ekstraktu o objętości 1,0mL zmieszano z 2% roztworem $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ na bazie metanolu. Do mieszaniny dodano wodę destylowaną do osiągnięcia objętości 10mL. Absorbancję mierzono po 10 min. inkubacji w ciemności i temperaturze pokojowej przy długości fali 510nm. Otrzymane wyniki przedstawiono w mg(CTE)/g suchej masy surowca. Krzywa kalibracyjna użyta do wyznaczenia całkowitej zawartości flawonoidów w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.) została opisana następującym równaniem.

$$TFC = 27,956 A + 0,0228 (R^2 = 0,9998) \quad (2)$$

gdzie: TFC – całkowita zawartość flawonoidów [10^{-3} g(CTE)/mL], A – absorbancja [bezwym.].

3.7. Oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej

Potencjał antyoksydacyjny ekstraktów oznaczono przy użyciu rodnika DPPH. Zastosowano metodę opisaną przez Blois [15] z niewielkimi modyfikacjami [14]. Objętość 60 μ L ekstraktu zmieszano z 5,0 mL świeżo przygotowanego roztworu rodnika DPPH w metanolu o stężeniu $6 \cdot 10^{-5}$ M. Po czasie 30-minutowej inkubacji próbki w temperaturze pokojowej zmierzono absorbancję przy długości fali 517nm. Otrzymane wyniki przedstawiono jako ekwiwalent troloksu: 10^{-6} M(TE)/g suchej masy surowca. Krzywa

kalibracyjna użyta do wyznaczenia aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów z kory czereśni (*Prunus avium* L.) została opisana następującym równaniem.

$$AC_{DPPH} = 0,9397 A + 0,7561 (R^2 = 0,9993) \quad (3)$$

gdzie: AC_{DPPH} – aktywność antyoksydacyjna [10^{-3} M(TE)/mL], A – absorbancja [bezwym.].

3.8. Analiza chromatograficzna

Do analizy ilościowej wybranych kwasów fenolowych w pozyskanych ekstraktach wykorzystano zestaw LC-MS/MS: chromatograf cieczowy Agilent seria 1200 (Waldbronn, Germany) wyposażony w kolumnę z fazą odwróconą C18 (Welch Boltimate 3,0×100 mm, 2,7 μm) wraz z prekolumną oraz tandemowy spektrometr mas AB Sciex 3200 QTRAP (spektrometr masowy typu potrójny kwadrupol, Framingham, MA, USA). Temperaturę termostatu kolumny nastawiono na 30°C. Anality rozdzielono używając wody (faza ruchoma A) i acetonitrylu (faza ruchoma B), obie z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego. Natężenie przepływu wynosiło 0,5mL/min. Gradient fazy ruchomej: początek (0 min.) 10% B i utrzymanie przez 2 min., zwiększenie do 100% B w czasie 14 min. i utrzymanie przez 2 min., zmniejszenie do 10% B w czasie 1 min. i utrzymanie przez 8 min. w celu zrównoważenia kolumny. Całkowity czas trwania analizy wynosił 27min., a objętość dozowanej próbki wynosiła 10 μL. Warunki pracy spektrometru mas (MS/MS): metoda jonizacji – elektrorozpylanie (ESI), rodzaj jonizacji – ujemna, tryb pracy – monitoring wielu reakcji (MRM), temperatura źródła jonów 550°C, napięcie rozpylania jonów 4500 V. System LC-MS/MS był kontrolowany przez oprogramowanie Analyst Software (wersja 1.5.2). W tabeli 3 przedstawiono parametry LC-MS/MS wybranych polifenoli.

Tabela 3. Parametry LC-MS/MS wybranych polifenoli.

Związek	Czas retencji [min.]	[M]- [m/z]	MS/MS [m/z]
Kwasy fenolowe			
Kwas wanilinowy	4,0	166,9	151,9/108,0
Kwas p-kumarowy	6,5	163,0	119,1/92,9
Kwas ferulowy	7,0	192,9	134,1/177,9
Kwas protokatechowy	1,9	153,0	110,1/82,1
Flawonoidy			
Apigenina	9,5	269,0	116,9/151,2

W celu przygotowania próbki do badań 25 μ L ekstraktu zostało przefiltrowane przez filtr PTFE 0,45 μ m następnie rozcieńczone do objętości 1 mL przy użyciu mieszaniny wody i acetonitrylu (9:1 obj./obj.). Przygotowana próbka została następnie wstrzyknięta do systemu LC-MS/MS.

4. Wyniki badań

4.1. Wydajność procesu ekstrakcji podkrytycznej

Wydajność procesu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych określono przez porównanie masy suchego ekstraktu z masą suchego surowca użytego do ekstrakcji danej próbki. W przypadku kory czereśni (*Prunus avium* L.) eksperyment przeprowadzony zgodnie z planem przedstawionym w tabeli 2 wykazał zmienność wydajności procesu osiągając wartości od 3,11% do 12,93% w zależności od parametrów ekstrakcji. Minimalną wydajność procesu zaobserwowano dla temperatury 110°C, wielkości frakcji 1,4 mm i czasu trwania ekstrakcji wynoszącego 5 minut. Natomiast najwyższą wydajność osiągnięto przy parametrach: temperatura rozpuszczalnika 150°C, wielkość frakcji 0,9 mm i czas trwania procesu 10 minut. W tabeli 4 przedstawiono wydajność ekstrakcji w zależności od parametrów procesu dla zestawów zmiennych procesowych określonych w planie eksperymentu dla kory czereśni.

Tabela 4. Wydajność procesu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych kory czereśni (*Prunus avium* L.).

Zestaw	Temperatura procesu [°C]	Wielkość frakcji surowca [mm]	Czas trwania procesu [min.]	Masa suchego ekstraktu [g]	Wydajność ekstrakcji [%]
1	110	1,4	15	0,5765	4,13
2	130	1,4	10	0,8674	6,21
3	130	1,4	10	0,8088	5,79
4	110	1,9	10	0,4565	3,27
5	130	1,4	10	0,7718	5,53
6	110	0,9	10	0,9841	7,05
7	130	1,9	15	0,6447	4,62
8	130	1,4	10	0,6780	4,86
9	150	1,4	5	0,7522	5,39
10	150	1,9	10	0,9155	6,56
11	150	0,9	10	1,8050	12,93
12	110	1,4	5	0,4348	3,11
13	150	1,4	15	1,1615	8,32
14	130	1,9	5	0,5804	4,16
15	130	1,4	10	0,9428	6,75
16	130	0,9	5	1,1645	8,34
17	130	0,9	15	1,4792	10,59

W tabeli 5 przedstawiono minimalne i maksymalne wydajności ekstrakcji wraz z odpowiadającymi im parametrami procesu dla wszystkich badanych surowców.

Tabela 5. Minimalne i maksymalne wydajności ekstrakcji wraz z odpowiadającymi im parametrami procesu.

Surowiec	Wydajność ekstrakcji [%] min. / max.	Temperatura [°C]	Wielkość frakcji surowca [mm]	Czas trwania procesu [min.]	Średnica reaktora [mm]
Czereśnia <i>Prunus avium</i> L.	3,11 / 12,93	110 / 150	1,4 / 0,9	5 / 10	---
Orzech włoski <i>Juglans regia</i> L.	15,3 / 31,8	170 / 170	0,9 / 1,4	30 / 50	---
Klon zwyczajny <i>Acer platanoides</i> L.	2,02 / 13,53	110 / 170	---	10 / 15	10 / 19,4
Dąb <i>Quercus robur</i> L.	2,95 / 9,11	110 / 150	---	10 / 10	28,8 / 10

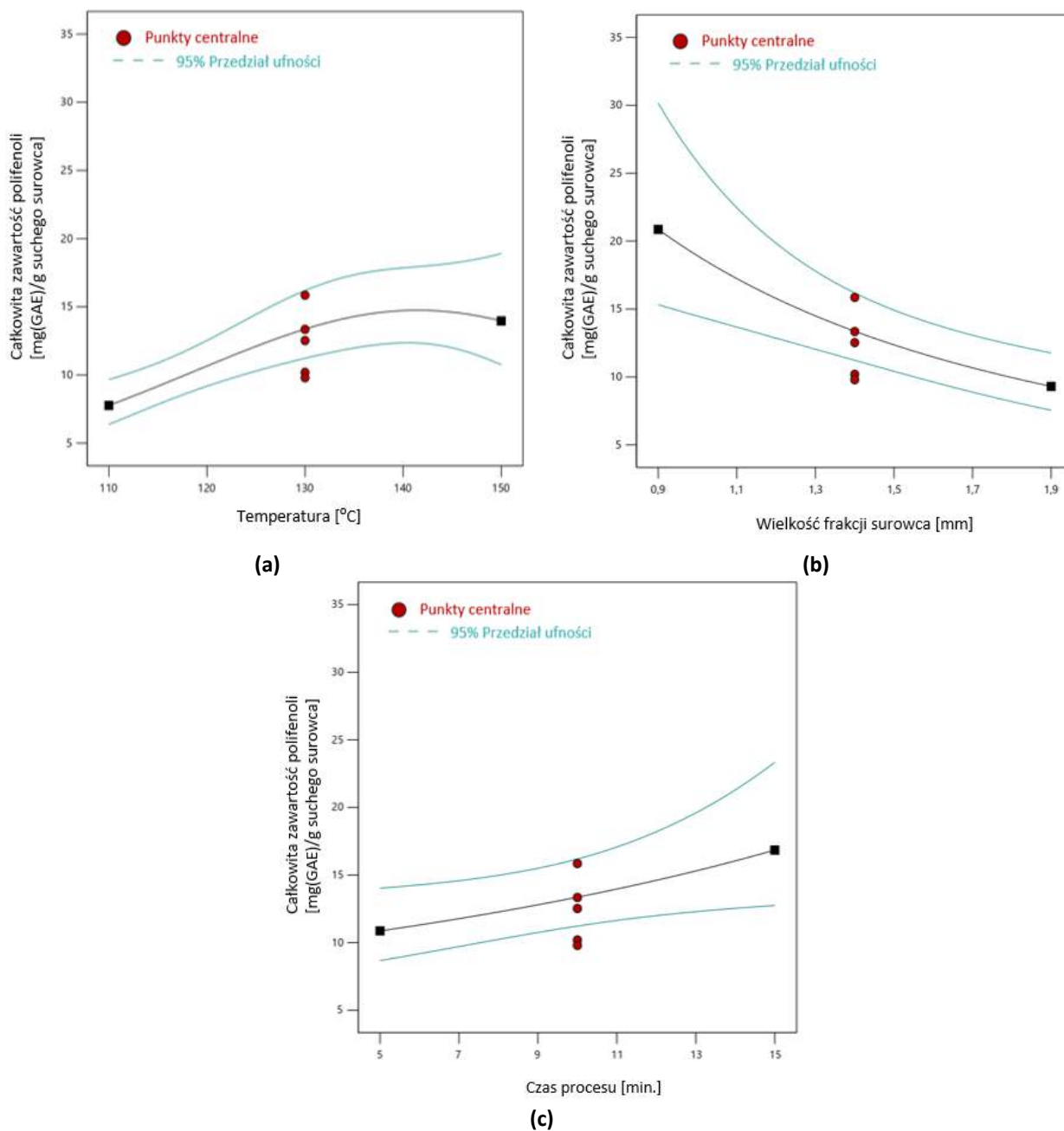
Najmniejszą wydajność ekstrakcji 2,02% uzyskano w przypadku kory klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) przy następujących parametrach procesu: temperatura 110°C, czas trwania procesu 10min., natomiast największą wydajność wynoszącą 31,8% uzyskano w przypadku orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) stosując temperaturę rozpuszczalnika wynoszącą 170°C i czas trwania procesu 50 min.

4.2. Całkowita zawartość polifenoli w badanych surowcach

Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na zależność jakości ekstraktu od warunków przeprowadzania procesu. Całkowita zawartość polifenoli w ekstraktach pozyskanych z kory czereśni (*Prunus avium* L.) wynosiła od 5,44 do 27,93 mg(GAE)/g suchego surowca. Zależność całkowitej zawartości polifenoli od temperatury procesu, wielkości frakcji surowca i czasu trwania ekstrakcji dla kory czereśni przedstawiono na rysunku 4.

Na podstawie wyników analiz zawartości polifenoli przeprowadzono wieloczynnikową analizę wariancji. Uzyskane wyniki wskazują, że jakość ekstraktu była zależna od wszystkich badanych parametrów tj.: temperatury rozpuszczalnika, wielkości frakcji surowca oraz czasu trwania procesu. Całkowita zawartość polifenoli w ekstraktach z kory czereśni wzrasta wraz z temperaturą do 142°C, dalszy wzrost temperatury powoduje spadek wydajności. Wzrost wielkości frakcji surowca z 0,9 do 1,9 mm powoduje spadek

zawartości polifenoli w ekstraktach. Natomiast wydłużenie czasu trwania procesu skutkuje wzrostem zawartości polifenoli. W tabeli 6 przedstawiono szczegóły analizy ANOVA.



Rysunek 4. Całkowita zawartość polifenoli w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.) w funkcji: (a) temperatury, (b) wielkości frakcji surowca, (c) czasu trwania procesu.

Tabela 6. Wyniki analizy ANOVA całkowitej zawartości polifenoli w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.).

	Suma kwadratów	df stopnie swobody	Średni kwadrat	F-wartość	p-wartość	
Model	0,0522	4	0,0130	11,48	0,0001	istotny
A – Temperatura	0,0161	1	0,0161	14,18	0,0027	
B – Wielkość frakcji surowca	0,0227	1	0,0227	20,03	0,0008	
C – Czas procesu	0,0069	1	0,0069	6,03	0,0302	
A ² – Temperatura ²	0,0065	1	0,0065	5,69	0,0345	
Pozostałość	0,0136	12	0,0011			
Brak dopasowania	0,0104	8	0,0013	1,62	0,3379	nieistotny
Błąd	0,0032	4	0,0008			
Skorygowana całkowita suma kwadratów	0,0658	16				
Statystyki dopasowania			R ²	0,7929		
Odchylenie standardowe	0,0337		Skorygowany R ²	0,7238		
Średnia	0,2978		Przewidywany R ²	0,5465		
C.V. %	11,32		Odpowiednia precyzja	12,0289		

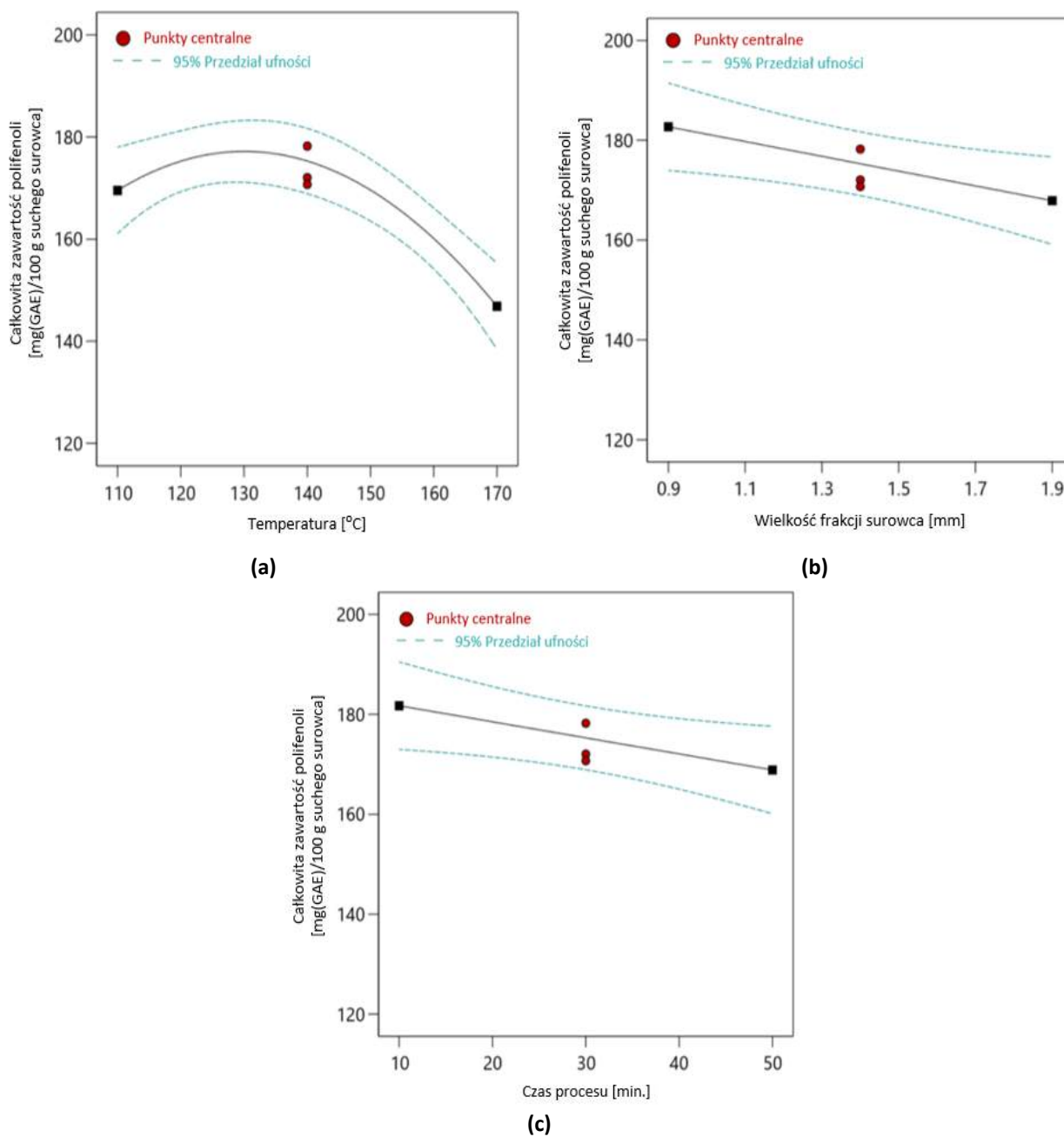
Wartość statystyki F wynosząca 11,48 wskazuje na istotność wyznaczonego modelu matematycznego. Prawdopodobieństwo, że tak duża wartość statystyki F jest wynikiem szumu wynosi zaledwie 0,01%. Parametry modelu są istotne jeśli wartość p jest mniejsza niż 0,05. W wyznaczonym modelu matematycznym istotne są wszystkie badane parametry tj.: temperatura, wielkość frakcji surowca i czas trwania procesu. Różnica między skorygowanym i przewidywanym współczynnikiem determinacji mniejsza niż 0,2 wskazuje, że wyznaczony model matematyczny z odpowiednią dokładnością przewiduje nowe dane. Odpowiednia precyzja będąca miarą stosunku sygnału do szumu z wartością 12,0289 wskazuje że model jest dobrze dopasowany i wystarczająco silny by dostarczyć wiarygodne prognozy. Wyznaczony model matematyczny ze względu na swoją istotność statystyczną może być używany do analizy obszaru badawczego w zakresie użytych zmiennych eksperymentalnych.

Model matematyczny wyrażony równaniem 4 może być wykorzystany do obliczenia całkowitej zawartości polifenoli w ekstraktach z kory czereśni w badanym obszarze zmienności temperatury, wielkości frakcji surowca i czasu trwania procesu.

$$TPC = 0,0000098 T^2 - 0,005853 t + 0,106653 Fs - 0,027627 + 2,13027 \quad (4)$$

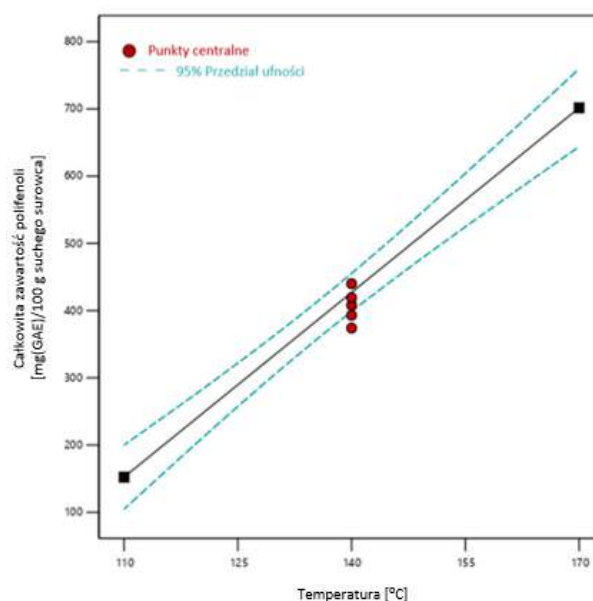
gdzie: TPC – całkowita zawartość polifenoli [mg(GAE)/g suchego surowca],
 T – temperatura [°C], t – czas trwania procesu [min.], Fs – wielkość frakcji surowca [mm].

Na rysunkach 5-7 przedstawiono zależność całkowitej zawartości polifenoli w ekstraktach pozyskanych z pozostałych badanych surowców. Rysunek 5 przedstawia wyniki badań kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.). Całkowita zawartość polifenoli w pozyskanych ekstraktach rosła wraz ze wzrostem temperatury do wartości 131,6°C następnie malała. Wzrost wielkości frakcji surowca z 0,9 do 1,9 mm, jak również wzrost czasu trwania procesu z 10 do 50 min. skutkowały zmniejszeniem zawartości polifenoli w ekstraktach z *Juglans regia* L.



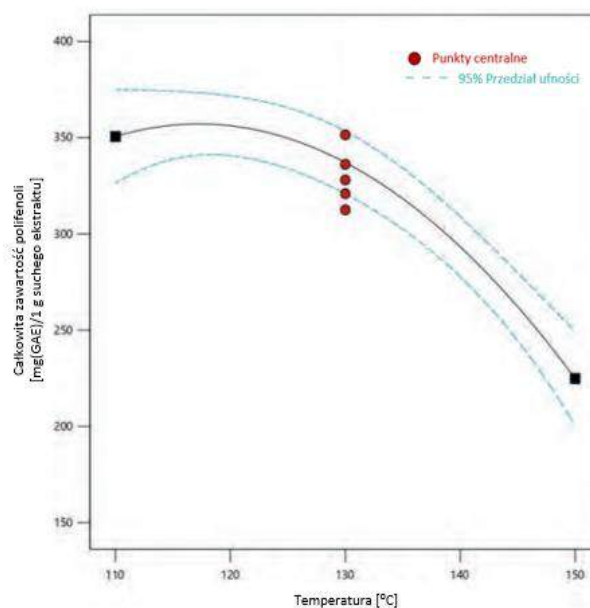
Rysunek 5. Całkowita zawartość polifenoli w ekstraktach z kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) w funkcji: (a) temperatury, (b) wielkości frakcji surowca, (c) czasu trwania procesu.

Rysunek 6 przedstawia zależność całkowitej zawartości polifenoli w próbkach pozyskanych przy użyciu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych z kory klonu (*Acer platanoides* L.). Wzrost temperatury ekstrakcji z 110°C do 170°C spowodował 8,9-krotny wzrost zawartości polifenoli w pozyskanych ekstraktach. Przeprowadzone badania nie wykazały istotnego statystycznie wpływu kształtu reaktora (dla średnic wewnętrznych 10, 19,4 i 28,8mm) oraz czasu trwania ekstrakcji (5, 10 i 15min.) na całkowitą zawartość polifenoli w ekstraktach z kory klonu (*Acer platanoides* L.) pozyskanych przy użyciu wody w warunkach podkrytycznych.



Rysunek 6. Całkowita zawartość polifenoli w ekstraktach z kory klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) w funkcji temperatury.

Rysunek 7 przedstawia zależność całkowitej zawartości polifenoli w próbkach pozyskanych przy użyciu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych z kory dębu (*Quercus robur* L.). Wzrost temperatury ekstrakcji z 110°C do 117,2°C spowodował wzrost zawartości polifenoli w pozyskanych ekstraktach, natomiast przekroczenie temperatury 117,2°C skutkowało obniżeniem zawartości polifenoli. Przeprowadzone badania nie wykazały istotnego statystycznie wpływu kształtu reaktora (dla średnic wewnętrznych 10, 19,4 i 28,8mm) oraz czasu trwania ekstrakcji (5, 10 i 15min.) na całkowitą zawartość polifenoli w ekstraktach z kory dębu (*Quercus robur* L.) pozyskanych przy użyciu wody w warunkach podkrytycznych.



Rysunek 7. Całkowita zawartość polifenoli w ekstraktach z kory dębu (*Quercus robur* L.) w funkcji temperatury.

Zawartość polifenoli w produktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.) jest słabo poznana. W dostępnej literaturze brakuje informacji na temat wpływu temperatury procesu, wielkości frakcji surowca oraz czasu trwania na zawartość polifenoli w ekstraktach z kory czereśni pozyskanych na drodze ekstrakcji podkrytycznej. Dostępne informacje wskazują, że całkowita zawartość polifenoli (TPC) w ekstraktach uzyskanych po 15 minutowej ekstrakcji ultradźwiękowej za pomocą 80% wodnego roztworu etanolu wynosiła $112,88 \pm 17,27$ mg(GAE)/g suchego ekstraktu [16]. Ekstrakty otrzymane przy użyciu wody w warunkach podkrytycznych oraz kory dwóch gatunków drzew: orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) i klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) zawierały polifenole w ilości odpowiednio 192,2 i 943 mg(GAE)/100 g suchej masy surowca [17,18]. Podkrytyczne ekstrakty wodne otrzymywane z kory dębu (*Quercus robur* L.) osiągnęły całkowitą zawartość polifenoli 1614,7 mg(GAE)/100 g suchego surowca [19]. W trakcie badań kory czereśni (*Prunus avium* L.) uzyskano całkowitą zawartość polifenoli w ekstraktach na poziomie 1570 mg(GAE)/100 g suchej masy surowca, co stanowi ilość zbliżoną do zawartości polifenoli w ekstraktach wcześniej badanej kory dębu (*Quercus robur* L.). Należy jednak zaznaczyć, że wiele czynników w tym różne techniki ekstrakcji, parametry procesowe, rodzaj rozpuszczalnika, długość przechowywania materiału przed badaniami, okres zbioru i techniki wstępnej obróbki surowca, mogą mieć znaczący wpływ na stężenia polifenoli w ekstraktach wykonanych z tych samych gatunków drzew [20]. W przypadku kory czereśni (*Prunus avium* L.) oraz orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) wszystkie

analizowane zmienne procesowe: temperatura rozpuszczalnika, wielkość frakcji surowca i czas trwania procesu, mają wpływ na całkowitą zawartość polifenoli w otrzymanych ekstraktach. Badania kory klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) i dębu (*Quercus robur* L.) wskazują na statystycznie istotną zależność zawartości polifenoli od temperatury procesu. Wpływ kształtu celki ciśnieniowej i czasu trwania procesu na zawartość polifenoli w otrzymanych ekstraktach z kory klonu zwyczajnego i dębu w badanym zakresie zmienności tych parametrów jest statystycznie nieistotny. Brak wpływu czasu trwania procesu w badanym zakresie wynika z szybkiej kinetyki ekstrakcji w warunkach wysokiej temperatury i ciśnienia [21]. Metabolity wtórne są bardzo dobrze rozpuszczalne przy wysokich ciśnieniach procesu i mogą szybko osiągnąć końcowe stężenie nasycenia. Równowaga między wnętrzem komórki roślinnej i otaczającym ją rozpuszczalnikiem może nastąpić po kilku minutach [21,22]. Niewielki, a nawet pomijalny wpływ czasu na wydajność ekstrakcji w warunkach podkrytycznych został również opisany przez Vergara-Salinas i in. [23]. W tabeli 7 przedstawiono wpływ parametrów procesowych i geometrycznych celki ciśnieniowej na całkowitą zawartość polifenoli w ekstraktach z kory badanych gatunków drzew.

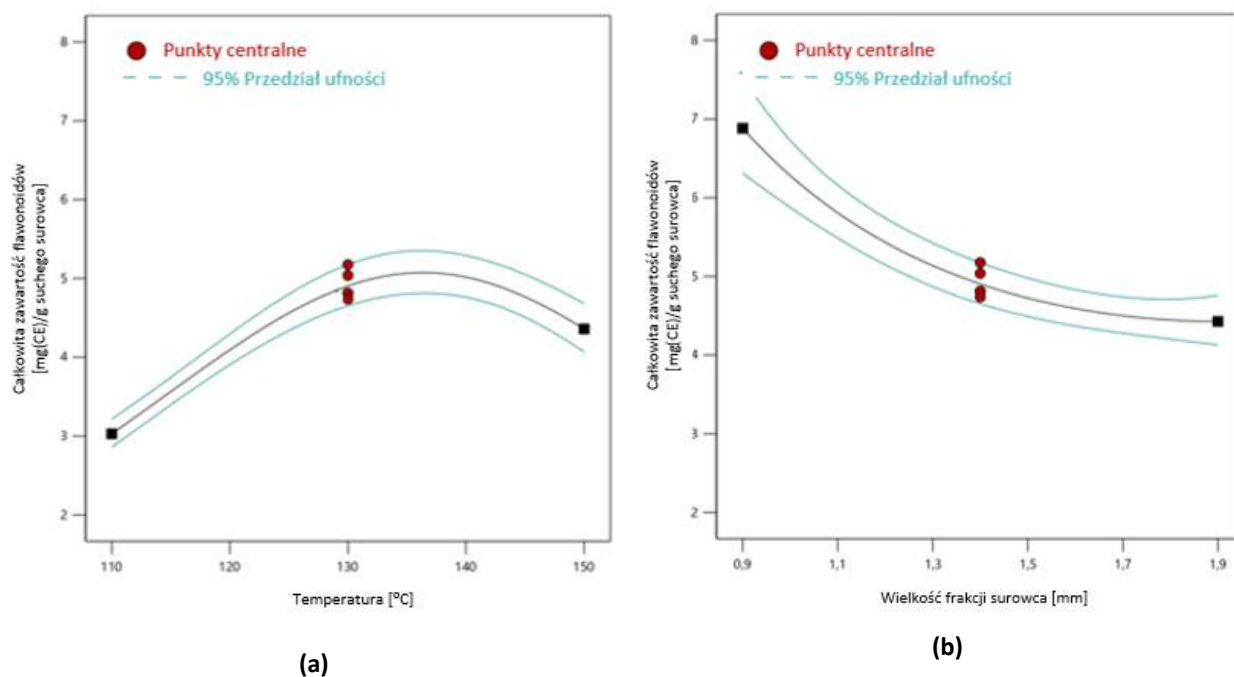
Tabela 7. Wpływ parametrów procesowych i geometrycznych celki ciśnieniowej na całkowitą zawartość polifenoli w ekstraktach.

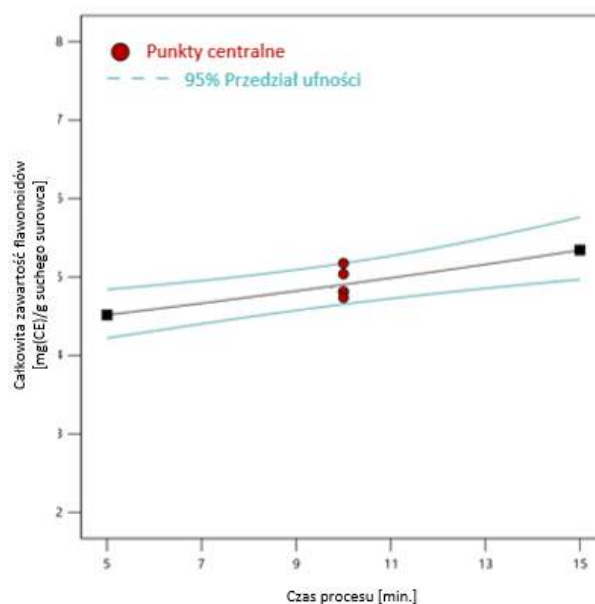
Surowiec	Zmienna (parametr)	Całkowita zawartość polifenoli
Czereśnia <i>Prunus avium</i> L.	Wzrost temperatury procesu	wzrost do temperatury 142°C, następnie spadek
	Wzrost wielkości frakcji surowca	spadek
	Wzrost czasu trwania procesu	wzrost
	Zmiana średnicy reaktora	nie badano
Orzech włoski <i>Juglans regia</i> L.	Wzrost temperatury procesu	wzrost do temperatury 131,6°C, następnie spadek
	Wzrost wielkości frakcji surowca	Spadek
	Wzrost czasu trwania procesu	Spadek
	Zmiana średnicy reaktora	nie badano
Klon zwyczajny <i>Acer platanoides</i> L.	Wzrost temperatury procesu	wzrost w całym badanym zakresie 110 do 170°C
	Wzrost wielkości frakcji surowca	nie badano
	Wzrost czasu trwania procesu	brak wpływu w badanym zakresie
	Zmiana średnicy reaktora	brak wpływu w badanym zakresie
Dąb <i>Quercus robur</i> L.	Wzrost temperatury procesu	wzrost do temperatury 117,2°C, następnie spadek
	Wzrost wielkości frakcji surowca	nie badano
	Wzrost czasu trwania procesu	brak wpływu w badanym zakresie
	Zmiana średnicy reaktora	brak wpływu w badanym zakresie

4.3. Całkowita zawartość flawonoidów w badanych surowcach

Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na zależność całkowitej zawartości flawonoidów w ekstraktach otrzymanych z kory czereśni od wszystkich analizowanych parametrów procesu, tj.: temperatury, wielkości frakcji surowca i czasu trwania ekstrakcji. Całkowita zawartość flawonoidów w ekstraktach pozyskanych z kory czereśni (*Prunus avium* L.) wynosiła od 2,47 do 6,71 mg(CE)/g suchego surowca. Wpływ badanych parametrów procesu na całkowitą zawartość flawonoidów w ekstraktach z kory czereśni przedstawiono na rysunku 8.

Na podstawie wyników analiz zawartości flawonoidów przeprowadzono wieloczynnikową analizę wariancji. Uzyskane wyniki wskazują, że jakość ekstraktu była zależna od wszystkich badanych parametrów tj.: temperatury rozpuszczalnika, wielkości frakcji surowca oraz czasu trwania procesu. Całkowita zawartość flawonoidów (TFC) w ekstraktach z kory czereśni wzrasta wraz z temperaturą do 137°C, dalszy wzrost temperatury powoduje spadek TFC. Wzrost wielkości frakcji surowca z 0,9 do 1,9 mm powoduje spadek zawartości flawonoidów w ekstraktach. Natomiast wydłużenie czasu trwania procesu skutkuje wzrostem zawartości flawonoidów. W tabeli 8 przedstawiono szczegóły analizy ANOVA.





(c)

Rysunek 8. Całkowita zawartość flawonoidów w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.) w funkcji: (a) temperatury, (b) wielkości frakcji surowca, (c) czasu trwania procesu.

Tabela 8. Wyniki analizy ANOVA całkowitej zawartości flawonoidów w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.).

	Suma kwadratów	df stopnie swobody	Średni kwadrat	F-wartość	p-wartość	
Model	0,0677	6	0,0113	61,47	< 0,0001	istotne
A – Temperatura	0,0182	1	0,0182	99,20	< 0,0001	
B – Wielkość frakcji surowca	0,0176	1	0,0176	96,22	< 0,0001	
C – Czas procesu	0,0029	1	0,0029	15,64	0,0027	
AB	0,0036	1	0,0036	19,76	0,0012	
A ² - Temperatura ²	0,0238	1	0,0238	129,54	< 0,0001	
B ² – Wielkość frakcji surowca ²	0,0023	1	0,0023	12,52	0,0054	
Pozostałość	0,0018	10	0,0002			
Brak dopasowania	0,0016	6	0,0003	3,74	0,1114	nieistotne
Błąd	0,0003	4	0,0001			
Skorygowana całkowita suma kwadratów	0,0695	16				
Statystyki dopasowania			R ²	0,9736		
Odchylenie standardowe	0,0135		Skorygowany R ²	0,9578		
Średnia	0,4765		Przewidywany R ²	0,8921		
C.V. %	2,84		Odpowiednia precyzja	30,5712		

Wartość statystyki F wynosząca 61,47 wskazuje na istotność wyznaczonego modelu matematycznego. Prawdopodobieństwo, że tak duża wartość statystyki F jest wynikiem szumu wynosi poniżej 0,01%. Parametry modelu są istotne jeśli wartość p jest mniejsza niż 0,05. W wyznaczonym modelu matematycznym istotne są wszystkie badane parametry tj.: temperatura, wielkość frakcji surowca i czas trwania procesu. Różnica między skorygowanym i przewidywanym współczynnikiem determinacji wynosząca zaledwie

0,066 wskazuje, że wyznaczony model matematyczny z odpowiednią dokładnością przewiduje nowe dane. Odpowiednia precyzja będąca miarą stosunku sygnału do szumu z wartością 30,57 wskazuje że model jest dobrze dopasowany i wystarczająco silny by dostarczyć wiarygodne prognozy. Wyznaczony model matematyczny ze względu na swoją istotność statystyczną może być używany do analizy obszaru badawczego w zakresie użytych zmiennych eksperymentalnych.

Model matematyczny wyrażony równaniem 5 może być wykorzystany do obliczenia całkowitej zawartości flawonoidów w ekstraktach z kory czereśni w badanym obszarze zmienności temperatury, wielkości frakcji surowca i czasu trwania procesu.

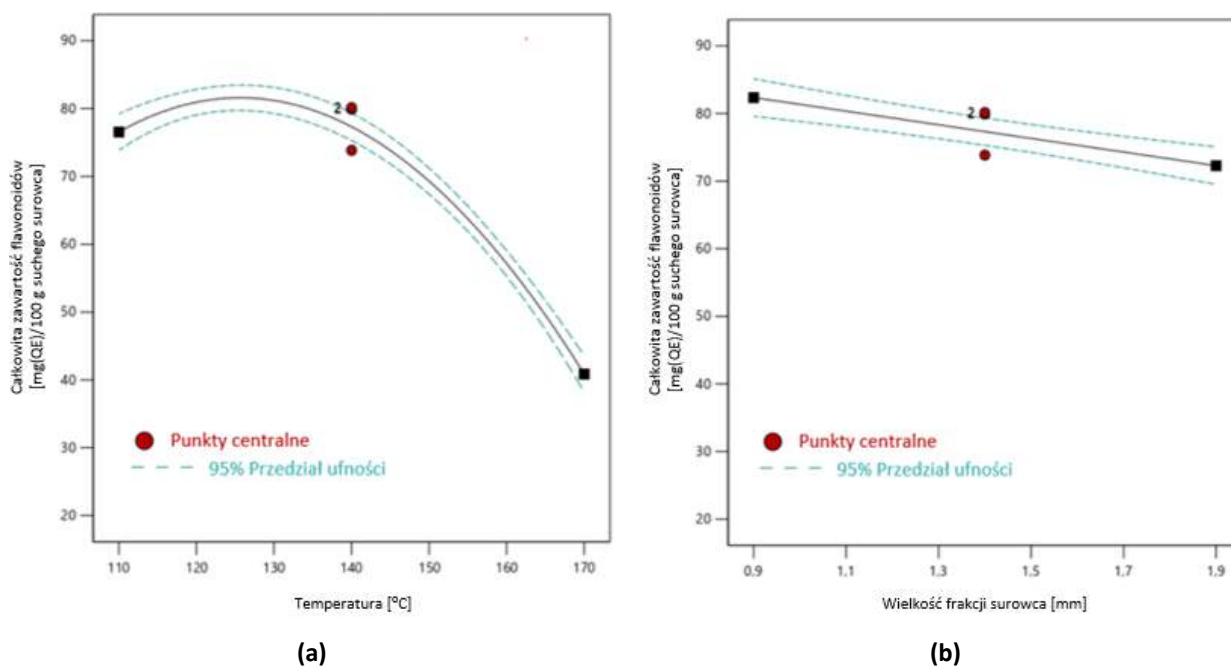
$$TFC = -0,093283 F_s^2 + 0,000188 T^2 - 0,003010 T \cdot F_s - 0,003787 t + \quad (5)$$

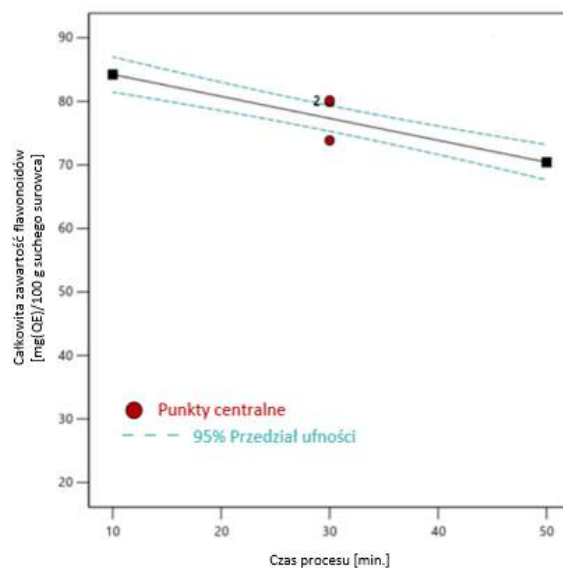
$$+ 0,746492 F_s - 0,046932 T + 3,10731$$

gdzie: TFC - całkowita zawartość flawonoidów [mg(CE)/g suchego surowca],

F_s – wielkość frakcji surowca [mm], T – temperatura [°C], t – czas trwania procesu [min.].

Na rysunkach 9-11 przedstawiono zależność całkowitej zawartości flawonoidów w ekstraktach pozyskanych z pozostałych badanych surowców. Rysunek 9 przedstawia wyniki badań kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.). Całkowita zawartość flawonoidów w pozyskanych ekstraktach rosła wraz ze wzrostem temperatury do wartości 131,6°C następnie malała. Wzrost wielkości frakcji surowca z 0,9 do 1,9mm, jak również wzrost czasu trwania procesu z 10 do 50 min. skutkowały zmniejszeniem zawartości flawonoidów w ekstraktach z *Juglans regia* L.

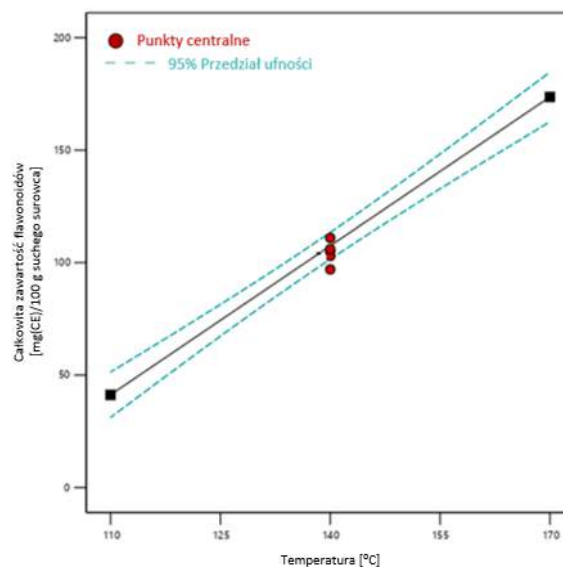




(c)

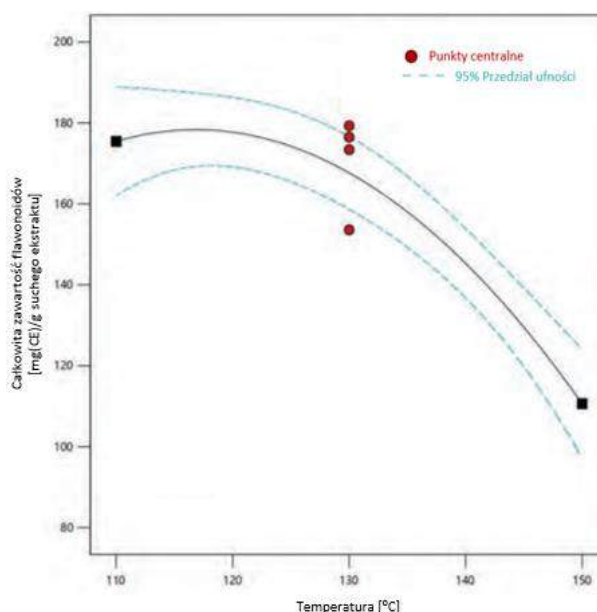
Rysunek 9. Całkowita zawartość flawonoidów w ekstraktach z kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) w funkcji: (a) temperatury, (b) wielkości frakcji surowca, (c) czasu trwania procesu.

Rysunek 10 przedstawia zależność całkowitej zawartości flawonoidów w próbkach pozyskanych przy użyciu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych z kory klonu (*Acer platanoides* L.). Wzrost temperatury ekstrakcji z 110°C do 170°C spowodował 7,2-krotny wzrost zawartości flawonoidów w pozyskanych ekstraktach. Przeprowadzone badania nie wykazały istotnego statystycznie wpływu kształtu reaktora (dla średnic wewnętrznych 10, 19,4 i 28,8mm) oraz czasu trwania ekstrakcji (5, 10 i 15min.) na całkowitą zawartość flawonoidów w ekstraktach z kory klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) pozyskanych przy użyciu wody w warunkach podkrytycznych.



Rysunek 10. Całkowita zawartość flawonoidów w ekstraktach z kory klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) w funkcji temperatury.

Rysunek 11 przedstawia zależność całkowitej zawartości flawonoidów w próbkach pozyskanych z kory dębu (*Quercus robur* L.). Wzrost temperatury ekstrakcji z 110°C do 116,5°C spowodował wzrost zawartości flawonoidów w pozyskanych ekstraktach, natomiast przekroczenie temperatury 116,5°C skutkowało obniżeniem całkowitej zawartości flawonoidów. Przeprowadzone badania nie wykazały istotnego statystycznie wpływu kształtu reaktora (dla średnic wewnętrznych 10, 19,4 i 28,8mm) oraz czasu trwania ekstrakcji (5, 10 i 15min.) na całkowitą zawartość flawonoidów w ekstraktach z kory dębu (*Quercus robur* L.) pozyskanych przy użyciu wody w warunkach podkrytycznych.



Rysunek 11. Całkowita zawartość flawonoidów w ekstraktach z kory dębu (*Quercus robur* L.) w funkcji temperatury.

Zawartość flawonoidów w produktach pochodzących z kory czereśni (*Prunus avium* L.) jest niedostatecznie poznana. Brakuje informacji dotyczących wpływu parametrów procesu na ilość flawonoidów w ekstraktach pozyskanych przy użyciu wody w warunkach podkrytycznych. Ekstrakty z kory dwóch gatunków drzew: orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) i klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) pozyskane przy użyciu wody w warunkach podkrytycznych zawierały flawonoidy w ilości odpowiednio 88,3 mg(QE)/100 g suchego surowca (QE - ekwiwalent kwercetyny) i 188 mg(CE)/100 g suchego surowca [17,18]. Podkrytyczne ekstrakty wodne pozyskane z kory dębu (*Quercus robur* L.) osiągnęły całkowitą zawartość flawonoidów wynoszącą 900,8 mg(CE)/100g suchego surowca [19]. Całkowita zawartość flawonoidów w ekstraktach pozyskanych z kory czereśni wynosząca 671 mg(CE)/100g suchego surowca znajdują się między wartościami osiągniętymi podczas badań kory klonu zwyczajnego i dębu. Zawartość flawonoidów w badanych ekstraktach

z kory czereśni (*Prunus avium* L.) oraz orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) była zależna od wpływu wszystkich wybranych do badań parametrów procesu, tj.: temperatury wody, wielkości frakcji surowca oraz czasu trwania ekstrakcji. Badania kory klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) i dębu (*Quercus robur* L.) wskazują na statystycznie istotną zależność zawartości flawonoidów od temperatury rozpuszczalnika. Wpływ kształtu celki ciśnieniowej i czasu trwania procesu na zawartość flawonoidów w ekstraktach z kory klonu zwyczajnego i dębu w badanym zakresie zmienności tych parametrów jest statystycznie nieistotny. Przeprowadzenie procesu w warunkach wysokiej temperatury powoduje wzrost szybkości (kinetyki) ekstrakcji. Rozpuszczalność metabolitów wtórnych wzrasta wraz ze wzrostem ciśnienia procesu, wskutek czego mogą szybko osiągnąć stężenia nasycenia. Vergara-Salinas i in. [23] wskazują na niewielki, a nawet pomijalny wpływ czasu trwania procesu na wydajność ekstrakcji w warunkach podkrytycznych. Zestawienie wyników badań wpływu parametrów procesowych i geometrycznych celki ciśnieniowej na całkowitą zawartość flawonoidów w ekstraktach z kory badanych gatunków drzew przedstawiono w tabeli 9.

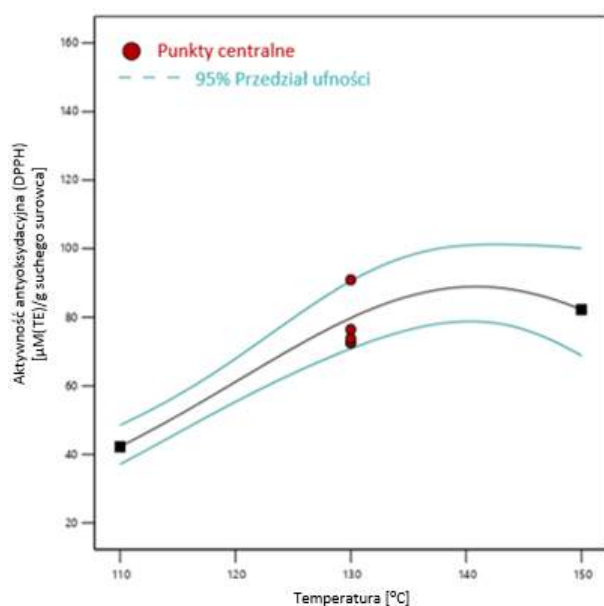
Tabela 9. Wpływ parametrów procesowych i geometrycznych celki ciśnieniowej na całkowitą zawartość flawonoidów w ekstraktach.

Surowiec	Zmienna (parametr)	Całkowita zawartość flawonoidów
Czereśnia <i>Prunus avium</i> L.	Wzrost temperatury procesu	wzrost do temperatury 137°C, następnie spadek
	Wzrost wielkości frakcji surowca	spadek
	Wzrost czasu trwania procesu	wzrost
	Zmiana średnicy reaktora	nie badano
Orzech włoski <i>Juglans regia</i> L.	Wzrost temperatury procesu	wzrost do temperatury 131,6°C, następnie spadek
	Wzrost wielkości frakcji surowca	spadek
	Wzrost czasu trwania procesu	spadek
	Zmiana średnicy reaktora	nie badano
Klon zwyczajny <i>Acer platanoides</i> L.	Wzrost temperatury procesu	wzrost w całym badanym zakresie 110 do 170°C
	Wzrost wielkości frakcji surowca	nie badano
	Wzrost czasu trwania procesu	brak wpływu w badanym zakresie
	Zmiana średnicy reaktora	brak wpływu w badanym zakresie
Dąb <i>Quercus robur</i> L.	Wzrost temperatury procesu	wzrost do temperatury 116,5°C, następnie spadek
	Wzrost wielkości frakcji surowca	nie badano
	Wzrost czasu trwania procesu	brak wpływu w badanym zakresie
	Zmiana średnicy reaktora	brak wpływu w badanym zakresie

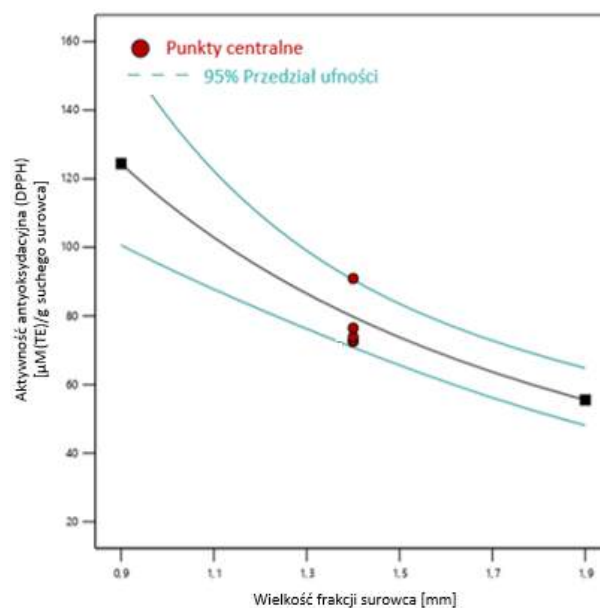
4.4. Aktywność antyoksydacyjna (DPPH)

Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów pozyskanych z kory czereśni (*Prunus avium* L.) zmieniała się w zależności od parametrów procesu od 28,31 do 134,36 x 10⁻⁶ MTE/g suchego surowca. Zależność aktywności antyoksydacyjnej od temperatury ekstrakcji, wielkości frakcji surowca i czasu trwania procesu przedstawiono na rysunku 12.

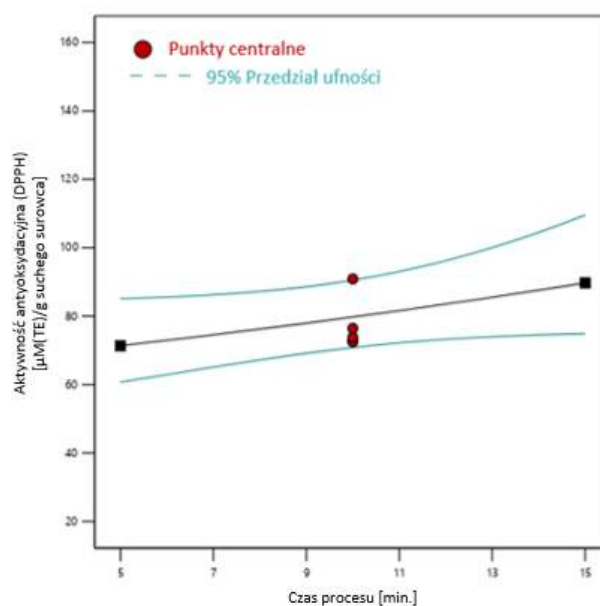
Na podstawie wyników badań aktywności antyoksydacyjnej przeprowadzono wieloczynnikową analizę wariancji. Uzyskane wyniki wskazują, że jakość ekstraktu mierzona jego aktywnością antyoksydacyjną była zależna od wszystkich badanych parametrów tj.: temperatury rozpuszczalnika, wielkości frakcji surowca oraz czasu trwania procesu. Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z kory czereśni pozyskanych przy użyciu wody w warunkach podkrytycznych wzrasta wraz z temperaturą do 141°C, dalszy wzrost temperatury powoduje spadek aktywności antyoksydacyjnej. Wzrost wielkości frakcji surowca z 0,9 do 1,9 mm powoduje spadek aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów, podczas gdy wydłużenie czasu trwania procesu skutkuje jej wzrostem. W tabeli 10 przedstawiono szczegóły analizy ANOVA.



(a)



(b)



(c)

Rysunek 12. Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z kory czereśni (*Prunus avium* L.) w funkcji: (a) temperatury, (b) wielkości frakcji surowca, (c) czasu trwania procesu.

Tabela 10. Wyniki analizy ANOVA aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów z kory czereśni (*Prunus avium* L.).

	Suma kwadratów	df stopnie swobody	Średni kwadrat	F-wartość	p-wartość	
Model	0,0101	5	0,0020	23,58	< 0,0001	istotne
A – Temperatura	0,0037	1	0,0037	43,54	< 0,0001	
B – Wielkość frakcji surowca	0,0039	1	0,0039	45,33	< 0,0001	
C – Czas procesu	0,0003	1	0,0003	3,75	0,0789	
AB	0,0005	1	0,0005	5,70	0,0360	
A ² - Temperatura ²	0,0017	1	0,0017	19,59	0,0010	
Pozostałość	0,0009	11	0,0001			
Brak dopasowania	0,0008	7	0,0001	4,27	0,0896	nieistotne
Błąd	0,0001	4	0,0000			
Skorygowana całkowita suma kwadratów	0,0111	16				
Statystyki dopasowania			R ²	0,9147		
Odchylenie standardowe	0,0093		Skorygowany R ²	0,8759		
Średnia	0,1225		Przewidywany R ²	0,7435		
C.V. %	7,56		Odpowiednia precyzja	18,7222		

Wartość statystyki F wynosząca 23,58 wskazuje na istotność wyznaczonego modelu matematycznego. Prawdopodobieństwo, że tak duża wartość statystyki F jest wynikiem szumu wynosi poniżej 0,01%. Parametry modelu są istotne jeśli wartość p jest mniejsza niż 0,05. W wyznaczonym modelu matematycznym istotne są wszystkie badane parametry tj.: temperatura, wielkość frakcji surowca i czas trwania procesu. Różnica między skorygowanym i przewidywanym współczynnikiem determinacji mniejsza niż 0,2

wskazuje, że wyznaczony model matematyczny z odpowiednią dokładnością przewiduje nowe dane. Odpowiednia precyzja będąca miarą stosunku sygnału do szumu z wartością 18,72 wskazuje że model jest dobrze dopasowany i wystarczająco silny by dostarczyć wiarygodne prognozy. Wyznaczony model matematyczny ze względu na swoją istotność statystyczną może być używany do analizy obszaru badawczego w zakresie użytych zmiennych eksperymentalnych.

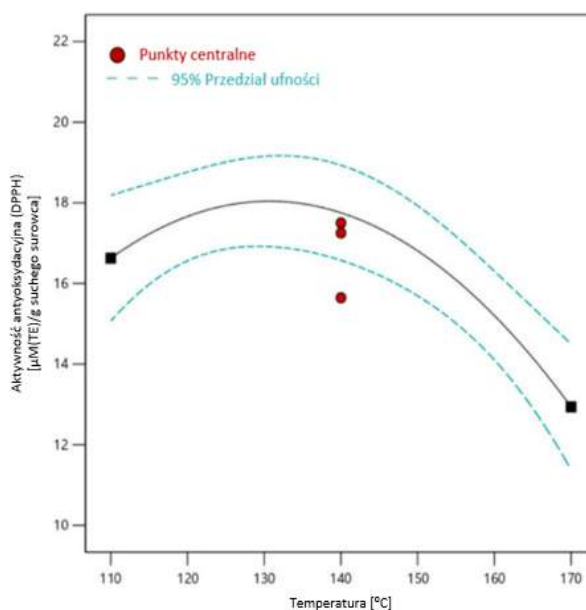
Model matematyczny wyrażony równaniem 6 może być wykorzystany do obliczenia aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów z kory czereśni w badanym obszarze zmienności temperatury, wielkości frakcji surowca i czasu trwania procesu.

$$AA_{DPPH} = 0,000050 T^2 - 0,001106 T \cdot Fs - 0,001268 t + \quad (6)$$

$$+ 0,187834 Fs - 0,012481 T + 0,844910$$

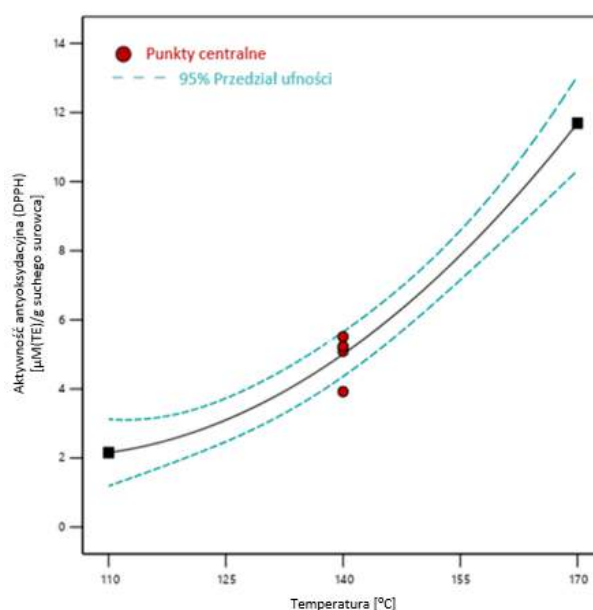
gdzie: AA_{DPPH} - Aktywność antyoksydacyjna oznaczona przy użyciu rodnika DPPH [$\mu\text{M}(\text{TE})/\text{g}$ suchego surowca], T – temperatura [$^{\circ}\text{C}$], Fs – wielkość frakcji surowca [mm], t – czas trwania procesu [min.].

Rysunek 13 przedstawia wyniki badań kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.). Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z kory orzecha włoskiego rośnie wraz z temperaturą procesu do wartości $131,6^{\circ}\text{C}$ następnie maleje. Nie zaobserwowano istotnego statystycznie wpływu zmiany wielkości frakcji surowca (od 0,9 do 1,9mm), jak również czasu trwania procesu (od 10 do 50 min.) na aktywność antyoksydacyjną ekstraktów pozyskanych w kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.).



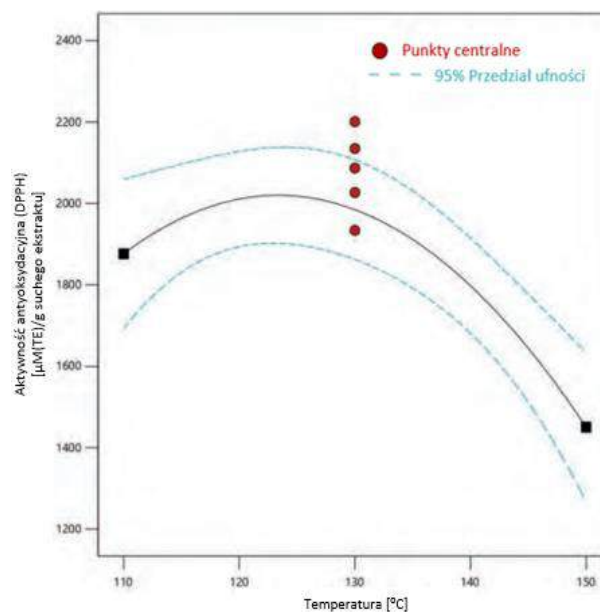
Rysunek 13. Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) w funkcji temperatury.

Rysunek 14 przedstawia zależność aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów pozyskanych przy użyciu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych z kory klonu (*Acer platanoides* L.). Wzrost temperatury ekstrakcji od 110°C do 170°C spowodował 12,6-krotny wzrost aktywności antyoksydacyjnej pozyskanych ekstraktów. Przeprowadzone badania nie wykazały istotnego statystycznie wpływu kształtu reaktora (dla średnic wewnętrznych 10, 19,4 i 28,8mm) oraz czasu trwania ekstrakcji (5, 10 i 15min.) na aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z kory klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.).



Rysunek 14. Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z kory klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) w funkcji temperatury.

Rysunek 15 przedstawia zależność aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów pozyskanych przy użyciu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych z kory dębu (*Quercus robur* L.). Wzrost temperatury ekstrakcji od 110°C do 123,2°C spowodował wzrost aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów, natomiast przekroczenie temperatury 123,2°C skutkowało obniżeniem aktywności antyoksydacyjnej. Przeprowadzone badania nie wykazały istotnego statystycznie wpływu kształtu reaktora (dla średnic wewnętrznych 10, 19,4 i 28,8mm) oraz czasu trwania ekstrakcji (5, 10 i 15min.) na aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z kory dębu (*Quercus robur* L.).



Rysunek 15. Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z kory dębu (*Quercus robur* L.) w funkcji temperatury.

Dostępne dane literaturowe wskazują na silną korelację między aktywnością antyoksydacyjną i całkowitą zawartością polifenoli [24]. Ekstrakty z kory dwóch gatunków drzew: orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) i klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) pozyskane przy użyciu wody w warunkach podkrytycznych osiągnęły aktywność antyoksydacyjną odpowiednio 21,3 i 16,24 x 10⁻⁶ M(TE)/g suchego surowca [17,18]. Podkrytyczne ekstrakty wodne pozyskane z kory dębu (*Quercus robur* L.) osiągnęły aktywność antyoksydacyjną wynoszącą 117,3 x 10⁻⁶ M(TE)/g suchego surowca [19]. Przeprowadzone badania kory czereśni (*Prunus avium* L.) wykazały aktywność antyoksydacyjną wynoszącą 134,36 x 10⁻⁶ M(TE)/g suchego surowca, co stanowiło wartość zbliżoną do kory dębu (*Quercus robur* L.). Aktywność antyoksydacyjna badanych ekstraktów z kory czereśni (*Prunus avium* L.) i kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) była zależna od wpływu wszystkich wybranych do badań parametrów procesu, tj.: temperatury rozpuszczalnika, wielkości frakcji surowca oraz czasu trwania ekstrakcji. Badania kory klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) i dębu (*Quercus robur* L.) wskazują na statystycznie istotną zależność aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów od temperatury procesu. Wpływu kształtu celki ciśnieniowej i czasu trwania procesu na aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z kory klonu zwyczajnego i dębu w badanym zakresie zmienności tych parametrów jest statystycznie nieistotny. W tabeli 11 przedstawiono wpływ parametrów procesowych i geometrycznych celki ciśnieniowej na aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z kory badanych gatunków drzew.

Tabela 11. Wpływ parametrów procesowych i geometrycznych celki ciśnieniowej na aktywność antyoksydacyjną ekstraktów.

Surowiec	Zmienna (parametr)	Aktywność antyoksydacyjna
Czereśnia <i>Prunus avium</i> L.	Wzrost temperatury procesu	wzrost do temperatury 141°C, następnie spadek
	Wzrost wielkości frakcji surowca	spadek
	Wzrost czasu trwania procesu	wzrost
	Zmiana średnicy reaktora	nie badano
Orzech włoski <i>Juglans regia</i> L.	Wzrost temperatury procesu	wzrost do temperatury 131,6°C, następnie spadek
	Wzrost wielkości frakcji surowca	spadek
	Wzrost czasu trwania procesu	spadek
	Zmiana średnicy reaktora	nie badano
Klon zwyczajny <i>Acer platanoides</i> L.	Wzrost temperatury procesu	wzrost w całym badanym zakresie 110 do 170°C
	Wzrost wielkości frakcji surowca	nie badano
	Wzrost czasu trwania procesu	brak wpływu w badanym zakresie
	Zmiana średnicy reaktora	brak wpływu w badanym zakresie
Dąb <i>Quercus robur</i> L.	Wzrost temperatury procesu	wzrost do temperatury 123,2°C, następnie spadek
	Wzrost wielkości frakcji surowca	nie badano
	Wzrost czasu trwania procesu	brak wpływu w badanym zakresie
	Zmiana średnicy reaktora	brak wpływu w badanym zakresie

4.5. Analiza chromatograficzna związków polifenolowych w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.)

Związki do oznaczeń chromatograficznych wybrano na podstawie informacji dostępnych w literaturze dotyczących polifenoli występujących w ekstraktach z różnych części i gatunków drzew. Wśród substancji występujących w ekstraktach z dębu zwiększających ich potencjał antyoksydacyjny znajdują się kwasy fenolowe, flawonoidy i taniny [25]. Dwa związki z grupy kwasów fenolowych takie jak pochodna kwasu protokatechowego i glikozyd kwasu protokatechowego, zostały opisane w kontekście owoców czereśni [26]. Pierwszy związek został zidentyfikowany przez Nunes i in. [27] i wskazał wyższe zawartości (1538,92 µg/g suchego ekstraktu) w odmianie *Satin Prunus avium* L. Gałęzie *Prunus avium* L. zawierają 7-O-heksozyd chyzyny [28,29]. Aires i in. [30] oznaczyli zawartość apigeniny wynoszącą 32,7±0,1 µg/g suchego ekstraktu pozyskanego z gałęzi *Prunus avium* L. Agarwal i in. [31] wskazują apigeninę jako jeden z najobficiej występujących związków chemicznych w korze czereśni. Häslér i in. [32] wskazują na występowanie kwasów fenolowych takich jak wanilinowy, ferulowy, p-kumarowy i protokatechowy w korze drzew powszechnie rosnących na terenie Europy. Kwasy

fenolowe jako związki o charakterze prozdrowotnym cechuje działanie antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwcukrzycowe, wykazują również działanie ochronne w chorobach sercowo-naczyniowych. Ze względu na właściwości prozdrowotne oraz obfite występowanie w korze drzew do oznaczeń chromatograficznych ekstraktów z kory czereśni (*Prunus avium* L.) wybrano następujące związki: kwas wanilinowy, kwas p-kumarowy, kwas ferulowy, kwas protokatechowy i apigeninę. W tabeli 12 przedstawiono wyniki analiz chromatograficznych ekstraktów z kory czereśni (*Prunus avium* L.).

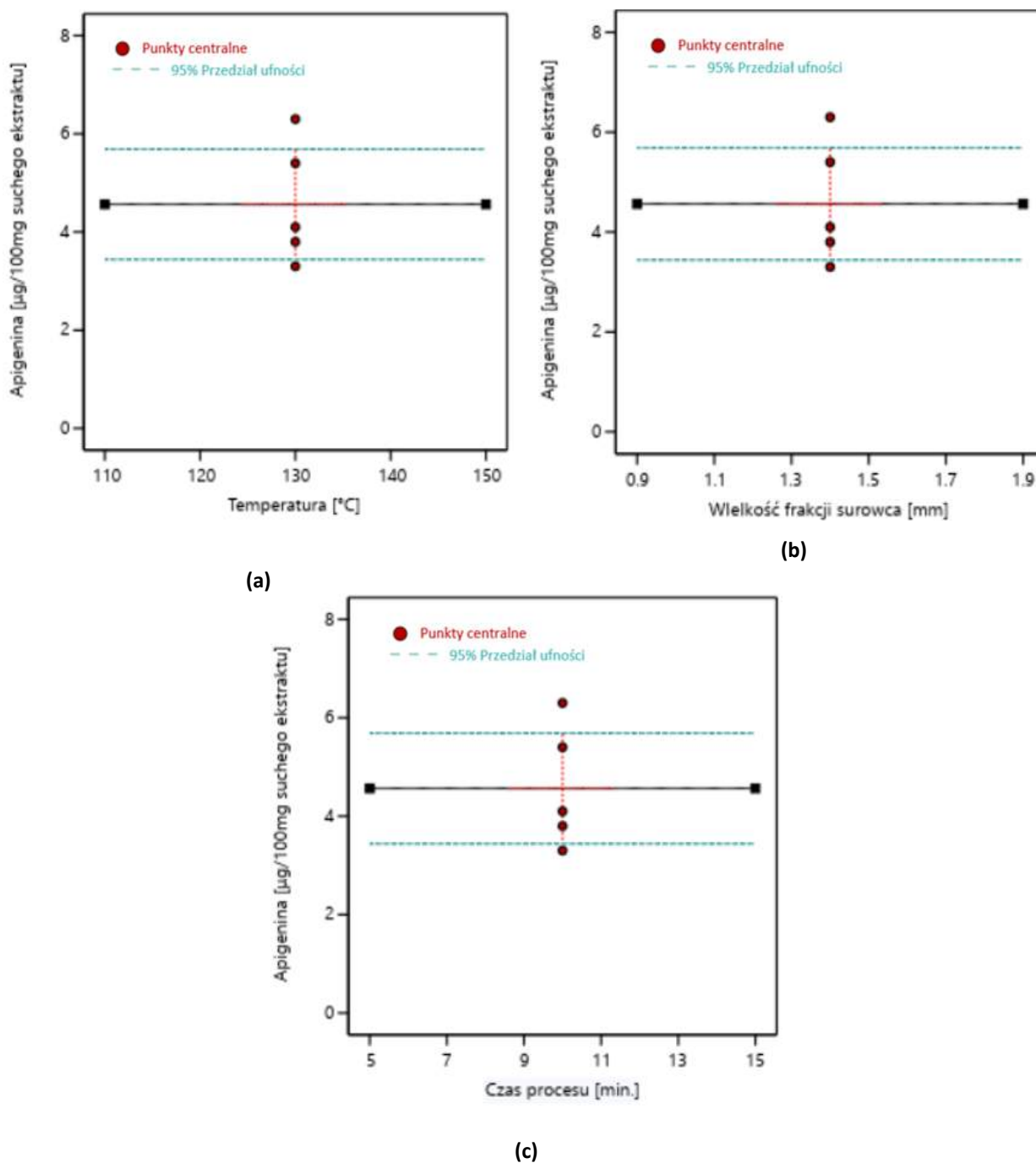
Tabela 12. Zawartość wybranych polifenoli w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.).

Zestaw	Apigenina	Kwas wanilinowy	Kwas ferulowy	Kwas p-kumarowy	Kwas protokatechowy
[µg/g suchego ekstraktu]					
1	31	258	104	66	1340
2	54	316	92	64	1730
3	23	326	97	69	1820
4	54	32	0	0	39
5	33	378	105	71	1790
6	49	141	25	46	677
7	68	518	160	145	2660
8	86	475	172	145	2200
9	92	672	196	183	3100
10	44	567	117	127	2590
11	22	92	12	135	251
12	0	37	0	0	0
13	60	490	87	97	2210
14	0	36	0	0	0
15	38	402	10	34	1440
16	81	175	36	73	721
17	46	204	31	59	780

Najwyższą zawartość oznaczanych związków polifenolowych stwierdzono w próbce numer 9, która odpowiada następującym warunkom procesu ekstrakcji: temperatura 150°C, wielkość frakcji surowca 1,4 mm, czas trwania procesu 5 min. W tych warunkach procesu uzyskano następujące zawartości polifenoli w ekstrakcie: apigenina 92 µg/g suchego ekstraktu (4,96 µg/g suchego surowca), kwas wanilinowy 672 µg/g suchego ekstraktu (36,2 µg/g suchego surowca), kwas ferulowy 196 µg/g suchego ekstraktu (10,56 µg/g suchego surowca), kwas p-kumarowy 183 µg/g suchego ekstraktu (9,86 µg/g suchego surowca) oraz kwas protokatechowy 3100 µg/g suchego ekstraktu (167 µg/g suchego surowca).

4.5.1. Zawartość apigeniny

Na podstawie wyników analiz chromatograficznych wybranych polifenoli i flawonoidów przeprowadzono wieloczynnikową analizę wariancji. Uzyskane wyniki wskazują, że zawartość apigeniny w ekstraktach była zależna tylko od interakcji pomiędzy wielkością frakcji surowca i czasem trwania procesu. W tabeli 13 przedstawiono szczegóły analizy ANOVA.



Rysunek 16. Zawartość apigeniny w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.) w funkcji: (a) temperatury, (b) wielkości frakcji surowca, (c) czasu trwania procesu.

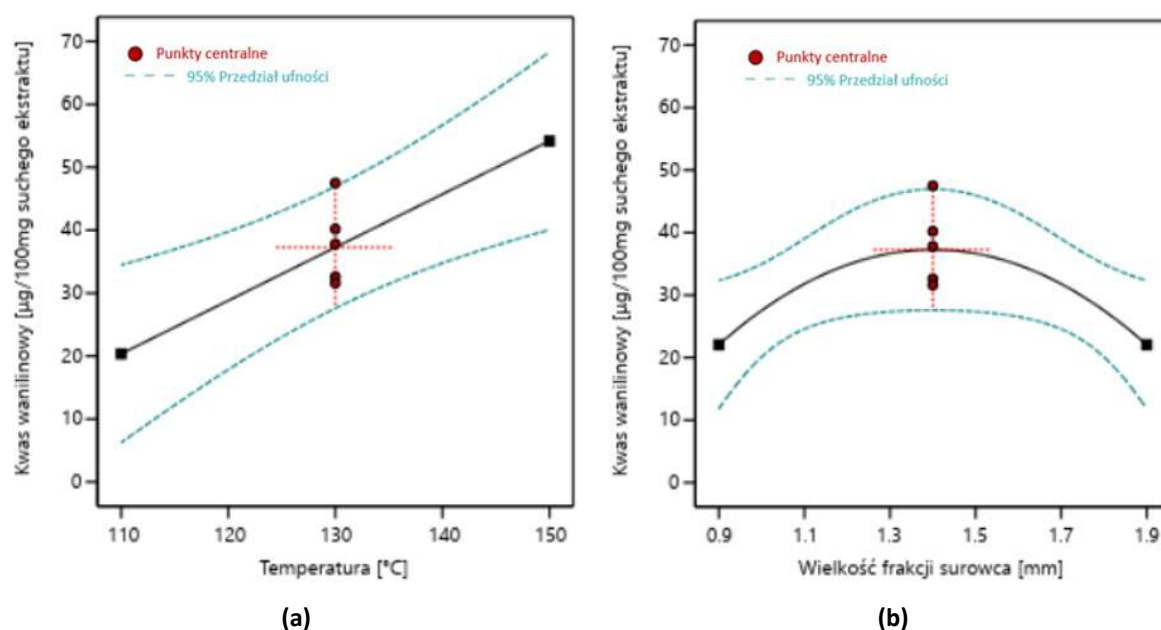
Tabela 13. Wyniki analizy ANOVA zawartości apigeniny w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.).

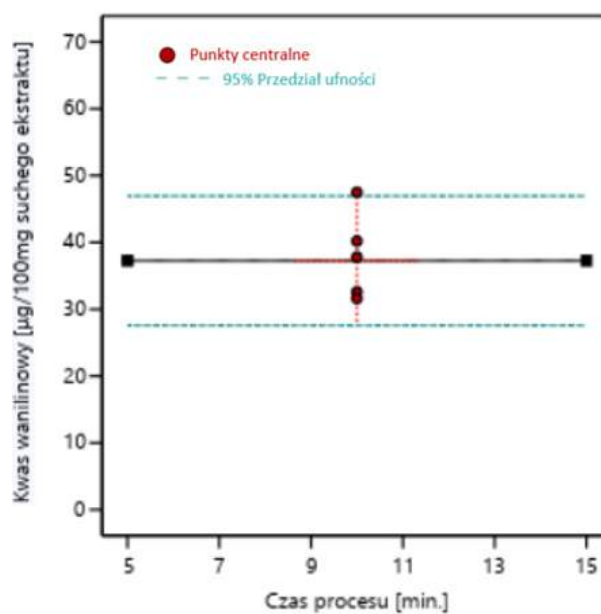
	Suma kwadratów	df stopnie swobody	Średni kwadrat	F-wartość	p-wartość	
Model	26,52	1	26,52	5,61	0,0317	istotne
BC – Wielkość frakcji surowca · Czas procesu	26,52	1	26,52	5,61	0,0317	
Pozostałość	70,88	15	4,73			
Brak dopasowania	64,77	11	5,89	3,86	0,1021	nieistotne
Błąd	6,11	4	1,53			
Skorygowana całkowita suma kwadratów	97,40	16				
Statystyki dopasowania			R ²	0,2723		
Odchylenie standardowe	2,17		Skorygowany R ²	0,2238		
Średnia	4,56		Przewidywany R ²	0,0616		
C.V. %	47,62		Odpowiednia precyzja	6,9074		

Wartość statystyki F wynosząca 5,61 wskazuje na istotność wyznaczonego modelu matematycznego. Prawdopodobieństwo, że tak duża wartość statystyki F jest wynikiem szumu wynosi zaledwie 3,17%. W wyznaczonym modelu matematycznym istotna jest jedynie interakcja między wielkością frakcji surowca i czasem trwania procesu. Biorąc pod uwagę niską wartość współczynnika determinacji wynoszącą jedynie 0,2723 wyznaczony model matematyczny ze względu na zbyt niski stopień dopasowania do danych doświadczalnych nie powinien być używany do analizy obszaru badawczego.

4.5.2. Zawartość kwasu wanilinowego

Na rysunkach 17 a-c przedstawiono wpływ parametrów procesowych na zawartość kwasu wanilinowego w korze czereśni (*Prunus avium* L.).





(c)

Rysunek 17. Zawartość kwasu wanilinowego w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.) w funkcji: (a) temperatury, (b) wielkości frakcji surowca, (c) czasu trwania procesu.

Tabela 14. Wyniki analizy ANOVA zawartości kwasu wanilinowego w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.).

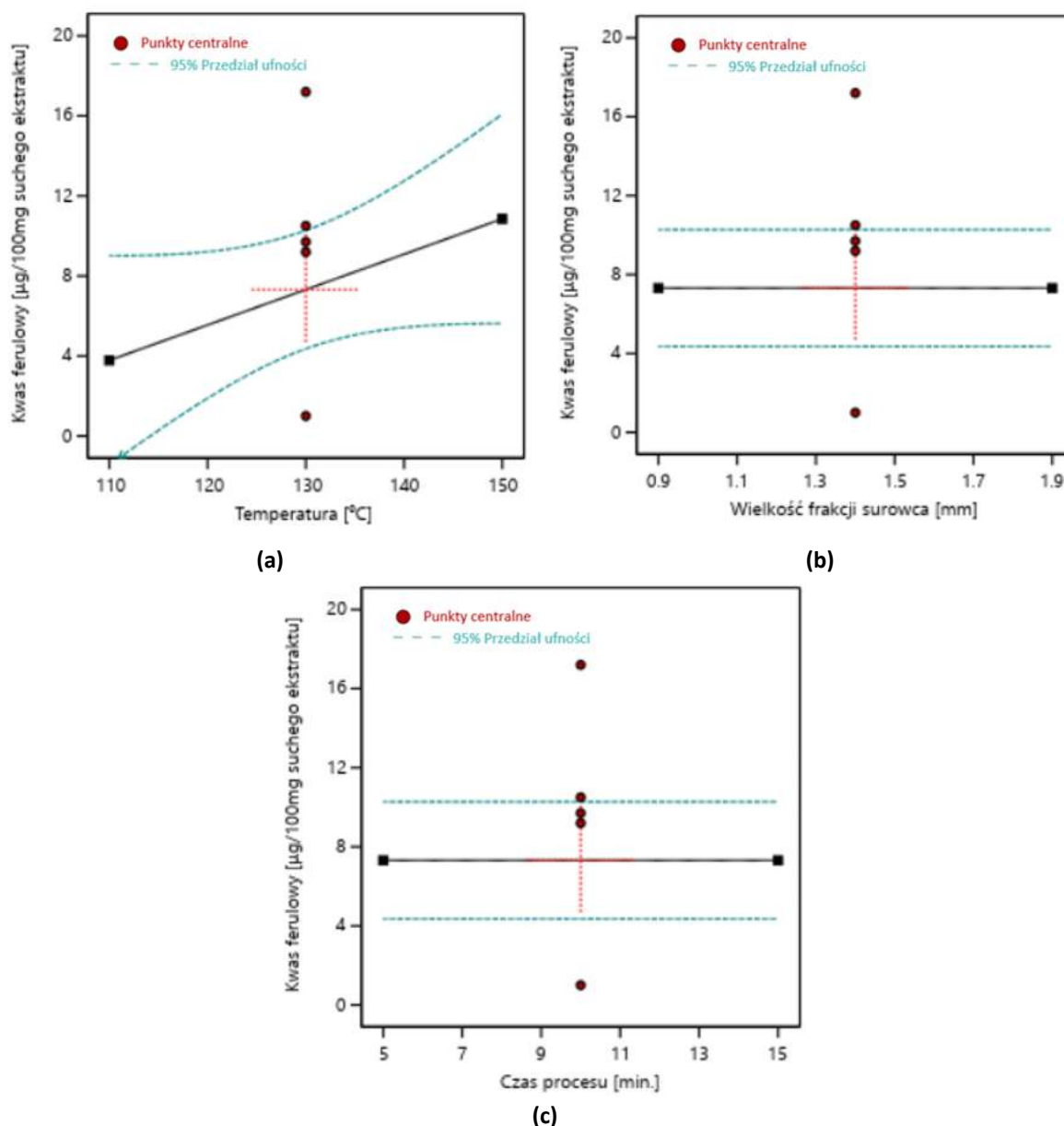
	Suma kwadratów	df stopnie swobody	Średni kwadrat	F-wartość	p-wartość	
Model	4119,96	3	1373,32	7,59	0,0035	istotne
A – Temperatura	2288,26	1	2288,26	12,65	0,0035	
AB	852,64	1	852,64	4,71	0,0490	
B ² – Wielkość frakcji surowca ²	979,06	1	979,06	5,41	0,0368	
Pozostałość	2351,64	13	180,90			
Brak dopasowania	2186,41	9	242,93	5,88	0,0517	nieistotne
Błąd	165,23	4	41,31			
Skorygowana całkowita suma kwadratów	6471,60	16				
Statystyki dopasowania			R ²	0,6366		
Odchylenie standardowe	13,45		Skorygowany R ²	0,5528		
Średnia	30,11		Przewidywany R ²	0,3149		
C.V. %	44,67		Odpowiednia precyzja	9,7530		

W tabeli 14 przedstawiono wyniki analizy ANOVA. Wartość statystyki F wynosząca 7,59 wskazuje na istotność wyznaczonego modelu matematycznego. Prawdopodobieństwo, że wartość statystyki F tej wielkości jest wynikiem szumu wynosi zaledwie 0,35%. Parametry modelu są istotne jeśli wartość p jest mniejsza niż 0,05. W wyznaczonym modelu matematycznym istotne są temperatura procesu, wielkość frakcji surowca i interakcja pomiędzy nimi. Różnica między skorygowanym $R^2 = 0,5528$ i przewidywanym $R^2 = 0,3149$ wynosząca powyżej 0,2 wykazuje na możliwość występowania niedokładności modelu.

Biorąc pod uwagę niską wartość współczynnika determinacji wynoszącą 0,6366 wyznaczony model matematyczny ze względu na zbyt niski stopień dopasowania do danych doświadczalnych nie powinien być używany do analizy obszaru badawczego.

4.5.3. Zawartość kwasu ferulowego

Na rysunkach 18 a-c przedstawiono wpływ parametrów procesowych na zawartość kwasu ferulowego w korze czereśni (*Prunus avium* L.). Zawartość kwasu ferulowego w ekstraktach z kory czereśni była zależna od temperatury procesu oraz interakcji pomiędzy temperaturą i czasem trwania procesu. Zawartość kwasu ferulowego w ekstraktach rosła wraz ze wzrostem temperatury w całym badanym obszarze. W tabeli 15 przedstawiono wyniki analizy ANOVA.



Rysunek 18. Zawartość kwasu ferulowego w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.) w funkcji: (a) temperatury, (b) wielkości frakcji surowca, (c) czasu trwania procesu.

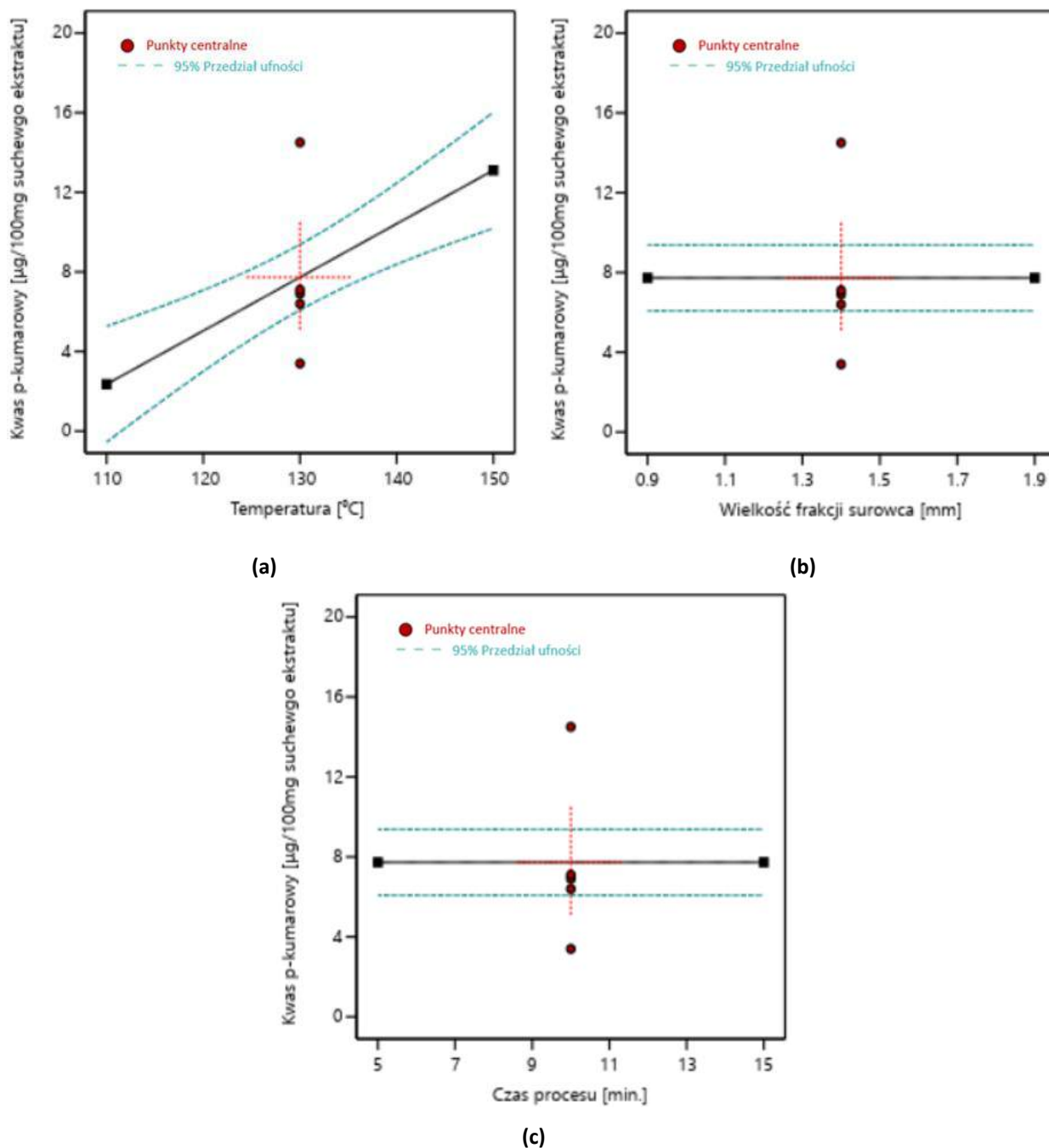
Tabela 15. Wyniki analizy ANOVA zawartości kwasu ferulowego w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.).

	Suma kwadratów	df stopnie swobody	Średni kwadrat	F-wartość	p-wartość	
Model	213,53	2	106,77	3,30	0,0670	nieistotne
A – Temperatura	100,11	1	100,11	3,09	0,1005	
AC – Temperatura · Czas procesu	113,42	1	113,42	3,50	0,0822	
Pozostałość	453,13	14	32,37			
Brak dopasowania	320,46	10	32,05	0,9662	0,5641	nieistotne
Błąd	132,67	4	33,17			
Skorygowana całkowita suma kwadratów	666,66	16				
Statystyki dopasowania			R ²	0,3203		
Odchylenie standardowe	5,69		Skorygowany R ²	0,2232		
Średnia	7,32		Przewidywany R ²	0,0943		
C.V. %	77,75		Odpowiednia precyzja	7,4166		

Wartość statystyki F wynosząca 3,30 oznacza, że istnieje 6,7% prawdopodobieństwo wystąpienia błędów modelu z powodu szumu. Parametry modelu są istotne jeśli wartość p jest mniejsza niż 0,05. W wyznaczonym modelu matematycznym żaden z analizowanych parametrów nie jest statystycznie istotny, co w połączeniu z niską wartością współczynnika determinacji wynoszącą 0,3203 czyni wyznaczony model matematyczny nieprzydatnym do analizy obszaru badawczego.

4.5.4. Zawartość kwasu p-kumarowego

Na rysunkach 19 a-c przedstawiono wpływ parametrów procesowych na zawartość kwasu p-kumarowego w korze czereśni (*Prunus avium* L.). Analiza statystyczna wyników badań chromatograficznych wskazuje na zależność zawartości kwasu p-kumarowego od temperatury rozpuszczalnika, interakcji pomiędzy temperaturą i czasem trwania procesu oraz interakcji pomiędzy wielkością frakcji surowca i czasem trwania procesu.



Rysunek 19. Zawartość kwasu p-kumarowego w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.) w funkcji: (a) temperatury, (b) wielkości frakcji surowca, (c) czasu trwania procesu.

W tabeli 16 przedstawiono wyniki analizy ANOVA. Wartość statystyki F wynosząca 11.86 wskazuje na istotność wyznaczonego modelu matematycznego. Prawdopodobieństwo, że wartość statystyki F tej wielkości jest wynikiem szumu wynosi zaledwie 0.05%. Parametry modelu są istotne jeśli wartość p jest mniejsza niż 0.05. W wyznaczonym modelu matematycznym istotne są: temperatura procesu, interakcja pomiędzy temperaturą i czasem trwania procesu oraz interakcja pomiędzy wielkością frakcji surowca i czasem trwania procesu. Różnica między skorygowanym i przewidywanym

współczynnikiem determinacji mniejsza niż 0.2 wskazuje, że wyznaczony model matematyczny z odpowiednią dokładnością przewiduje nowe dane. Odpowiednia precyzja będąca miarą stosunku sygnału do szumu z wartością 12.025 wskazuje że model jest dobrze dopasowany i wystarczająco silny by dostarczyć wiarygodne prognozy. Wyznaczony model matematyczny ze względu na swoją istotność statystyczną może być używany do analizy obszaru badawczego w zakresie użytych zmiennych eksperymentalnych.

Tabela 16. Wyniki analizy ANOVA zawartości kwasu p-kumarowego w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.).

	Suma kwadratów	df stopnie swobody	Średni kwadrat	F-wartość	p-wartość	
Model	352,09	3	117,36	11,86	0,0005	istotne
A – Temperatura	231,12	1	231,12	23,36	0,0003	
AC – Temperatura · Czas procesu	57,76	1	57,76	5,84	0,0311	
BC – Wielkość frakcji surowca · Czas procesu	63,20	1	63,20	6,39	0,0253	
Pozostałość	128,65	13	9,90			
Brak dopasowania	61,24	9	6,80	0,4037	0,8811	nieistotne
Błąd	67,41	4	16,85			
Skorygowana całkowita suma kwadratów	480,74	16				
Statystyki dopasowania			R ²	0,7324		
Odchylenie standardowe	3,15		Skorygowany R ²	0,6706		
Średnia	7,73		Przewidywany R ²	0,5792		
C.V. %	40,70		Odpowiednia precyzja	12,0254		

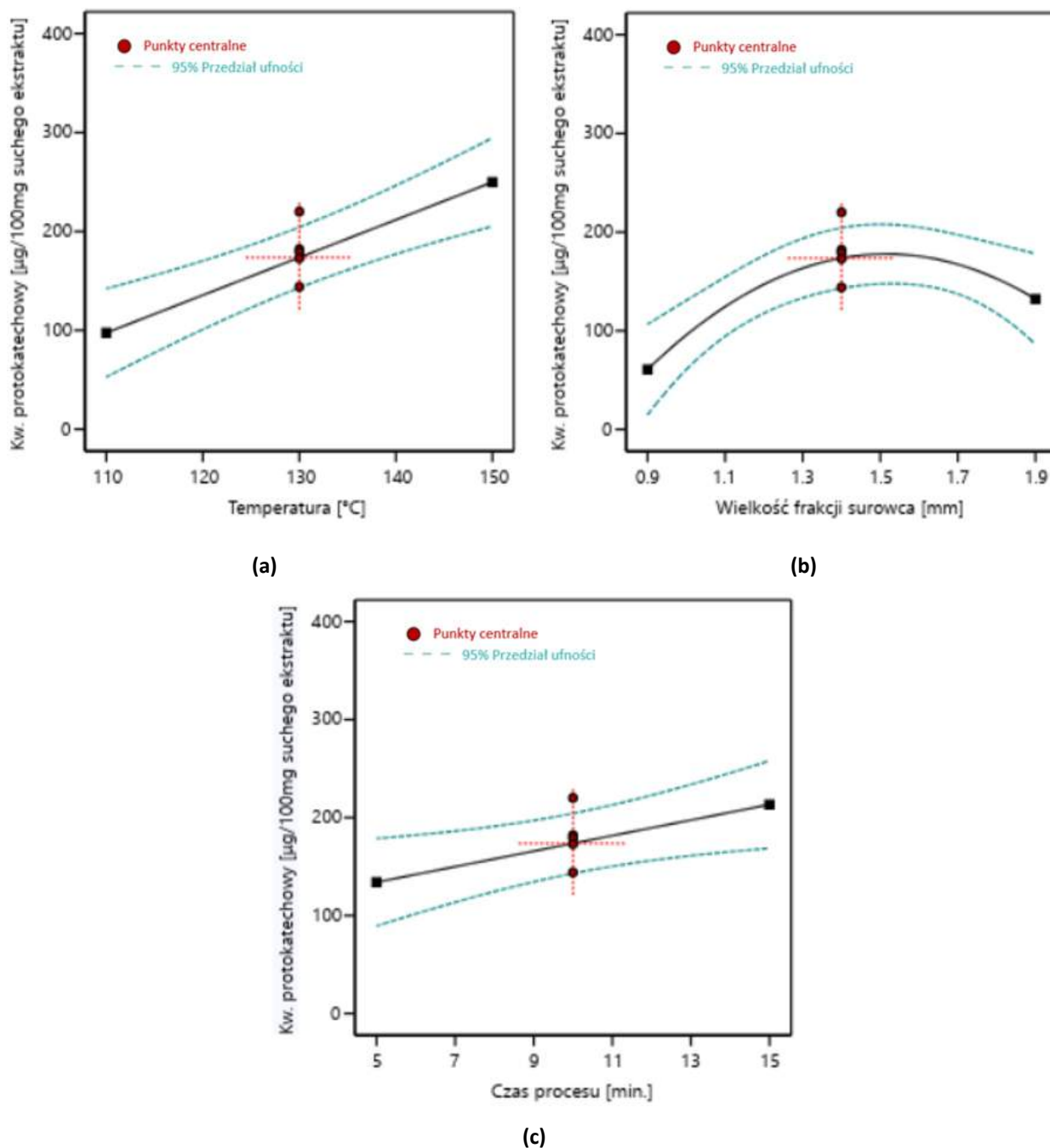
Wyznaczony model matematyczny ze względu na brak hierarchiczności przedstawiono jedynie przy użyciu wartości unormowanych.

$$Kwas\ p - kumarowy = 5,38 T - 3,80 T \cdot t + 3,98 Fs \cdot t + 7,73 \quad (7)$$

gdzie: *Kwas p – kumarowy* – zawartość kwasu p-kumarowego [μ g/100mg suchego ekstraktu], *T* – temperatura procesu [bezwymiarowa], *t* – czas trwania procesu [bezwymiarowa], *F_s* – wielkość frakcji surowca [bezwymiarowa].

4.5.5. Zawartość kwasu protokatechowego

Na rysunkach 20 a-c przedstawiono wpływ parametrów procesowych na zawartość kwasu protokatechowego w korze czereśni (*Prunus avium* L.). Zawartość kwasu protokatechowego była zależna od wszystkich analizowanych parametrów tj.: temperatury rozpuszczalnika, wielkości frakcji surowca, czasu trwania procesu oraz interakcji pomiędzy tymi parametrami.



Rysunek 20. Zawartość kwasu protokatechowego w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.) w funkcji: (a) temperatury, (b) wielkości frakcji surowca, (c) czasu trwania procesu.

W tabeli 17 przedstawiono wyniki analizy ANOVA. Wartość statystyki F wynosząca 12,63 wskazuje na istotność wyznaczonego modelu matematycznego. Prawdopodobieństwo, że tak duża wartość statystyki F jest wynikiem szumu wynosi zaledwie 0,05%. Parametry modelu są istotne jeśli wartość p jest mniejsza niż 0,05. W wyznaczonym modelu matematycznym istotne są wszystkie badane parametry tj.: temperatura, wielkość frakcji surowca, czas trwania procesu oraz interakcje pomiędzy tymi parametrami. Odpowiednia precyzja będąca miarą stosunku sygnału do szumu z wartością

10,807 wskazuje że model jest dobrze dopasowany i wystarczająco silny by dostarczyć wiarygodne prognozy. Biorąc pod uwagę wartość współczynnika determinacji wynoszącą 0,9076 wyznaczony model matematyczny może być używany do analizy obszaru badawczego w zakresie użytych zmiennych eksperymentalnych.

Tabela 17. Wyniki analizy ANOVA zawartości kwasu protokatechowego w ekstraktach z kory czereśni (*Prunus avium* L.).

	Suma kwadratów	df stopnie swobody	Średni kwadrat	F-wartość	p-wartość	
Model	1,460e+05	7	20850,25	12,63	0,0005	istotne
A – Temperatura	46436,28	1	46436,28	28,13	0,0005	
B – Wielkość frakcji surowca	10224,50	1	10224,50	6,19	0,0345	
C – Czas procesu	12553,20	1	12553,20	7,60	0,0222	
AB	22156,32	1	22156,32	13,42	0,0052	
AC	12432,25	1	12432,25	7,53	0,0227	
BC	16913,00	1	16913,00	10,24	0,0108	
B ² – Wielkość frakcji surowca ²	25236,23	1	25236,23	15,29	0,0036	
Pozostałość	14858,96	9	1615,00			
Brak dopasowania	11909,76	5	2381,95	3,23	0,1395	nieistotne
Błąd	2949,20	4	737,30			
Skorygowana całkowita suma kwadratów	1,608e+05	16				
Statystyki dopasowania			R ²	0,9076		
Odchylenie standardowe	40,63		Skorygowany R ²	0,8357		
Średnia	137,34		Przewidywany R ²	0,4738		
C.V. %	29,59		Odpowiednia precyzja	10,8068		

Wyznaczony model matematyczny przedstawiono jako równanie 8.

$$Kwas\ protokatechowy = -308,76667 Fs^2 + 26,01 Fs \cdot t - 0,5575 T \cdot t + 7,4425 T \cdot Fs + 43,9835 t - 291,57833 Fs - 1,03512 T - 112,13475 \quad (8)$$

gdzie: *Kwas protokatechowy* – zawartość kwasu protokatechowego [$\mu\text{g}/100\text{mg}$ suchego ekstraktu], *Fs* – wielkość frakcji surowca [mm], *t* – czas trwania procesu [min.], *T* – temperatura procesu [$^{\circ}\text{C}$].

Badania chromatograficzne ekstraktów z kory czereśni (*Prunus avium* L.) wraz z przeprowadzoną analizą wskazują na występowanie maksymalnej zawartości wybranych związków polifenolowych przy następujących parametrach procesu: temperatura 150°C , wielkość frakcji surowca 1,4 mm, czas trwania procesu 5 min. W tych warunkach uzyskano następujące zawartości badanych związków:

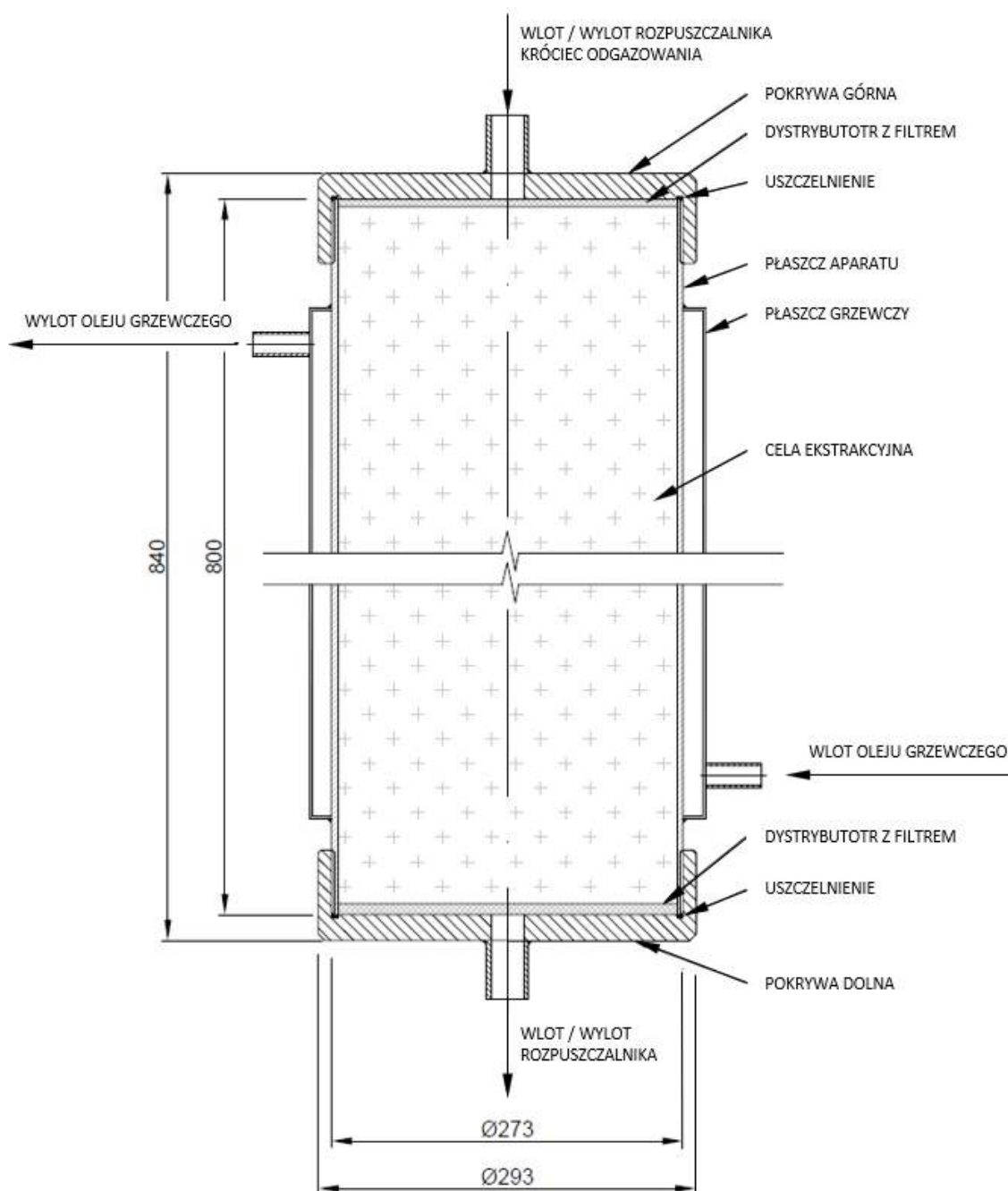
- apigenina $92 \mu\text{g}/\text{g}$ suchego ekstraktu ($4,96 \mu\text{g}/\text{g}$ suchego surowca),

- kwas wanilinowy 672 $\mu\text{g/g}$ suchego ekstraktu (36,2 $\mu\text{g/g}$ suchego surowca),
- kwas ferulowy 196 $\mu\text{g/g}$ suchego ekstraktu (10,56 $\mu\text{g/g}$ suchego surowca),
- kwas p-kumarowy 183 $\mu\text{g/g}$ suchego ekstraktu (9,86 $\mu\text{g/g}$ suchego surowca),
- kwas protokatechowy 3100 $\mu\text{g/g}$ suchego ekstraktu (167 $\mu\text{g/g}$ suchego surowca).

Zawartość apigeniny w otrzymanym ekstrakcie była 2,8 razy wyższa niż oznaczona przez Aires i in. [30] w gałęziach czereśni, natomiast zawartość kwasu protokatechowego była 2 razy wyższa niż oznaczona przez Nunes i in. [27] w owocach czereśni.

4.6. Projekt konstrukcyjny celi ekstraktora ciśnieniowego

Badania procesu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych przeprowadzone przy użyciu kory dwóch gatunków drzew klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) i dębu (*Quercus robur* L.) nie wykazały istotnego statystycznie wpływu kształtu celi ciśnieniowej na jakość pozyskanych ekstraktów mierzoną całkowitą zawartością polifenoli, całkowitą zawartością flawonoidów i aktywnością antyoksydacyjną. Ze względu na brak wyżej opisanej zależności proces projektowania celi ciśnieniowej systemu ekstrakcji powinien być determinowany przez kryteria związane z wytrzymałością mechaniczną, statecznością konstrukcji, ergonomią, jak również specyficznymi wymaganiami dedykowanymi dla określonych gałęzi przemysłu takimi jak m.in. HACCP i GMP. Na rysunku 21 przedstawiono propozycję celi ciśnieniowej systemu ekstrakcji o pojemności 40 dm³. Cylindryczną celę ciśnieniową wyposażono w górną i dolną pokrywę zamykającą wyposażoną w króćce wlotowy i wylotowy rozpuszczalnika oraz odgazowujący. Przepływ wody (napełnianie celi ekstrakcyjnej) możliwy jest od góry i od dołu, aczkolwiek ze względu na równomierność napełniania celi ekstrakcyjnej i konieczność jej odgazowania zalecane jest napełnianie dolnym króćcem. W takim przypadku króciec górny będzie wykorzystany do odgazowania celi. Górną i dolną pokrywę należy wyposażyć również w system dystrybucji wody zapewniający równomierność jej napływu oraz filtrację. Zastosowanie systemu filtracji ma na celu ochronę pozostałych elementów systemu ekstrakcyjnego w tym w szczególności pompy przed przedostaniem się rozdrobnionego surowca. Zastosowanie dwóch pokryw (górną i dolną) wraz z odpowiednim doborem średnicy i długości płaszcza aparatu ma na celu ułatwienie załadunku, wyładunku surowca jak również czyszczenia urządzenia. Jest to szczególnie istotne w przypadku jego zastosowania w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym.



Rysunek 21. Cella ciśnieniowa ekstraktora o pojemności 40 dm³.

Dodatkowe umieszczenie obrotowych sworzni w połowie płaszcza aparatu i zastosowanie elastycznych połączeń systemu ogrzewania celi ciśnieniowej pozwoli na obrót urządzenia do położenia poziomego, co w znacznym stopniu ułatwi obsługę i przeprowadzenie czynności serwisowych przed i po zakończeniu procesu ekstrakcji. Cella ekstrakcyjną wyposażono w płaszcz grzewczy zasilany olejem z zewnętrznego systemu ogrzewania i kontroli temperatury. Przyłącza górnej i dolnej pokrywy należy wyposażyć w półautomatyczne szybkozłącza wykorzystywane do napełniania, opróżniania,

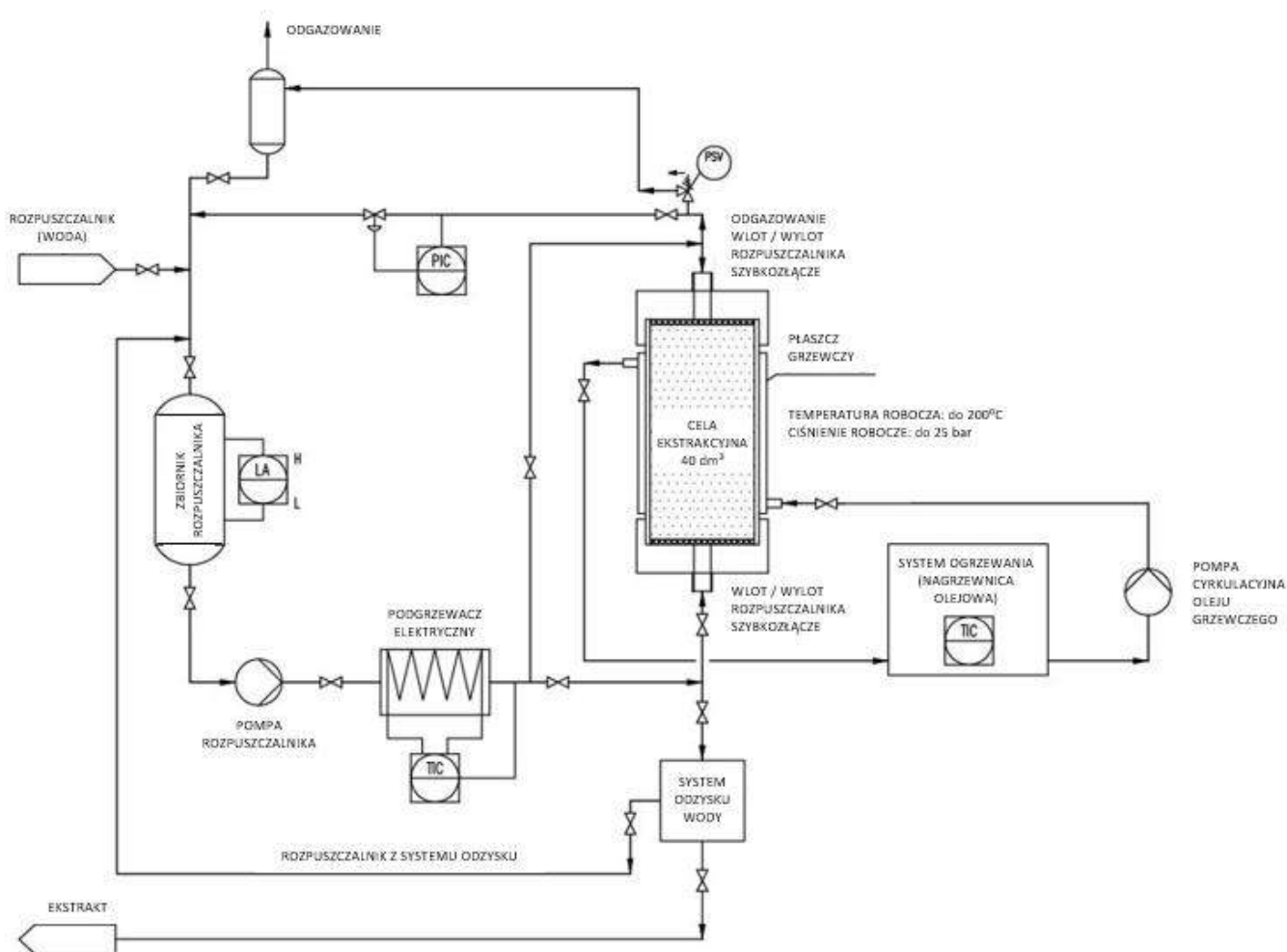
odgazowania i kontroli ciśnienia procesu ekstrakcji. Zastosowane ciśnienie ekstrakcji powinno zabezpieczać cały system przed wrzeniem wody. Dla takiego ciśnienia należy zaprojektować aparat.

4.7. Projekt technologiczny instalacji do pozyskiwania substancji bioaktywnych w warunkach podkrytycznych

Proces ekstrakcji podkrytycznej może być bezpieczną dla człowieka i środowiska naturalnego metodą separacji związków bioaktywnych z surowców roślinnych. Jest to metoda separacyjna wpisująca się w cykl gospodarki o obiegu zamkniętym. Woda jako ekologiczny rozpuszczalnik może być oczyszczana i odparowywana po zakończeniu procesu ekstrakcji w celu jej ponownego użycia. Punkt krytyczny wody występuje przy ciśnieniu $P_{cr}=22,09$ MPa i temperaturze $T_{cr}=374,14^{\circ}\text{C}$.

Ekstrakcja wodą w warunkach podkrytycznych jako technika separacyjna może być skalowana do wydajności przemysłowych, aczkolwiek podgrzewanie dużych ilości wody do wysokich temperatur ekstrakcji, a następnie odparowywanie wody w celu zatężenia pozyskanych ekstraktów jest procesem energochłonnym, wymagającym czasu. Z tego powodu kluczową kwestią jest dobór optymalnych parametrów procesu, zapewniających wymaganą jakość pozyskanego ekstraktu przy minimalizacji kosztu jego wytwarzania (energochłonności procesu). Ze względu na spadek całkowitej zawartości polifenoli, flawonoidów i aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów pozyskanych z kory wymienionych powyżej trzech gatunków drzew po przekroczeniu temperatury ekstrakcji wynoszącej $120\div 140^{\circ}\text{C}$ zasadnym jest projektowanie systemu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych dla temperatur roboczych do 200°C . Przekroczenie tego poziomu temperatury będzie związane z degradacją jakości ekstraktu przy jednoczesnym wzroście kosztu jego produkcji, jak również kosztu budowy urządzeń używanych w procesie ekstrakcji.

W celu zabezpieczenia systemu ekstrakcji przed zjawiskiem wrzenia rozpuszczalnika (wody) wszystkie jego elementy składowe powinny być zaprojektowane na ciśnienie robocze przeciwdziałające temu zjawisku. Wiedząc, że przemiana fazowa wody o temperaturze 200°C zachodzi pod ciśnieniem 15,55 bar oraz zakładając 50% margines bezpieczeństwa, system ekstrakcji powinien być zaprojektowany na ciśnienie robocze 25 bar. Schemat technologiczny systemu do ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych przedstawiono na rysunku 22.



Rysunek 22. Schemat technologiczny systemu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych.

Zaproponowany system do przeprowadzania ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych wyposażono w celę ekstrakcyjną o pojemności 40 dm³, zaprojektowaną na temperaturę roboczą do 200°C i ciśnienie robocze 25 bar. Ultraczysta woda (jakość laboratoryjna) jest dostarczana do zbiornika rozpuszczalnika wyposażonego w przetwornik poziomu z alarmem poziomu wysokiego i niskiego. Przygotowanie wody odbywa się w instalacji zewnętrznej. Obieg wody w systemie ekstrakcji, napełnienie celi ekstrakcyjnej, jej przemycie oraz wytworzenie niezbędnego ciśnienia zapewniane jest przez pompę rozpuszczalnika. Między pompą rozpuszczalnika i celą ekstrakcyjną umieszczono podgrzewacz elektryczny zapewniający podgrzanie wody do temperatury 90÷95°C, wyposażony w system monitorowania i regulacji temperatury (TIC – Temperature Indication and Control). Dalsze ogrzanie celi ekstrakcyjnej do właściwej temperatury ekstrakcji zapewniane jest przez płaszcz grzewczy zasilany z zewnętrznego systemu ogrzewania

olejowego wyposażonego w dedykowany system monitorowania i regulacji temperatury. Cella ekstrakcyjna może być napełniana wodą od dołu do góry i odwrotnie. Ze względu na równomierność napływu rozpuszczalnika zalecane jest napełnianie od dołu ku górze. Taki sposób napełniania ułatwi również odgazowanie celi ekstrakcyjnej. Napływ wody od góry powinien być stosowany w celu przepłukania celi ekstrakcyjnej po zakończeniu procesu ekstrakcji. Połączenia procesowe obu pokryw (górnej i dolnej) wyposażone są w półautomatyczne szybkozłacza ułatwiające obsługę i czynności serwisowe. Układ monitorowania i regulacji ciśnienia (PIC – Pressure Indication and Control) połączony z zaworem rozprężnym zapewnia regulację ciśnienia w układzie ekstrakcyjnym oraz kontroluje pracę pompy rozpuszczalnika. Zawór bezpieczeństwa PSV (PSV – Pressure Safety Valve) zabezpiecza pętlę ekstrakcyjną przed wystąpieniem zbyt wysokiego ciśnienia. Jako, że woda w układzie ekstrakcji może mieć temperaturę do 200°C jej rozprężenie od ciśnienia 25 bar bezpośrednio do atmosfery może stanowić poważne zagrożenie dla obsługi. W przypadku zadziałania zaworu bezpieczeństwa gorąca woda pod ciśnieniem uwalniana jest do zbiornika rozprężnego gdzie następuje jej rozprężenie do ciśnienia atmosferycznego i związane z redukcją ciśnienia odparowanie. Część pary wytworzonej w ten sposób, która ulegnie skropleniu może zostać ponownie zawrócona do zbiornika rozpuszczalnika, pozostała część w postaci pary o zredukowanych parametrach (obniżonej temperaturze i ciśnieniu) zostanie usunięta ze zbiornika rozprężnego w bezpiecznej lokalizacji.

Po zakończeniu procesu ekstrakcji rozpuszczalnik wraz z ekstraktem jest dostarczany do układu odparowania rozpuszczalnika (systemu odzysku wody), w którym następuje zatężenie ekstraktu przy jednoczesnym odzysku rozpuszczalnika. Odparowana i ponownie skroplona woda jest zawracana do zbiornika rozpuszczalnika, natomiast zatężony ekstrakt przekazywany do zbiornika magazynującego.

5. Wnioski

- Wpływ temperatury procesu na wydajność ekstrakcji ma charakter złożony i zależy od badanego surowca. Wzrost temperatury procesu ekstrakcji kory wszystkich badanych gatunków drzew w początkowej fazie powodował wzrost całkowitej zawartości polifenoli, całkowitej zawartości flawonoidów i aktywności antyoksydacyjnej. W przypadku kory czereśni (*Prunus avium* L.) obserwowano wzrost wszystkich trzech parametrów określających jakość ekstraktu do osiągnięcia temperatury $140\pm 3^{\circ}\text{C}$, następnie obserwowano degradację jakości ekstraktu objawiającą się spadkiem zawartości polifenoli, flawonoidów i aktywności antyoksydacyjnej. W przypadku kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) punktem granicznym (wzrost / spadek jakości ekstraktu) była temperatura $131,6^{\circ}\text{C}$, natomiast kory dębu (*Quercus robur* L.) $120\pm 3,5^{\circ}\text{C}$. Badania ekstraktów z klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) wykazują wzrost zawartości polifenoli, flawonoidów i aktywności antyoksydacyjnej wraz ze wzrostem temperatury procesu w całym badanym zakresie zmienności tego parametru od 110 do 170°C .
- Wpływ czasu trwania procesu na wydajność ekstrakcji zależy od rodzaju surowca. W przypadku kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) wzrost czasu trwania procesu z 10 do 50 min. spowodował spadek całkowitej zawartości polifenoli, flawonoidów i aktywności antyoksydacyjnej. Przed upływem 10 min. procesu ekstrakcji osiągnięto maksymalne stężenia polifenoli, flawonoidów oraz maksymalną aktywność antyoksydacyjną ekstraktów. W przedziale czasu od 10 do 50 min. następował proces degradacji ekstraktu pod względem zawartości oznaczanych związków i aktywności antyoksydacyjnej. Ze względu na wyżej opisane obserwacje korę pozostałych gatunków drzew badano dla przedziału czasu 5 do 15 min. W przypadku kory czereśni (*Prunus avium* L.) w całym zakresie zmienności czasu trwania procesu obserwowano wzrost zawartości polifenoli, flawonoidów i aktywności antyoksydacyjnej. Wzrost ten miał charakter liniowy i wynosił 50% w przypadku całkowitej zawartości polifenoli oraz 20% w przypadku całkowitej zawartości flawonoidów i aktywności antyoksydacyjnej. Badania kory klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) i dębu (*Quercus robur* L.) nie wykazały wpływu zmiany czasu trwania procesu w badanym zakresie (5 do 15 min.) na jakość ekstraktów. Wzrost zawartości polifenoli, flawonoidów i aktywności antyoksydacyjnej wystąpił przed upływem 5 min. trwania procesu ekstrakcji. Takie zachowanie procesu wynika z szybkiej kinetyki ekstrakcji w warunkach wysokiej

temperatury i ciśnienia. W czasie tym ustaliła się równowaga stężeń związków bioaktywnych między wnętrzem komórki roślinnej i otaczającym ją rozpuszczalnikiem.

- Wzrost wielkości frakcji surowca z 0,9 do 1,9 mm spowodował spadek całkowitej zawartości polifenoli, całkowitej zawartości flawonoidów i aktywności antyoksydacyjnej.
- Przeprowadzone badania nie wykazały istotnego statystycznie wpływu parametrów geometrycznych i kształtu celki ciśnieniowej na wydajność procesu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych.

BIBLIOGRAFIA

1. Vardanega, R.; Carvalho, P.I.N.; Santos, D.T.; Angela, M.; Meireles, A. Obtaining prebiotic carbohydrates and beta-ecdysone from Brazilian ginseng by subcritical water extraction. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2017**, *42*, 73–82.
2. Nastić, N.; Svarc-Gajić, J.; Delerue-Matos, C.; Fatima Barroso, M.; Soares, C.; Moreira, M.M.; Morais, S.; Masković, P.; Gaurina Srcek, V.; Slivac, I.; et al. Subcritical water extraction as an environmentally-Friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *111*, 579.
3. Awaluddin, S.A.; Thiruvankadam, S.; Izhar, S.; Hiroyuki, Y.; Danquah, M.K.; Harun, R. Subcritical water technology of enhanced extraction of biochemical compounds from *Chlorella vulgaris*. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 5816974.
4. King, J.W.; Grabiell, R.D. Isolation of Polyphenolic Compounds from Fruits or Vegetables Utilizing Sub-Critical Water Extraction. U.S. Patent 7208181B1, 24 April **2007**.
5. Treutter, D. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regul.* **2001**, *34*, 71–89.
6. Smith, R.M. Superheated water: The ultimate green solvent for separation science. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 419–421.
7. Sahin, H.; Topuz, A.; Pischetsrieder, M.; Ozdemir, F. Effect of roasting process on phenolic, antioxidant and browning properties of carob powder. *Eur Food Res Technol.* **2009**, *230*, 155–161.
8. Nastić, N.; Svatc-Gajić, J.; Delerue-Matos, C.; Morais, S.; Fatima Barroso, M.; Moreira, M.M. Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (*Teucrium montanum* L.). *J. Supercrit. Fluids* **2018**, *138*, 200–206.
9. Rodriguez-Meizoso, I.; Jaime, L.; Santoyo, S.; Senorans, F.J.; Cifuentes, A.; Ibanez, E. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 456–463.
10. Zakaria, S.M.; Kamal, S.M.M. Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: Applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Eng. Rev.* **2016**, *8*, 23–34.
11. Cvetanovic, A.; Svarc-Gajic, J.; Zekovic, Z.; Jerkocic, J.; Zengin, G.; Gasić, U.; Tesić, Z.; Masković, P.; Soares, C.; Fatima Barroso, M.; et al. The Influence of the extraction temperature on polyphenolic profiles and bioactivity of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) subcritical water extracts. *Food Chem.* **2019**, *271*, 328–337.
12. Aryal, S.; Baniya, M.K.; Danekhu, K.; Kunwar, P.; Gurung, R. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants* **2019**, *8*, 96–108.
13. ThermoFisher Scientific Company – Products Information. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/083157/tabs?defaultTab=0>
14. Kobus, Z.; Krzywicka, M.; Starek-Wójcicka, A.; Sagan, A. Effect of the duty cycle of the ultrasonic processor on the efficiency of extraction of phenolic compounds from *Sorbus intermedia*. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 8311.
15. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200.
16. Agarwal, C.; Hofmann, T.; Vršanská, M.; et al. In vitro antioxidant and antibacterial activities with polyphenolic profiling of wild cherry, the European larch and sweet chestnut tree bark. *Eur Food Res Technol* **2021**, *247*, 2355–2370 (2021).
17. Kaminski, P.; Tyskiewicz, K.; Fekner, Z.; Gruba, M.; Kobus, Z. The Influence of Subcritical Water Extraction Parameters on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Walnut (*Juglans regia* L.) Bark Extracts. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 12490.

18. Kamiński, P.; Gruba, M.; Fekner, Z.; Tyśkiewicz, K.; Kobus, Z. The Influence of Water Extraction Parameters in Subcritical Conditions and the Shape of the Reactor on the Quality of Extracts Obtained from Norway Maple (*Acer platanoides* L.). *Processes* **2023**, *11*, 3395.
19. Kamiński, P.; Tyśkiewicz, K.; Fekner, Z.; Kobus, Z.; Gruba, M. The effect of reactor design and water extraction parameters under subcritical conditions on the quality of extracts from oak bark (*Quercus robur* L.). *Przemysł Chemiczny* **2024**, *103/6*, 695-710.
20. Gupta, A.; Behl, T.; Panichayupakaranan, P. A review of phytochemistry and pharmacology profile of *Juglans regia*. *Obes. Med.* **2019**, *16*, 100142.
21. Chamali, S.; Bendaoud, H.; Bouajila, J.; Camy, S.; Saadaoui, E.; Condoret, J.S.; Romdhane, M. Optimization of accelerated solvent extraction of bioactive compounds from *Eucalyptus intertexta* using response surface methodology and evaluation of its phenolic composition and biological activities. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **35** (2023) 100464.
22. Liang, X.; Nielsen, N.J.; Christensen, J.H. Selective pressurized liquid extraction of plant secondary metabolites: *Convallaria majalis* L. as a case. *Analytica Chimica Acta: X* **4**, 1–8. **2020**.
23. Vergara-Salinas, J.R.; Perez-Jimenez, J.; Torres, J.L.; Agosin, E.; Perez-Correa, J.R. Effects of Temperature and Time on Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in the Pressurized Hot Water Extraction of Deodorized Thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60** (2012), 10920–10929.
24. Mamphiswana, N.D.; Mashela, P.W.; Mdee, L.K. Distribution of total phenolics and antioxidant activity in fruit, leaf, stem and root of *Monsoniaborkeana*. *Afr. J. Agric. Res.* **2010**, *5*, 2570–2575.
25. Othón-Díaz, E.D.; Fimbres-García, J.O.; Flores-Sauceda, M.; Silva-Espinoza, B.A.; López-Martínez, L.X.; Bernal-Mercado, A.T.; Ayala-Zavala, J.F. Antioxidants in Oak (*Quercus* sp.): Potential Application to Reduce Oxidative Rancidity in Foods. *Antioxidants* **2023**, *12*, 861.
26. Melini, V.; Melini, F.; Luziatelli, F.; Ruzzi, M. Functional Ingredients from Agri-Food Waste: Effect of Inclusion Thereof on Phenolic Compound Content and Bioaccessibility in Bakery Products. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1216.
27. Nunes, A.R.; Gonçalves, A.C.; Falcão, A.; Alves, G.; Silva, L.R. *Prunus avium* L. (Sweet Cherry) By-Products: A Source of Phenolic Compounds with Antioxidant and Anti-Hyperglycemic Properties - A Review. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 8516.
28. Nunes, A.R.; Gonçalves, A.C.; Alves, G.; Falcão, A.; García-Viguera, C.; Moreno, D.A.; Silva, L.R. Valorisation of *Prunus avium* L. By-Products: Phenolic Composition and Effect on Caco-2 Cells Viability. *Foods* **2021**, *10*, 1185.
29. Bastos, C.; Barros, L.; Duenas, M.; Calhelha, R.C.; Queiroz, M.J.R.P.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C.F.R. Chemical characterization and bioactive properties of *Prunus avium* L.: The widely studied fruits and the unexplored stems. *Food Chem.* **2015**, *173*, 1045–1053.
30. Aires, A.; Dias, C.; Carvalho, R.; Saavedra, M.J. Analysis of glycosylated flavonoids extracted from sweet-cherry stems, as antibacterial agents against pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Acta Biochim. Pol.* **2017**, *64*, 265–271.
31. Agarwal, C.; Hofmann, T.; Vršanská, M. In vitro antioxidant and antibacterial activities with polyphenolic profiling of wild cherry, the European larch and sweet chestnut tree bark. *Eur Food Res Technol* **247**, 2355–2370 (2021).
32. Häslér Gunnarsdóttir, S.; Sommerauer, L.; Schnabel, T.; Oostingh, G.J.; Schuster, A. Antioxidative and Antimicrobial Evaluation of Bark Extracts from Common European Trees in Light of Dermal Applications. *Antibiotics (Basel)*. **2023** Jan 9;12(1):130.




**PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY
DOKTORSKIEJ**

P1 Kamiński P., Tyśkiewicz K., Fekner Z., Gruba M., Kobus Z.; “*The Influence of Subcritical Water Extraction Parameters on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Walnut (*Juglans regia L.*) Bark Extracts*”. Applied Sciences 2022, 12, 12490.

Article

The Influence of Subcritical Water Extraction Parameters on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Walnut (*Juglans regia* L.) Bark Extracts

Piotr Kamiński ^{1,2} , Katarzyna Tyśkiewicz ² , Zygmunt Fekner ², Marcin Gruba ² and Zbigniew Kobus ^{1,*} ¹ Department of Technology Fundamentals, University of Life Sciences, Głęboka 28, 20-612 Lublin, Poland² Łukasiewicz Research Network—New Chemical Syntheses Institute, Al. Tysiąclecia Państwa Polskiego 13a, 24-110 Puławy, Poland

* Correspondence: zbigniew.kobus@up.lublin.pl

Abstract: This study investigated the impact of subcritical water extraction parameters on the polyphenols and flavonoids content in extracts made of the bark of walnut (*Juglans regia* L.), as well as antioxidant activity measured using the DPPH and FRAP methods. The total polyphenols (TPC) and flavonoid (TFC) were determined using the spectrophotometric (UV-Vis) method. The response surface methodology (RSM) was employed to optimize the yield of bioactive compounds. On the basis of developed model, the highest polyphenols (192.2 mg (GAE)/100 g (dry mass)) (GAE—gallic acid equivalent), flavonoids (88.3 mg(QE)/100 g (dry mass)) (QE—quercetin equivalent) contents and antioxidant activity (21.3×10^{-6} MTE/1 g (dry mass)) (TE-Trolox equivalent) were obtained under the following extraction conditions: temperature 131.6 °C, raw material fraction size 0.9 mm and process time 10 min. The greatest impact on the extraction yield was observed in the case of the temperature, whereas the raw material fraction size and the process time had a secondary impact. Obtained results indicate that a smaller particle size and a shorter time may improve the process; however, a reduction in particle size can be challenging for a pressure cell filtration system and consequently increase the cost of the raw material pretreatment process. With the reduction in the process time, a lower cost of extract production can be achieved. This study confirmed the importance of a proper selection of extraction parameters to obtain the demanded extract composition.

Keywords: subcritical water; extraction; polyphenols; flavonoids; antioxidant activity; response surface methodology; Box-Behnken; *Juglans regia* L.; optimization



Citation: Kamiński, P.; Tyśkiewicz, K.; Fekner, Z.; Gruba, M.; Kobus, Z. The Influence of Subcritical Water Extraction Parameters on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Walnut (*Juglans regia* L.) Bark Extracts. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 12490. <https://doi.org/10.3390/app122312490>

Academic Editor: Rafael López Núñez

Received: 15 November 2022

Accepted: 2 December 2022

Published: 6 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Phenolic compounds are secondary metabolites present in various parts of plants [1,2]. They belong to the group of biologically active compounds and their production depends on various enzymes participating in metabolic reactions [3]. The metabolism of these compounds is integrated with the biochemical and morphological regulatory patterns of plants [4]. Phenolic compounds in plants are used as protective substances against various types of stress that can be caused by environmental conditions, pathogens and injuries [1]. They have a key role in plant defense mechanisms [5,6]. Green walnut, shell, husk, kernel, bark, root and leaves of *Juglans regia* L. are widely used in the pharmaceutical and cosmetic industries [7]. The research carried out showed that walnuts have a higher antioxidant activity than pistachios and hazelnuts [8]. Walnuts are considered a good source of tocopherols and essential fatty acids [9,10]. Moreover, walnuts contain other compounds that may be beneficial in promoting human health, including polyphenols, tannins, folate [11], dietary fiber, protein, melatonin [12] and sterols [9,13]. The leaves and bark of walnuts are used as a natural dye for wool colorization [14]. Extracts prepared with different parts of the walnut have anti-inflammatory, blood purifying, anticancer, cleansing and detergent properties [15]. The water extract made with walnut bark protects

mice against biochemical toxicity caused by cyclophosphamide [16]. It contains several therapeutically active ingredients, especially polyphenols [17,18]. The bark of *Juglans regia* L. contains chemical components such as β -sitosterol, ascorbic acid, juglone, folic acid, gallic acid, regiolone, and quercetin-3-O- α -l-arabinoside [19]. The results of several other studies demonstrated that in most cases the extracts obtained from different parts of the walnut using alcohols, water or a mixture of them demonstrated a higher content of phenols than the extracts of other non-polar solvents such as petroleum ether, chloroform, n-butanol, benzene and cyclohexane. Polar solvents such as methanol, ethanol, water, acetone and ethyl acetate are believed to be the best solvents for polyphenols extraction [20]. The dried bark of walnut contains significant amounts of polyphenols. The extraction of *Juglans regia* L. bark using ethyl acetate allowed us to obtain polyphenols in the amount of 34.83 mg GAE/g (dry mass) [21]. Other studies indicated the possibility of obtaining 138.5 mg GAE/g (dry mass) (using ethyl acetate as a solvent), 311.5 mg GAE/g (dry mass) (using diluted acetone), 172.5 mg GAE/g (dry mass) (using methanol extract), 182 mg GAE/g (dry mass) (using water extract) [22].

Subcritical water extraction is one of the most promising, scalable to industrial capacity and environmentally friendly isolation methods of biologically active compounds from plant raw materials [23–25]. The unique properties of water in a subcritical state are mainly due to a relatively high boiling point, high dielectric constant and high polarity [26]. With the increase in the water temperature, its electric permittivity decreases, diffusion rate increases and viscosity together with surface tension decreases. Consequently, materials with a high polarity and high solubility in water under normal conditions are extracted more efficiently at low temperatures, while low-polar and non-polar compounds require less polar medium to be present at elevated temperatures [1,27,28]. Nastić et al. [28] described the correlation of an increase in the phenols content in the extract with an increase in the temperature, as a result of the water polarity decrease. An increase in the water temperature increases the diffusion rate and desorption kinetics, and increases the dissociation of compounds. A reduction in viscosity and the surface tension of water, as a result of a temperature increase, improves the quality of contact between the solvent and the raw material. A combination of the above-mentioned changes in the properties of water as a solvent increases mass transfer coefficients, resulting in a higher process rate and efficiency.

Study of the subcritical extraction process indicates a higher antioxidant activity of extracts obtained by this method compared to other extraction methods, emphasizing at the same time the strong influence of the process temperature on antioxidant activity [28–33].

Knowledge about the influence of process parameters such as temperature, raw material fraction size and process time on the composition and bioactivity of obtained extracts for selected parts and plant species is a key factor for the development of the optimal design of devices for the extraction process, allowing us to increase the process efficiency and reduce the production cost.

The available literature data describe in detail the bioactivity of individual parts of the walnut, such as the green walnut, shell, husk, kernel, and leaves, but do not contain information on the flavonoid content and antioxidant activity of bark extracts. There are also no studies available on the influence of the parameters of the water extraction process under subcritical conditions on the biological activity of the obtained extracts. For this reason, the aim of this study was to investigate the effect of process parameters on the content of polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity of obtained extracts as well as the determination of optimal parameters.

2. Materials and Methods

2.1. Raw Material

The bark of a walnut (*Juglans regia* L. variety Resovia) for research was obtained from an organic farm, “Leśne zacisze”, located in Puławy, Poland. The bark for the study was taken from branches of 20-year-old trees. The raw material was pre-dried for 24 h using a Memmert ULM 500 dryer at 45 °C. The pre-dried raw material was crashed in a RETSCH

SM100 cutting mill with a rotor diameter of 129.5 mm and a cutting blade speed of 9.4 m/s, then using a laboratory shaker MULTISERV LPzE-2e sieved for 20 min, with an amplitude of vibration of 2.5 mm and frequency of 50 Hz. Selected fractions 0.9, 1.4 and 1.9 mm were subjected to a further drying process until the moisture content reached 8.99%. The raw material after the pre-drying process is presented in Figure 1.



Figure 1. The raw material for testing after pre-drying process.

2.2. Reagents

The following chemical reagents were used for spectrophotometrical tests: Folin-Ciocalteu reagent (AKTYN, Suchy Las, Poland), methanol ($\geq 99\%$, Stanlab, Lublin, Poland), sodium carbonate ($\geq 99\%$, Stanlab, Lublin, Poland), gallic acid ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Aldrich, Merck, Germany), 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TPTZ, Sigma Aldrich, Merck, Germany), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid (Trolox, $>98\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany), quercetin ($\geq 95\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany), aluminum chloride ($>98\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany).

2.3. Methods

2.3.1. Box-Behnken Experimental Design and Statistical Analyses

The investigation was performed on the basis of the Box-Behnken experiment design in the Design-Expert v13. A three-level, three-factor design of experiment (DoE) was used to determine the best combination of subcritical water extraction parameters for *Juglans regia* L. Three levels were defined as the lowest analyzed value of the process parameter, the average and the highest value. The process temperature (F1), fraction size (F2), and process time (F3) were independent variables (three DoE factors), whereas the dependent variables were the total polyphenols content, the total flavonoids content, antioxidant activity (DPPH), and antioxidant activity (FRAP).

The experiment consists of 15 combinations, including three center points to estimate the pure error, and was carried out in randomized order. Coded and real values of process parameters of each set of variables according to the design of experiment are presented in Table 1. Coded values represent the minimum value of a variable (coded value -1), average (coded value 0) and maximum (coded value 1).

The experimental data were assessed via analysis of variance (ANOVA). The statistical significations of the regression coefficients were verified with an F-test, and p -values of less than 0.05 were assumed as significant.

The optimal extraction conditions were estimated through Derringer's desirability prediction tool, aiming at a maximum attainable response for each independent factor. The validity of the developed model was assessed by comparing the experimental with predicted values.

Table 1. Design of Experiment (DoE)—coded and real values of process parameters.

Set	Factor 1 A: Temperature [°C]	Factor 2 B: Fraction Size [mm]	Factor 3 C: Process Time [min]	Factor 1 A: Temperature Coded	Factor 2 B: Fraction Size Coded	Factor 3 C: Process Time Coded
1	110	1.4	10	−1	0	−1
2	140	1.4	30	0	0	0
3	170	1.4	50	1	0	1
4	170	1.9	30	1	1	0
5	140	0.9	10	0	−1	−1
6	140	1.9	10	0	1	−1
7	140	1.9	50	0	1	1
8	110	1.9	30	−1	1	0
9	140	1.4	30	0	0	0
10	140	0.9	50	0	−1	1
11	110	1.4	50	−1	0	1
12	170	0.9	30	1	−1	0
13	110	0.9	30	−1	−1	0
14	140	1.4	30	0	0	0
15	170	1.4	10	1	0	−1

2.3.2. Subcritical Water Extraction

Subcritical water extraction was performed with the use of an automatic extraction system Dionex ASE350 (accelerated solvent extractor) equipped with a 100 mL volume pressure cell protected by the use of fiberglass filters at the inlet and outlet sections. The extraction process was carried out using 10 g of plant raw material with the specified in DoE fraction size for each set of process parameters. During the extraction process, the pressure cell was filled with ultrapure water for analytical applications with a conductivity of 0.09 $\mu\text{S}/\text{cm}$, heated to the required temperature, for the time specified in the DoE. At the end of the process, water with dissolved compounds was released into a laboratory vessel. Obtained aqueous extract was dried using a vacuum evaporator under a temperature of 40 °C. Obtained extracts were stored in a refrigerator (2 °C) and collected for further chemical analysis.

2.3.3. Total Polyphenols Content (TPC)

TPC was determined with spectrophotometry using gallic acid as the reference standard. The total polyphenol content was measured according to the method described by Sahin et al. [28]. The results are expressed as mg(GAE)/100 g DM(dry mass) of raw material. The following calibration curve was used to determine the total polyphenols content.

$$TPC = 0.110A + 0.007 \quad (R^2 = 0.998) \quad (1)$$

where: TPC—total polyphenols content [10^{-6} g(GAE)/mL], A—absorbance [dim].

2.3.4. Total Flavonoid Content (TFC)

TFC was determined with spectrophotometry using quercetin as the reference standard, described by Aryal et al. [34] with some modifications [35]. The extract sample (1.0 mL) was mixed with 1 mL of a 2% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution (in methanol). The mixture was made up to 10 mL with distilled water. After 10 min of incubation of the mixture at room temperature in the dark, the absorbance was measured at 430 nm. A calibration curve was created based on the quercetin and the results were expressed as mg quercetin equivalent per 100 g of dry mass (mg QE/100 g dry mass) [35]. The following calibration curve was used to determine the total flavonoids content.

$$TFC = 0.092A - 0.032 \quad (R^2 = 0.998) \quad (2)$$

where: TFC—total flavonoids content [10^{-6} g(QE)/mL], A—absorbance [dim].

2.3.5. Antioxidant Activity

DPPH assay

The antioxidant activity of the obtained extracts was assessed using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay described by Blois [36] with modifications [35]. For this analysis, 0.2 mL of the extract was mixed with an aliquot of 5.8 mL of freshly prepared $6 \cdot 10^{-5}$ M DPPH radical in methanol. The mixture was stored for 30 min at room temperature and then the spectrophotometric absorbance was measured at 516 nm using methanol as a blank. Three replicates of the measurement were performed for each sample. Antioxidant activity was expressed as a Trolox equivalent: 10^{-6} MTE/1 g (dry mass) [35]. The following calibration curve was used to determine antioxidant activity using the DPPH method.

$$AC_{DPPH} = -3.494A + 3.304 \quad (R^2 = 0.999) \quad (3)$$

where: AC—Trolox equivalent antioxidant activity [10^{-6} MTE/mL]; A—absorbance [dim].

FRAP assay

The ferric-reducing antioxidant power of the obtained extract was evaluated according to the method described by Benzie [37] with modifications [35]. The working reagent was prepared as a mixture of 20 mM $FeCl_3$, 300 mM acetic acid, and 10 mM of TPTZ in 10:1:1 (*v/v/v*) proportion in 40 mM HCl. Subsequently, 30 μ L of the evaluated extracts was mixed with 5 mL of the FRAP solution. After a 10 min incubation period at 37 °C, absorbance of the mixture was measured at 593 nm. The FRAP values of the evaluated extracts were expressed as a Trolox equivalent: 10^{-6} MTE/1 g (dry mass) [35]. The following calibration curve was used to determine antioxidant activity using the FRAP method.

$$AC_{FRAP} = 1.626A + 0.007 \quad (R^2 = 0.999) \quad (4)$$

where: AC—Trolox equivalent antioxidant activity [10^{-6} MTE/mL]; A—absorbance [dim].

2.3.6. Optimization of Subcritical Water Extraction Parameters

Based on the experimental data, a multi-criterial optimization of the process parameters was carried out. Process variables were selected as (independent variables): temperature, raw material fraction size and process time. Whereas optimization parameters were defined as (dependent variables): total polyphenols, total flavonoids, antioxidant activity measured by DPPH and FRAP methods. Optimization goals and limits are presented in Table 2.

Table 2. Optimization goals and limits.

Process/Optimization Parameters	Lower Limit	Upper Limit	Goals
A: Temperature [°C]	110	170	is in range
B: Raw material fraction size [mm]	0.9	1.9	is in range
C: Process time [min]	10	50	is in range
Total polyphenols [mg(GAE)/100 g (dry mass)]			maximize
Total flavonoids [mg(QE)/100 g (dry mass)]			maximize
Antioxidant activity (DPPH) [10^{-6} MTE/1 g (dry mass)]			maximize
Antioxidant activity (FRAP) [10^{-6} MTE/1 g (dry mass)]			maximize

3. Results and Discussion

3.1. Extraction Yield and Results of Chemical Analysis

Efficiency of the subcritical water extraction process of walnut (*Juglans regia* L.) bark expressed as a percentage relation between the mass of dry extract and the mass of dry raw material ranged from 15.3 to 31.8%, varying according to the experimental conditions. Results obtained for each DoE set are presented in Table 3, whereas Table 4 presents the

obtained response for dependent variables such as total polyphenols, total flavonoids, antioxidant activity (DPPH), and antioxidant activity (FRAP).

Table 3. The extraction yield in relation to dry mass of raw material.

Set	Factor 1 A: Temperature [°C]	Factor 2 B: Fraction Size [mm]	Factor 3 C: Process Time [min]	Extract (Dry Mass) [g]	Extraction Yield (Dry Mass) [%]
1	110	1.4	10	1.533	16.8
2	140	1.4	30	1.947	21.4
3	170	1.4	50	2.907	31.8
4	170	1.9	30	1.979	21.7
5	140	0.9	10	1.605	17.6
6	140	1.9	10	1.791	19.7
7	140	1.9	50	1.906	20.9
8	110	1.9	30	2.406	26.4
9	140	1.4	30	2.786	30.4
10	140	0.9	50	1.574	17.3
11	110	1.4	50	2.687	29.5
12	170	0.9	30	1.391	15.3
13	110	0.9	30	1.891	20.7
14	140	1.4	30	1.523	16.7
15	170	1.4	10	1.960	21.5

Table 4. Results of chemical analysis.

Set	Response 1 TPC ¹ mg(GAE)/100 g (Dry Mass)	Response 2 Flavonoids Content mg(QE)/100 g (Dry Mass)	Response 3 Antioxidant Activity (DPPH ²) 10 ⁻⁶ MTE/1 g (Dry Mass)	Response 4 Antioxidant Activity (FRAP ³) 10 ⁻⁶ MTE/1 g (Dry Mass)
1	171.541	77.528	16.888	20.48
2	178.222	80.142	17.252	21.39
3	128.304	28.042	11.479	17.86
4	143.484	34.470	12.407	16.87
5	192.141	88.333	21.298	29.69
6	175.907	80.600	18.444	24.66
7	158.031	63.568	17.252	21.39
8	164.791	71.959	16.184	18.64
9	170.720	79.908	17.499	26.77
10	180.000	74.832	16.881	20.75
11	174.976	77.351	17.136	22.10
12	162.455	48.381	14.548	22.95
13	166.858	79.350	16.298	19.96
14	172.055	73.850	15.645	18.69
15	153.127	52.602	13.328	19.91

¹ TPC—Total Polyphenolic Content. ² DPPH—2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. ³ FRAP—Ferric Reducing Antioxidant Power.

3.2. Total Polyphenols Content (TPC)

The total polyphenols content extracted from the bark of the walnut (*Juglans regia* L.) ranged from 128.3 to 192.1 mg(GAE)/100 g (DM), varying according to the experimental conditions. Polyphenols contents as a function of extraction temperature, raw material fraction size and process time are presented in Figure 2.

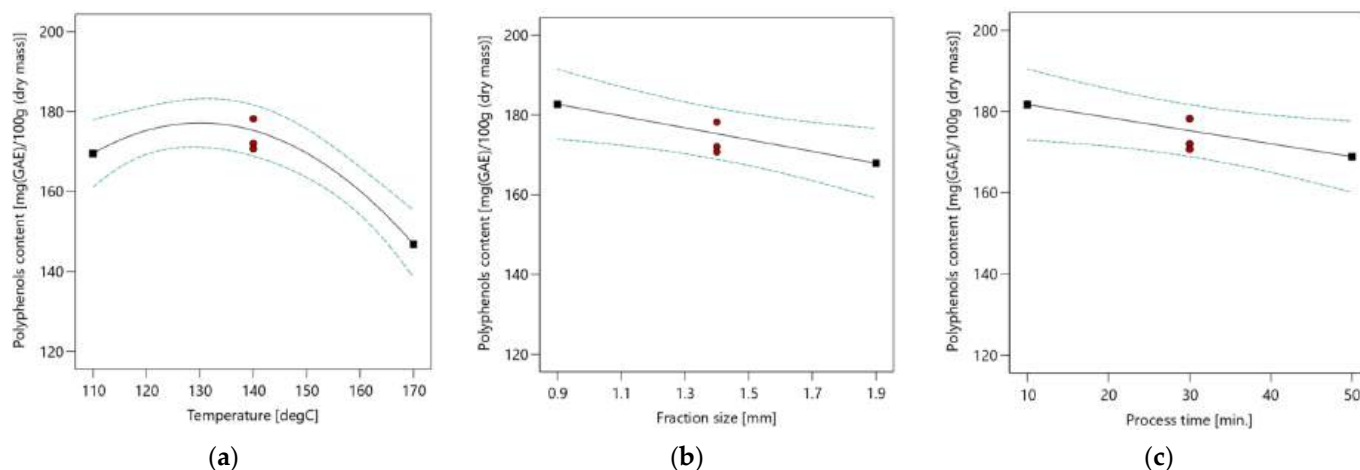


Figure 2. Polyphenols content for different subcritical extraction parameters (a) Polyphenols content as a function of extraction temperature; (b) Polyphenols content as a function of raw material fraction size; (c) Polyphenols content as a function of process time.

Multivariable analysis of variance (ANOVA) performed with the use of the analytical results of total polyphenols content shows that the total polyphenols were influenced by: process temperature, raw material fraction size and process time. As mentioned above, the influence of the temperature can be represented by a second-order equation. The content of polyphenols increases with the increasing temperature value up to 131.6 °C and then decreases. The impact of the raw material fraction size and process time changes is linear. Details of ANOVA analysis are presented in Table 5.

Table 5. The analysis of variance for polyphenols content.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-Value	
Model	2891.73	4	722.93	12.53	0.0007	significant
A—Temperature	1030.49	1	1030.49	17.86	0.0018	
B—Fraction size	438.69	1	438.69	7.60	0.0202	
C—Process time	330.31	1	330.31	5.73	0.0378	
A ² —Temperature ²	1092.25	1	1092.25	18.93	0.0014	
Residual	576.85	10	57.68			
Lack of Fit	544.81	8	68.10	4.25	0.2043	not significant
Pure Error	32.03	2	16.02			
Cor Total	3468.58	14				

Std. Dev. = 7.60; Mean = 166.17; C.V. % = 4.57, R² = 0.8337; Adjusted R² = 0.7672; Predicted R² = 0.5864; Adeq Precision = 11.3318

An F-value of 12.53 indicates that the model is significant. There is only a 0.07% chance that an F-value this large could occur due to noise. *p*-values less than 0.05 indicate the significance of the model terms. Significant model terms are A, B, C, A². The lack of fit F-value of 4.25 implies the lack of fit is not significant relative to the pure error. The predicted R² (0.5864) and adjusted R² (0.7672) are in reasonable agreement. The signal-to-noise ratio is referred as Adeq Precision. A ratio of 11.3318 indicates an adequate signal. The obtained model is statistically significant and can be used to navigate the analyzed space.

The total polyphenols content can be determined using Equation (5).

$$TPC = -0.019005 T^2 + 4.94311 T - 14.81025 Fs - 0.321281 t - 113.86586 \quad (5)$$

where: TPC—total polyphenols content [mg(GAE)/100 g (dry mass)]; T—temperature [°C]; Fs—fraction size of raw material [mm]; t—process time [min].

There are no studies available on the polyphenols content in the subcritical water extracts of *Juglans regia* L. bark. The available data indicate that extraction of *Juglans regia* L. bark using ethyl acetate allowed us to obtain polyphenols in the amount of 34.83 mg GAE/g (dry mass) [21]. Other studies indicated the possibility of obtaining 138.5 mg GAE/g (DM) (using ethyl acetate as solvent), 311.5 mg GAE/g (DM) (using diluted acetone), 172.5 mg GAE/g (DM) (using methanol extract), 182 mg GAE/g (DM) (using water extract) [22]. During the research conducted as part of this study, the total polyphenols content extracted from the bark of walnut (*Juglans regia* L.) ranged from 128.3 to 192.2 mg(GAE)/100 g (DM). Differences in the content of polyphenols can be caused by factors such as: different extraction method, process parameters, type of solvent, collection time of material for research and raw material pretreatment method. The chemical composition of phytonutrients varies with changes in geographic location, climatic conditions and the nature of the soil [38]. It should also be emphasized that the aim of this study was to investigate the effect of process parameters on the total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity of obtained extracts and the determination of optimal parameters for subcritical water extraction, not to study the maximum yield of polyphenols extraction.

3.3. Total Flavonoids Content (TFC)

The total flavonoids content in extracts from the bark of walnut (*Juglans regia* L.) ranged from 28.0 to 88.3 mg(QE)/100 g (DM), varying according to the experimental conditions. Flavonoids contents as a function of the extraction temperature, raw material fraction size and process time are presented in Figure 3.

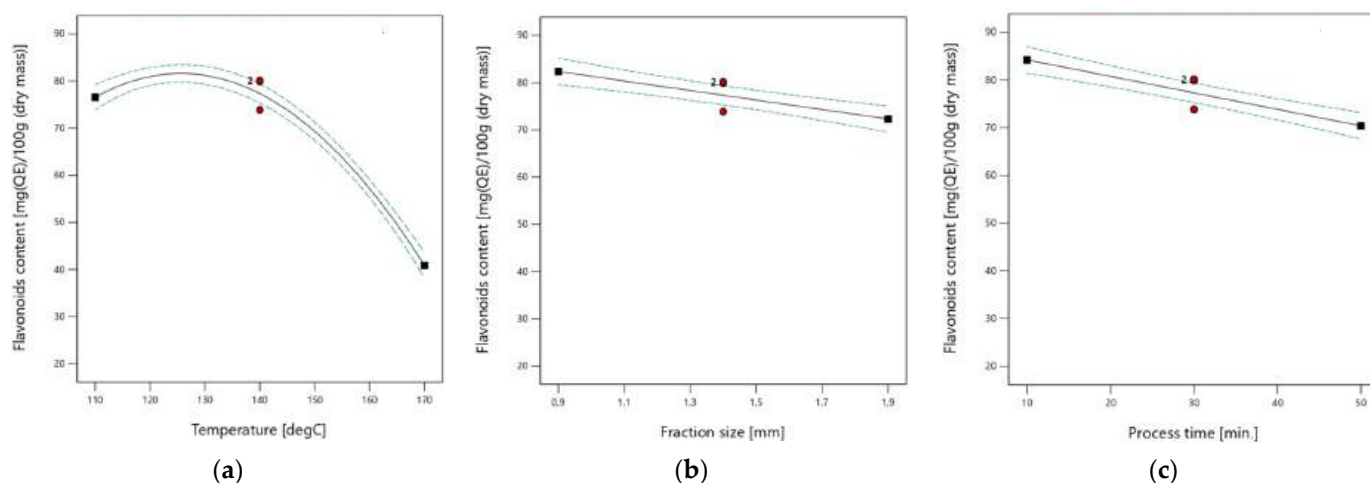


Figure 3. Flavonoids content for different subcritical extraction parameters (a) Flavonoids content as a function of extraction temperature; (b) Flavonoids content as a function of raw material fraction size; (c) Flavonoids content as a function of process time.

Multivariable analysis of variance (ANOVA) performed based on analytical data shows that the flavonoids content in subcritical water extracts strictly depends on the temperature, raw material fraction size and process time. The relationship between the temperature and flavonoids content was described by a second-order equation. The content of flavonoids increases with an increasing temperature value up to 131.6 °C and then decreases. The impact of raw material fraction size and process time changes is linear. Details of ANOVA analysis are presented in Table 6.

Table 6. The analysis of variance for total flavonoids.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-Value	
Model	4571.42	5	914.28	162.42	<0.0001	significant
A—Temperature	2545.16	1	2545.16	452.14	<0.0001	
B—Fraction size	203.00	1	203.00	36.06	0.0002	
C—Process time	381.85	1	381.85	67.83	<0.0001	
AC	148.63	1	148.63	26.40	0.0006	
A ² —Temperature ²	1292.78	1	1292.78	229.66	<0.0001	
Residual	50.66	9	5.63			
Lack of Fit	25.21	7	3.60	0.2831	0.9130	not significant
Pure Error	25.45	2	12.72			
Cor Total	4622.09	14				

Std. Dev. = 2.37; Mean = 67.39; C.V. % = 3.52; R² = 0.9890; Adjusted R² = 0.9829; Predicted R² = 0.9744; Adeq Precision = 40.9157

An F-value of 162.42 indicates that the model is significant. There is only a 0.01% chance that an F-value this large could occur due to noise. *p*-values less than 0.05 indicate the significance of the model terms. The significant model terms are A, B, C, AC, A². The lack of fit F-value of 0.2831 implies the lack of fit is not significant relative to the pure error. The predicted R² (0.9744) and adjusted R² (0.9829) are in reasonable agreement. The signal-to-noise ratio is referred as Adeq Precision. A ratio of 40.916 indicates an adequate signal. The obtained model is statistically significant and can be used to navigate the analyzed space.

The total flavonoids content can be determined using Equation (6).

$$TFC = -0.02067 T^2 + 5.4995 T - 0.01016 T \cdot t - 10.0747 Fs + 1.0769 t - 262.9 \quad (6)$$

where: TFC—total flavonoids content [mg(QE)/100 g (dry mass)]; T—temperature [°C]; Fs—fraction size of raw material [mm]; t—process time [min].

There are no studies available on the flavonoids content in the subcritical water extracts of *Juglans regia* L. bark. Taking into account the main goal of this study, that is to investigate the effect of process parameters on the chemical composition and antioxidant activity of obtained extracts, changes in flavonoids and polyphenols contents in relation to process parameters were compared. Flavonoids content varies with a temperature change in a similar manner to polyphenols. In the temperature range from 110 to 131.6 °C, both flavonoids and polyphenols contents increase; with a further temperature increase, both flavonoids and polyphenols contents decrease. Similar trends in both flavonoids and polyphenols contents were observed in relation to the raw material fraction size and process duration. An increase in the raw material size and process duration negatively affects both the polyphenols and flavonoid contents. This phenomenon can be caused by the worst contact of the solvent with desired compounds in the case of a larger raw material size, whereas a longer process duration at elevated temperatures may be the reason for the occurrence of thermal degradation of the extract.

3.4. The Antioxidant Activity

The antioxidant activity of obtained extracts ranged from 11.5 to 21.3 × 10⁻⁶ MTE/1 g (DM) while tested by use of the DPPH method and from 16.9 to 29.7 × 10⁻⁶ MTE/1 g (DM) using the FRAP method, varying according to the experimental conditions. The obtained antioxidant activity is more than 100 times lower than the antioxidant activity of the extract from *Juglans regia* L. flowers. The antioxidant activity of the extract obtained from *Juglans regia* L. flowers was 3.33 × 10⁻³ MTE/1 g (DM) [39]. Antioxidant activities as a function of extraction temperatures are presented in Figure 4.

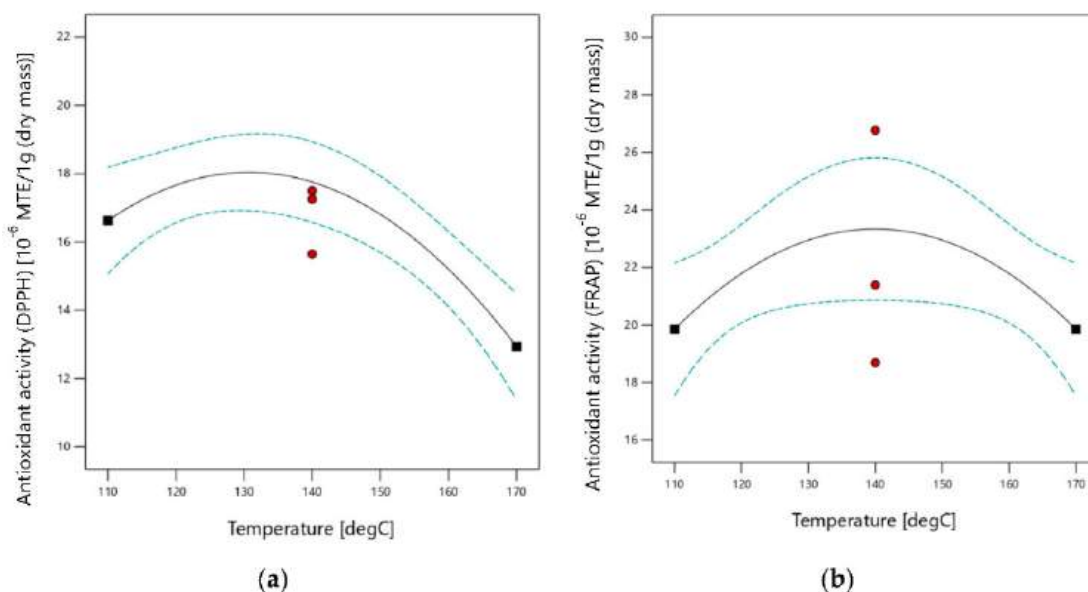


Figure 4. Antioxidant activity as a function of extraction temperature (a) Analyzed using DPPH method; (b) Analyzed using FRAP method.

Multivariable analysis of variance (ANOVA) performed with use of the results of antioxidant activity assessment using DPPH and FRAP methods shows that the antioxidant activity is strictly dependent on the temperature only. The influence of temperature mentioned above can be represented by a second-order equation. With the DPPH method, antioxidant activity increases with an increasing temperature value up to 131.6 °C and then decreases, whereas with the FRAP method the maximum point was observed at 134.7 °C. Details of ANOVA analysis are presented in Table 7 for the DPPH method and Table 8 for the FRAP method.

The F-value of 14.66 indicates that the model is significant. There is only a 0.06% chance that an F-value this large could occur due to noise. *p*-values less than 0.05 indicate significance of the model terms. Significant model terms are A and A². The lack of fit F-value of 2.23 implies the lack of fit is not significant relative to the pure error. The predicted R² (0.5762) and adjusted R² (0.6611) are in reasonable agreement. The signal-to-noise ratio is referred as Adeq Precision. A ratio of 7.516 indicates an adequate signal. The obtained model is statistically significant and can be used to navigate the analyzed space.

Table 7. Analysis of variance for antioxidant activity measured using DPPH method.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	<i>p</i> -Value	
Model	60.09	2	30.05	14.66	0.0006	significant
A—Temperature	27.17	1	27.17	13.25	0.0034	
A ²	32.92	1	32.92	16.06	0.0017	
Residual	24.60	12	2.05			
Lack of Fit	22.57	10	2.26	2.23	0.3494	not significant
Pure Error	2.03	2	1.01			
Cor Total	84.70	14				

Std. Dev. = 1.43; Mean = 16.17; C.V. % = 8.86; R² = 0.7095; Adjusted R² = 0.6611; Predicted R² = 0.5762; Adeq Precision = 7.5156.

Table 8. Analysis of variance for antioxidant activity measured using FRAP method.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-Value	
Model	45.42	1	45.42	4.96	0.0443	significant
A ² —Temperature ²	45.42	1	45.42	4.96	0.0443	
Residual	119.15	13	9.17			
Lack of Fit	85.31	11	7.76	0.4584	0.8408	not significant
Pure Error	33.84	2	16.92			
Cor Total	164.58	14				

Std. Dev. = 3.03; Mean = 21.47; C.V. % = 14.10; R² = 0.2760; Adjusted R² = 0.2203; Predicted R² = 0.0244; Adeq Precision = 3.1552.

An F-value of 4.96 indicates that the model is significant. There is only a 4.43% chance that an F-value this large could occur due to noise. *p*-values less than 0.05 indicate significance of the model terms. A significant model term is A². The lack of fit F-value of 0.46 implies the lack of fit is not significant relative to the pure error. The predicted R² (0.0244) and adjusted R² (0.2203) are in reasonable agreement.

The mathematical relation between the extraction temperature and antioxidant activity can be presented in the form of Equation (7) for the DPPH method and Equation (8) for the FRAP method.

$$AC_{DPPH} = -0.003299 T^2 + 0.862411 T - 38.31544 \quad (7)$$

$$AC_{FRAP} = -3.49 T^2 + 23.33 \quad (8)$$

where: AC—Trolox equivalent antioxidant activity [10^{-6} MTE/1 g (DM)]; T—temperature [°C].

When we compare the antioxidant activity determined by both methods with the total polyphenols content obtained in previous evaluations, a similar trend of changes in the reference to the change in process temperature can be observed. Antioxidant activity assessed by use of the DPPH method increases with a temperature increase up to 131.6 °C, then decreases. The same trend was observed with polyphenols and flavonoid contents. A slight deviation with respect to this behavior was observed in relation to the FRAP method. The antioxidant activity determined by the FRAP method increases with an increase in temperature up to 134.7 °C, then decreases. The discrepancy in the temperature of occurrence of the maximum content of polyphenols and antioxidant activity measured by the FRAP method is 2.3%. Statistical data (e.g., coefficient of determination R²) for both analyses of antioxidant activity indicate a better adjustment of the regression curve in the case of the DPPH method (R²_{DPPH} = 0.7095 vs. R²_{FRAP} = 0.2760). Due to the uncertainty of the mathematical model build based on FRAP method, this model was used for qualitative assessment only.

3.5. Optimization of the Extraction Conditions

The optimization of subcritical water extraction parameters us to determine values of the process temperature, raw material fraction size and time (process duration) at which polyphenols and flavonoids content together with the antioxidant activity measured using the DPPH and FRAP methods reached maximum value. The highest polyphenols and flavonoids contents together with the antioxidant activity were reached at a temperature of 131.6 °C, a raw material fraction size of 0.9 mm and a process duration of 10 min. Table 9 shows the values of the maximum content of polyphenols, flavonoids and the maximum antioxidant activity of the extracts obtained, together with the corresponding extraction parameters.

The strength of the conducted research work is the determination of the optimal parameters of the walnut bark extraction process using water under subcritical conditions. Walnut bark has never been researched in this respect before. Subsequent research work should determine the variability of the chemical composition of the obtained extracts by examining selected bioactive compounds using chromatographic methods.

Table 9. Maximum test values with corresponding process parameters.

Optimization Parameter	Maximum Obtained Value	Process Temperature [°C]	Raw Material Fraction Size [mm]	Process Time (Duration) [min]
Total polyphenols content [mg(GAE)/100 g (dry mass)]	192.1	131.6	0.9	10
Total flavonoids content [mg(QE)/100 g (dry mass)]	88.3	131.6	0.9	10
Antioxidant activity (DPPH) [10 ⁻⁶ MTE/1 g (dry mass)]	21.3	131.6	0.9	10
Antioxidant activity (FRAP) [10 ⁻⁶ MTE/1 g (dry mass)]	29.7	134.7 *	0.9	10

* Due to the uncertainty of the mathematical model ($R^2 = 0.2760$) build based on FRAP method, this model was used for qualitative assessment only.

4. Conclusions

This study investigated the effect of subcritical water extraction parameters on the total polyphenols, flavonoids content and antioxidant activity of walnut (*Juglans regia* L.) bark extract using the Box-Behnken methodology. The total polyphenols and flavonoids extracted from walnut (*Juglans regia* L.) bark using a subcritical water extraction process are dependent on the temperature of the process, raw material fraction size and process duration. The optimal conditions (on the basis of the model) for the extraction of polyphenols and flavonoids from walnut (*Juglans regia* L.) bark were as follows: process temperature of 131.6 °C, particle size of 0.9 mm, extraction time of 10 min.

The antioxidant activity was affected by the extraction temperature only. The highest antioxidant activity was achieved at a process temperature of 131.6 °C.

The results obtained indicate how important is the optimal selection of subcritical water extraction parameters with regard to the quality of the extract. Obtained results indicate that a smaller particle size and shorter time may improve the process, but a reduction in the particle size can be challenging for a pressure cell filtration system and increase the cost of raw material pretreatment. By reducing the process time a lower cost of extract production can be achieved; additionally, a longer process time under elevated temperatures may lead to thermal degradation of the extract.

Author Contributions: Conceptualization, P.K. and Z.K.; methodology, P.K.; validation, P.K. and K.T.; formal analysis, P.K.; investigation, P.K., Z.K., Z.F. and M.G.; resources, K.T.; data curation, P.K.; writing—original draft preparation, P.K.; writing—review and editing, P.K., Z.K. and K.T.; visualization, P.K.; supervision, Z.K., P.K. and K.T.; project administration, P.K.; funding acquisition, P.K. and Z.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by project No. SD/46/IM/2022 provided by the University of Life Sciences in Lublin, Poland.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Treutter, D. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regul.* **2001**, *34*, 71–89. [[CrossRef](#)]
2. Ruhmann, S.; Leser, C.; Bannert, M.; Treutter, D. Relationship between growth, secondary metabolism and resistance of apple. *Plant Biol.* **2002**, *4*, 137–143. [[CrossRef](#)]
3. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 317–333.
4. Aherne, S.A.; O'Brien, N.M. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* **2002**, *18*, 75–81. [[CrossRef](#)]

5. Bennett, R.N.; Wallsgrove, R.M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytol.* **1994**, *127*, 617–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Dixon, R.A.; Paiva, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **1995**, *7*, 1085–1097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Britton, M.; Leslie, C.A.; Dandekar, A.M.; McGranahan, G.H.; Caboni, E. Persian Walnut. In *Compendium of Transgenic Crop Plants*; Kole, C., Hall, T.C., Eds.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2009; Volume 4, pp. 285–300.
8. Arcan, I.; Yemencioğlu, A. Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat. *J. Food Compos. Anal.* **2009**, *22*, 184–188. [[CrossRef](#)]
9. Amaral, J.S.; Casal, S.; Pareira, J.A.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P. Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7698–7702. [[PubMed](#)]
10. Amaral, J.S.; Alves, M.R.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P. Vitamin E composition of walnuts (*Juglans regia* L.): A 3-year comparative study of different cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5467–5472.
11. Li, L.; Yang, R.; Liu, C.; Zhu, H.; Young, J.C. Polyphenolic profiles and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8033–8040. [[CrossRef](#)]
12. Reiter, R.J.; Manchester, L.; Tan, D. Melatonin in walnuts: Influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition* **2005**, *21*, 920–924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bou Abdallah, I.; Tlili, N.; Martinez-Force, E.; Rubio, A.G.P.; Perez-Camino, M.C.; Albouchi, A.; Boukhchina, S. Content of carotenoids, tocopherols, sterols, triterpenic and aliphatic alcohols, and volatile compounds in six walnuts (*Juglans regia* L.) varieties. *Food Chem.* **2015**, *173*, 972–978. [[CrossRef](#)]
14. Kale, A.; Shah, S.; Gaikwad, S.; Mundhe, K.; Deshpande, N.; Salvekar, J. Elements from Stem Bark of Orchard Tree—*Juglans regia*. *Int. J. Chemtech Res.* **2010**, *2*, 548–550.
15. Noumi, E.; Snoussi, M.; Hajlaoui, H.; Valentin, E.; Bakhrouf, A. Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2010**, *29*, 81–88.
16. Haque, R.; Bin-Hafeez, B.; Parvez, S.; Pandey, S.; Sayeed, I.; Ali, M.; Raisuddin, S. Aqueous extract of walnut (*Juglans regia* L.) protects mice against cyclophosphamide-induced biochemical toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* **2003**, *22*, 473–480.
17. Bhatia, K.; Rahman, S.; Ali, M.; Raisuddin, S. In vitro antioxidant activity of *Juglans regia* L. bark extract and its protective effect on cyclophosphamide-induced urotoxicity in mice. *Redox Rep.* **2006**, *11*, 273–279. [[CrossRef](#)]
18. Nirmla Devi, T.; Apraj, V.; Bhagwat, A.; Mallya, R.; Sawant, L.; Pandita, N. Pharmacognostic and Phytochemical Investigation of *Juglans regia* Linn. *Bark. Pharm. J.* **2011**, *3*, 39–43.
19. Zakavi, F.; Golpasand Hagh, L.; Daraeighadikolaie, A.; Farajzadeh Sheikh, A.; Leilavi Shooshtari, Z. Antibacterial effect of *Juglans regia* bark against oral pathologic bacteria. *Int. J. Dent.* **2013**, *2013*, 854765. [[PubMed](#)]
20. Jahanban-Esfahlan, A.; Ostadrahimi, A.; Tabibiazar, M.; Amarowicz, R. A Comparative Review on the Extraction, Antioxidant Content and Antioxidant Potential of Different Parts of Walnut (*Juglans regia* L.) Fruit and Tree. *Molecules* **2019**, *24*, 2133.
21. Noumi, E.; Snoussi, M.; Trabelsi, N.; Hajlaoui, H.; Ksouri, R.; Valentin, E. Antibacterial, anticandidal and antioxidant activities of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 4138–4146.
22. Noumi, E.; Snoussi, M.; Noumi, I.; Valentin, E.; Aouni, M.; Al-sieni, A. Comparative study on the antifungal and antioxidant properties of natural and colored *Juglans regia* L. barks: A high activity against vaginal *Candida* strains. *Life Sci. J.* **2014**, *11*, 327–335.
23. Vardanega, R.; Carvalho, P.I.N.; Santos, D.T.; Angela, M.; Meireles, A. Obtaining prebiotic carbohydrates and beta-ecdysone from Brazilian ginseng by subcritical water extraction. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2017**, *42*, 73–82. [[CrossRef](#)]
24. Nastić, N.; Svarc-Gajić, J.; Delerue-Matos, C.; Fatima Barroso, M.; Soares, C.; Moreira, M.M.; Morais, S.; Masković, P.; Gaurina Srcek, V.; Slivac, I.; et al. Subcritical water extraction as an environmentally—friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *111*, 579. [[CrossRef](#)]
25. Awaluddin, S.A.; Thiruvankadam, S.; Izhar, S.; Hiroyuki, Y.; Danquah, M.K.; Harun, R. Subcritical water technology of enhanced extraction of biochemical compounds from *Chlorella vulgaris*. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 5816974. [[CrossRef](#)]
26. King, J.W.; Grabiell, R.D. Isolation of Polyphenolic Compounds from Fruits or Vegetables Utilizing Sub-Critical Water Extraction. U.S. Patent 7208181B1, 24 April 2007.
27. Smith, R.M. Superheated water: The ultimate green solvent for separation science. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 419–421.
28. Sahin, H.; Topuz, A.; Pischetsrieder, M.; Ozdemir, F. Effect of roasting process on phenolic, antioxidant and browning properties of carob powder. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *230*, 155–161. [[CrossRef](#)]
29. Nastić, N.; Svatc-Gajić, J.; Delerue-Matos, C.; Morais, S.; Fatima Barroso, M.; Moreira, M.M. Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (*Teucrium montanum* L.). *J. Supercrit. Fluids* **2018**, *138*, 200–206. [[CrossRef](#)]
30. Rodriguez-Meizoso, I.; Jaime, L.; Santoyo, S.; Senorans, F.J.; Cifuentes, A.; Ibanez, E. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 456–463. [[CrossRef](#)]
31. Zakaria, S.M.; Kamal, S.M.M. Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: Applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Eng. Rev.* **2016**, *8*, 23–34.




32. Cvetanovic, A.; Svarc-Gajic, J.; Zekovic, Z.; Jerkocic, J.; Zengin, G.; Gasić, U.; Tesić, Z.; Masković, P.; Soares, C.; Fatima Barroso, M.; et al. The Influence of the extraction temperature on polyphenolic profiles and bioactivity of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) subcritical water extracts. *Food Chem.* **2019**, *271*, 328–337. [[PubMed](#)]
33. Plaza, M.; Amigo-Benavent, M.; Del Castillo, M.D.; Ibanez, E.; Herrero, M. Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 2341–2348. [[CrossRef](#)]
34. Aryal, S.; Baniya, M.K.; Danekhu, K.; Kunwar, P.; Gurung, R. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants* **2019**, *8*, 96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kobus, Z.; Krzywicka, M.; Starek-Wójcicka, A.; Sagan, A. Effect of the duty cycle of the ultrasonic processor on the efficiency of extraction of phenolic compounds from *Sorbus intermedia*. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 8311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200. [[CrossRef](#)]
37. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76.
38. Gupta, A.; Behl, T. Pharkphoom Panichayupakaranan, A review of phytochemistry and pharmacology profile of *Juglans regia*. *Obes. Med.* **2019**, *16*, 100142. [[CrossRef](#)]
39. Żurek, N.; Pawłowska, A.; Pycia, K.; Grabek-Lejko, D.; Kapusta, I.T. Phenolic Profile and Antioxidant, Antibacterial, and Antiproliferative Activity of *Juglans regia* L. Male Flowers. *Molecules* **2022**, *27*, 2762.

**PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY
DOKTORSKIEJ**

- P2 Kamiński P., Gruba M., Fekner Z., Tyśkiewicz K., Kobus Z.; „*The Influence of Water Extraction Parameters in Subcritical Conditions and the Shape of the Reactor on the Quality of Extracts Obtained from Norway Maple (Acer platanoides L.)*”. Processes 2023, 11, 3395.

Article

The Influence of Water Extraction Parameters in Subcritical Conditions and the Shape of the Reactor on the Quality of Extracts Obtained from Norway Maple (*Acer platanoides* L.)

Piotr Kamiński ^{1,2}, Marcin Gruba ², Zygmunt Fekner ², Katarzyna Tyśkiewicz ² and Zbigniew Kobus ^{1,*}

¹ Department of Technology Fundamentals, University of Life Sciences, Głęboka 28, 20-612 Lublin, Poland; piotr.kaminski@ins.lukasiewicz.gov.pl

² Łukasiewicz Research Network—New Chemical Syntheses Institute, Al. Tysiąclecia Państwa Polskiego 13a, 24-110 Puławy, Poland; marcin.gruba@ins.lukasiewicz.gov.pl (M.G.); zygmunt.fekner@ins.lukasiewicz.gov.pl (Z.F.); katarzyna.tyskiewicz@ins.lukasiewicz.gov.pl (K.T.)

* Correspondence: zbigniew.kobus@up.lublin.pl; Tel.: +48-81-531-96-88

Abstract: The Box–Behnken experimental design was used to investigate the effect of subcritical water extraction parameters such as temperature, process duration, and extractor shape on the extract composition and antioxidant activity of Norway maple (*Acer platanoides* L.) bark extracts. Spectrophotometric (UV-Vis) techniques were employed to evaluate the total polyphenols (TPC) and flavonoids (TFC). The DPPH radical scavenging method was used to evaluate the antioxidant activity of the extracts. The yield of the process was evaluated through the utilization of response surface methodology (RSM). The total polyphenol and flavonoid contents, together with antioxidant activity, are highly dependent on water temperature. The influence of changes in the process duration and the shape of the pressure cell was not observed. A temperature increase from 110 °C to 170 °C caused a 8.9-fold increase in the polyphenol content, 7.2-fold increase in the flavonoid content, and 12.6-fold increase in the antioxidant activity. The highest values for polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity occurred at a temperature of 170 °C, which is the upper limit of the temperature variability range for these studies. This study demonstrates the importance of the appropriate selection of extraction parameters in order to obtain the desired chemical composition of the extract.

Keywords: maple; *Acer platanoides* L.; subcritical water; Box–Behnken; extraction; polyphenols; flavonoids



Citation: Kamiński, P.; Gruba, M.; Fekner, Z.; Tyśkiewicz, K.; Kobus, Z. The Influence of Water Extraction Parameters in Subcritical Conditions and the Shape of the Reactor on the Quality of Extracts Obtained from Norway Maple (*Acer platanoides* L.). *Processes* **2023**, *11*, 3395. <https://doi.org/10.3390/pr11123395>

Academic Editor: Abraham Kabutey

Received: 13 November 2023

Revised: 4 December 2023

Accepted: 6 December 2023

Published: 9 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The bark of trees is a plant material, processed mainly into thermal energy and chemical by-products; it is also a source of valuable biologically active substances. Polyphenols are metabolites that exist in plants [1,2]. They are part of biologically active substances, and various enzymes affecting metabolic reactions influence their production [3]. The biochemical and morphological regulatory patterns of plants are integrated within the metabolism of these compounds [4]. Defence mechanisms in the plants are driven by phenolic compounds [5,6]. Polyphenols are recognized as important food ingredients, with health-promoting benefits [7]. Maple sap is consumed as a tonic with health-beneficial properties [8]. The antioxidant activity of sugar maple leaves is correlated with polyphenols and with harvesting time; minimum phenolic (105.67 mg GAE/g dry mass) (GAE—gallic acid equivalent) and flavonoid content (3.27 ± 0.26 mg CTE/g dry mass) (CTE—catechin equivalent) were obtained by extraction from fall leaves [9]. The content of antioxidant components in extracts obtained using microwave-assisted extraction for sugar maple ranged as follows: total phenols: 35.77 to 136.55 mgGAE/g DM (DM—dry mass); total flavonoids: 10.51 to 47.33 mg CTE/g DM; condensed tannins: 5.33 to 127.33 mg CTE/g DM; and extractable tannins: 32.21 to 110.35 mg GAE/g DM [10]. Phenolics are metabolites

produced by plants, and concentrations of phenolic compounds can vary for different parts of the plant [11]. When examining harvestable plant tissues and organs, it was found that the polyphenol content in plants varied for different elements [12]. The concentration of biologically active substances for red maple was found to be in the following ascending order: stem bark, the bark of branches, and twigs [7]. The content of polyphenols in walnut was found to be in the following order: main root, buds, leaves, and bark [13]. Sugar maple bark extracts obtained using acetone as a solvent contained mainly p-hydroxy benzoic acid (8950.5 µg/g extract), gallic acid (5261 µg/g extract), and salicylic acid (572.38 µg/g extract). The high polyphenol content (292.67 mg GAE/g dry mass) was correlated with high antioxidant activity (IC₅₀ values of 1.77 and 4.14 µg/mL) [14]. In traditional medicine, the bark of maple has been used in the treatment of ailments like eye diseases and back pain and as a diuretic [15,16]. The extracts obtained from the bark of maple contain phenolic compounds like gallic acid derivatives and flavonoids such as quercetin glycosides, rutin, and kaempferol [7,17,18]. Extracts obtained from 250 g of sugar and red maple bark with a moisture content of 5.6% and 9.5%, ground to particle sizes from 250 to 500 µm, separately extracted using 2.5 L of water as a solvent, for 1 h duration and under conditions of 90 °C achieved the following: total polyphenol content: 19.04 and 40.12 g GAE/100 g DE; total flavonoid content: 1.46 and 1.58 g QE/100 g DE; antioxidant activity (ABTS assay): 45.20 and 128.71 mmol TE/100 g DE (TE—Trolox equivalent) [19].

Water extraction under subcritical conditions is considered an environmentally friendly separation technique for bioactive compounds from plant materials. It should also be noted that these techniques can be scaled to industrial size [20–22]. The unique properties of water under subcritical conditions include high dielectric constant, high boiling point, and high polarity [23]. The electric permittivity of the water falls as the temperature rises, but the diffusivity rises and the viscosity and surface tension both decrease. In consequence, materials that are highly polar and easily soluble in water within normal conditions can be separated more effectively in low temperatures than low-polar molecules, which need a low polar medium, present in higher temperatures [1,24,25]. A rise in water temperature enhances the diffusion rate and the kinetics of desorption and leads to an increase in compound dissociation. The quality of contact between plant material and solvent can be highly improved by viscosity and surface tension reduction at higher process temperatures. Taking into account the above-mentioned changes in water properties associated with temperature increase, the process rate and efficiency can be improved by increasing the temperature of the process.

Studies on the subcritical extraction method show that the extracts produced using this method have better antioxidant capacities. They also highlight a strong correlation between process temperature and antioxidant activity [25–30].

Knowing the impact of process variables such as temperature, reactor design, and process time on the quality of extracts is crucial for designing optimal extraction devices, allowing reduced production costs and increased process efficiency.

The literature describes the bioactivity of individual parts for sugar and red maple, such as the main root, buds, leaves, bark, and petioles, but does not contain information on Norway maple, especially in terms of the impact of extraction cell construction and process parameters on the process efficiency.

2. Materials and Methods

2.1. Raw Material

Norway maple (*Acer platanoides* L.) branch bark was harvested for research in the Polish State Forests under supervision of the employees of the Puławy Forest District (location 51°26′02.2″ N, 22°00′09.0″ E). Material for the extraction process was obtained from branches of trees (15 years old). Maple bark was dried by natural convection at an ambient temperature of 20 °C. Then, the bark was ground using a RETSCH SM100 cutting mill with blade speed of 9.4 m/s. A fraction with a size from 0.9 to 1.4 mm was separated using a MULTISERV LPzE-2e laboratory shaker under the following conditions:

separation time of 30 min, frequency of 50 Hz, and vibration amplitude of 2.5 mm. The selected material was further dried to moisture content of 8.09%. The raw material before fragmentation is presented in Figure 1.



Figure 1. Norway maple (*Acer platanoides* L.) bark before fragmentation.

2.2. Reagents

The spectrophotometric assays were conducted using the following chemical reagents: Folin–Ciocalteu reagent (AKTYN, Suchy Las, Poland), sodium carbonate ($\geq 99\%$, Stanlab, Lublin, Poland), gallic acid ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid (Trolox, $>98\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany), methanol ($\geq 99\%$, Stanlab, Poland), catechin ($\geq 99.05\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany), aluminum chloride ($>98\%$, Sigma Aldrich, Merck, Germany), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Aldrich, Merck, Germany).

2.3. Methods

2.3.1. Design of Experiment

The research was carried out on the basis of an experiment plan generated using the Box–Behnken method in Design-Expert v13. A three-level, three-factor experimental plan was utilized to identify optimal process parameters for *Acer platanoides* L. The three factor levels were characterized as minimum, mean, and maximum examined values of the process parameter. Water temperature (Factor 1), reactor diameter (Factor 2), and process time (Factor 3) served as independent variables, while total polyphenol content (TPC), total flavonoid content (TFC), and antioxidant activity were assumed as dependent variables.

The experiment comprised 17 different combinations, incorporating five center points to assess the pure error. The actual process parameter values for each variable set according to the experiment design are presented in Table 1.

The values obtained in this study were evaluated using analysis of variance ANOVA. The F-test was used to determine the statistical significance of the regression coefficients, with a p -value of less than 0.05 being deemed significant. The model was validated by comparison of the experimental and predicted values.

Table 1. Experimental plan.

Set	A: Process Temperature (°C)	B: Reactor Diameter (mm)	C: Process Time (min)
1	170	10	10
2	170	19.4	5
3	110	19.4	5
4	110	10	10
5	140	10	5
6	140	19.4	10
7	110	19.4	15
8	140	19.4	10
9	110	28.8	10
10	140	28.8	5
11	170	28.8	10
12	140	19.4	10
13	140	28.8	15
14	170	19.4	15
15	140	19.4	10
16	140	19.4	10
17	140	10	15

2.3.2. Preparation of Water Extracts

A Dionex ASE350 automatic extraction device (accelerated solvent extractor) was used to obtain subcritical water extracts. The extraction system was equipped with pressure cells with a volume of 100 mL (diameter 28.8 mm), 45 mL (diameter 19.4 mm), and 12 mL (diameter 10 mm). Fiberglass filters were used in the pressure cells to protect the system. The mass of the raw material for the extraction process was selected to ensure a constant ratio of the raw material weight to the volume of the pressure cell and was as follows: 16.59 g for 100 mL, 7.53 g for 45 mL, and 2.00 g for 12 mL. Analytical purity water with a conductivity of 0.09 $\mu\text{S}/\text{cm}$ was filled into the pressure cell for the extraction process. Then, a pressure cell filled with water and raw material was heated to temperature according to the experimental plan (DoE—Design of Experiment) and left for the process duration according to the DoE. Then, the extract was dried by water evaporation at a temperature of 40 °C under vacuum conditions. The obtained extracts were stored in the laboratory fridge at a temperature of 2 °C for further analysis.

2.3.3. Results of Chemical Analyses—Total Polyphenol Content

Gallic acid was used as the reference standard for spectrophotometry to determine the total polyphenol content. TPC was determined using the procedure outlined by Sahin et al. [26]. Polyphenol content is presented in units mg(GAE)/100 g DM (dry mass) of raw material. The total polyphenol content was calculated using the following calibration curve.

$$\text{TPC} = 0.1075A + 0.0332 \quad (R^2 = 0.9982) \quad (1)$$

where TPC—total polyphenol content (10^{-6} g(GAE)/mL), A—absorbance (dim).

2.3.4. Results of Chemical Analyses—Total Flavonoid Content

Catechin was used as the reference standard for spectrophotometry to determine the total flavonoid content. The method outlined by Aryal et al. [31] with a few adjustments [32] was used to measure TFC. The extract sample (1.0 mL) was blended with 1 mL of a methanol-based 2% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution. Distilled water was added to the mixture to reach 10 mL. The mixture was incubated at room temperature in the dark for 10 min, and the absorbance was measured at 510 nm. The obtained results are presented in units mg

(CTE)/100 g DM (dry mass) of raw material. The total flavonoid content was calculated using the following calibration curve.

$$\text{TFC} = 0.0334A - 0.0093 \quad (R^2 = 0.9995) \quad (2)$$

where TFC—total flavonoid content (10^{-6} g(CTE)/mL), A—absorbance (dim).

2.3.5. Results of Chemical Analyses—Antioxidant Activity

The method outlined by Blois [33] with a few adjustments [32] was used to measure antioxidant activity with the DPPH assay application. A 5.8 mL aliquot of freshly prepared $6 \cdot 10^{-5}$ M DPPH radical in methanol was blended with 0.2 mL of extract. Using methanol as a blank, the spectrophotometric absorbance was measured at 516 nm following a 30-min incubation period at room temperature. The measurement of each sample was replicated three times. The obtained results are presented as a Trolox equivalent: 10^{-6} MTE/1 g (dry mass) [32]. The DPPH method was utilized to determine antioxidant activity and the resulting calibration curve was obtained.

$$\text{AC}_{\text{DPPH}} = 10.279A - 3.0626 \quad (R^2 = 0.9993) \quad (3)$$

where AC_{DPPH} —antioxidant activity (10^{-6} MTE/mL), A—absorbance (dim).

3. Results and Discussion

3.1. The Efficiency of the Extraction Process

The efficiency of the extraction process on the bark of Norway maple (*Acer platanoides* L.) was evaluated by comparing the mass of the dry extract to the dry raw material mass. The obtained results varied between 2.02 and 13.53%, depending on the specific experimental settings. The results for each set of Design of Experiments (DoE) are included in Table 2. Table 3 includes the results of analyses of total polyphenol and flavonoid contents, together with antioxidant activities.

Table 2. Efficiency of the extraction process.

Set	A: Process Temperature (°C)	B: Reactor Diameter (mm)	C: Process Time (min)	Extract (Dry Mass) (g)	Extraction Yield (Dry Mass) (%)
1	170	10	10	153.74	7.69
2	170	19.4	5	734.49	9.75
3	110	19.4	5	519.60	6.90
4	110	10	10	40.30	2.02
5	140	10	5	125.04	6.25
6	140	19.4	10	437.40	5.81
7	110	19.4	15	291.28	3.87
8	140	19.4	10	429.24	5.70
9	110	28.8	10	607.77	3.66
10	140	28.8	5	786.26	4.74
11	170	28.8	10	1650.17	9.95
12	140	19.4	10	434.59	5.77
13	140	28.8	15	884.02	5.33
14	170	19.4	15	1018.95	13.53
15	140	19.4	10	444.78	5.91
16	140	19.4	10	420.12	5.58
17	140	10	15	136.42	6.82

Table 3. Results of chemical analyses for total polyphenol and flavonoid contents, together with antioxidant activities.

Set	Polyphenol Content mg (GAE)/100 g (Dry Mass)	Flavonoid Content mg (CTE)/100 g (Dry Mass)	Antioxidant Activity (DPPH) 10 ⁻⁶ MTE/1 g (Dry Mass)
1	424	99	4.8
2	732	174	12.53
3	182	49	2.28
4	106	26	1.29
5	428	117	5.78
6	408	103	5.09
7	212	54	2.73
8	374	105	5.2
9	199	53	2.33
10	341	89	3.88
11	761	176	10.85
12	419	106	5.23
13	371	98	3.9
14	943	188	16.24
15	440	111	5.51
16	393	97	3.92
17	489	127	6.52

The lowest extraction yield (2.02%) was achieved for data set number 4, for which the process temperature was 110 °C, which was the lowest value of the temperature variability range. The highest extraction yield (13.53%) was achieved for data set number 14, for which the process temperature was 170 °C, which was the highest value of the temperature variability range. The same relationship was observed in the case of the content of polyphenols and flavonoids as well as antioxidant activity.

3.2. Total Polyphenol Content (TPC)

Depending on the experimental conditions, polyphenol content in the extracts obtained from the bark of Norway maple (*Acer platanoides* L.) ranged from 106 to 943 mg (GAE)/100 g (DM). Figure 2 shows the dependence of polyphenol content in relation to process temperature.

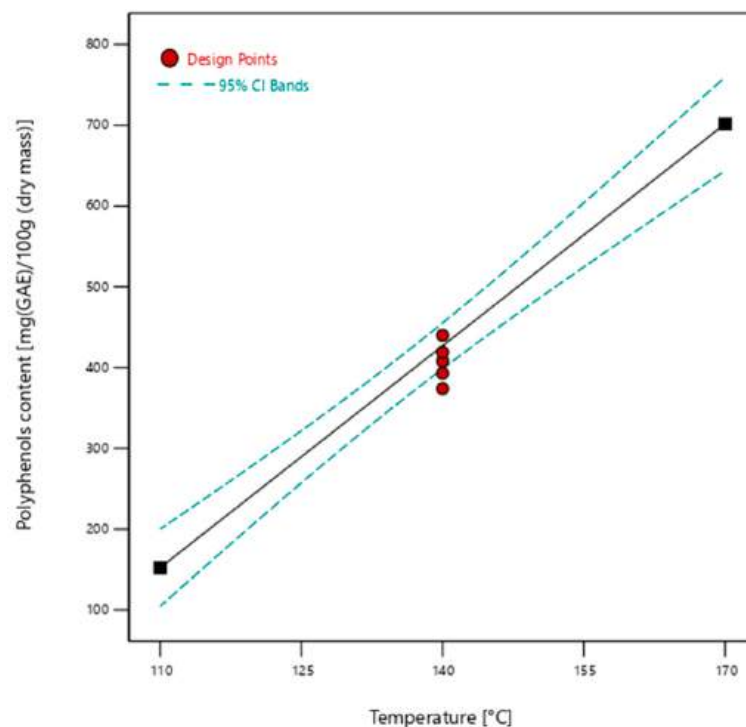
The blue dashed lines in Figures 2–4 indicate 95% confidence intervals of the mean response. The black squares at the ends of the charts indicate the limits of the design space. The red filled circles represent the design (central) points that were used to verify the mathematical model.

Based on the analytical results of the polyphenol content, a multivariable analysis of variance was conducted, and the results indicate that the total polyphenols were dependent only on the process temperature. The linear model represents the relation between process temperature and polyphenol content. An increase in the temperature of the process causes an increase in the content of polyphenols in the extract throughout the entire range of the tested parameter. The influence of the reactor shape and process time changes was not observed. Table 4 presents details of ANOVA analysis.

The model is significant, as indicated by the F-value of 174.92. The likelihood of noise producing an F-value this high is merely 0.01%. *p*-values below 0.05 imply that the model terms are significant. The letter A is a significant model term in this particular case. Considering the pure error, the lack of fit appears not to be significant, as indicated by the 5.23 lack-of-fit F-value. There is a reasonable agreement between the adjusted R² (0.9255) and the predicted R² (0.9046). Adeq. precision, defined as signal-to-noise ratio, with a value of 30.2539, demonstrates an appropriate signal. The resulting model is statistically relevant and may be employed to navigate the investigated space.

Table 4. Details of ANOVA analysis for polyphenol content in relation to extraction temperature.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-Value	
Model	4.325×10^5	1	4.325×10^5	174.92	<0.0001	significant
A—Temperature	4.325×10^5	1	4.325×10^5	174.92	<0.0001	
Residual	32,141.30	13	2472.41			not significant
Lack of Fit	29,622.50	9	3291.39	5.23	0.0631	
Pure Error	2518.80	4	629.70			
Cor Total	4.646×10^5	14				
Fit Statistics			R ²	0.9308		
Std. Dev.	49.72		Adjusted R ²	0.9255		
Mean	390.33		Predicted R ²	0.9046		
C.V. %	12.74		Adeq. Precision	30.2539		

**Figure 2.** Total polyphenols in relation to extraction temperature.

The total polyphenol content can be calculated using Equation (4).

$$\text{TPC} = 9.15504 T - 854.75194 \quad (4)$$

where TPC—total polyphenol content (mg(GAE)/100 g (dry mass)); T—temperature (°C).

Studies on the amount of polyphenols in subcritical water extracts of the bark of Norway maple (*Acer platanoides* L.) are not currently available. The available information for sugar maple indicates that polyphenol content in leaves varies with harvesting time. A minimum phenolic amount of 105.67 ± 13.16 mg GAE/g dry mass (DM) was obtained by extraction from fall leaves [9]. Other studies indicated that polyphenol content in sugar maple ranged from 35.77 to 136.55 mg GAE/g DM in extracts obtained using microwave-assisted extraction [10] and 292.67 mg GAE/g DM applying acetone as a solvent [14]. The research conducted indicates that polyphenol content extracted from the branch bark of Norway maple ranged from 106 to 943 mg (GAE)/100 g (DM). Variations in the amount of polyphenols present can be attributed to various factors, including but not limited to distinct extraction techniques, process variables, solvent type, duration of material collection for study, and pre-treatment techniques for raw materials [34]. Changes in the environment, including soil type, climate, and geographic location, affect the chemical

structure of phytonutrients [35]. It should be noted that the goal of this study was not to determine the maximum yield for polyphenol extraction, but rather to look into how reactor shape, temperature, and process duration affected the total amount of polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity of the extracts that were obtained. A rise in temperature from 110 °C to 170 °C caused a 8.9-fold increase in the amount of polyphenols extracted. The influence of changes in the process duration and the shape of the pressure cell was not observed.

3.3. Total Flavonoid Content (TFC)

Depending on the experimental conditions, the total flavonoid content extracted from the branch bark of Norway maple (*Acer platanoides* L.) ranged from 26 to 188 mg (CTE)/100 g (DM). Figure 3 shows the content of flavonoids in relation to extraction temperature.

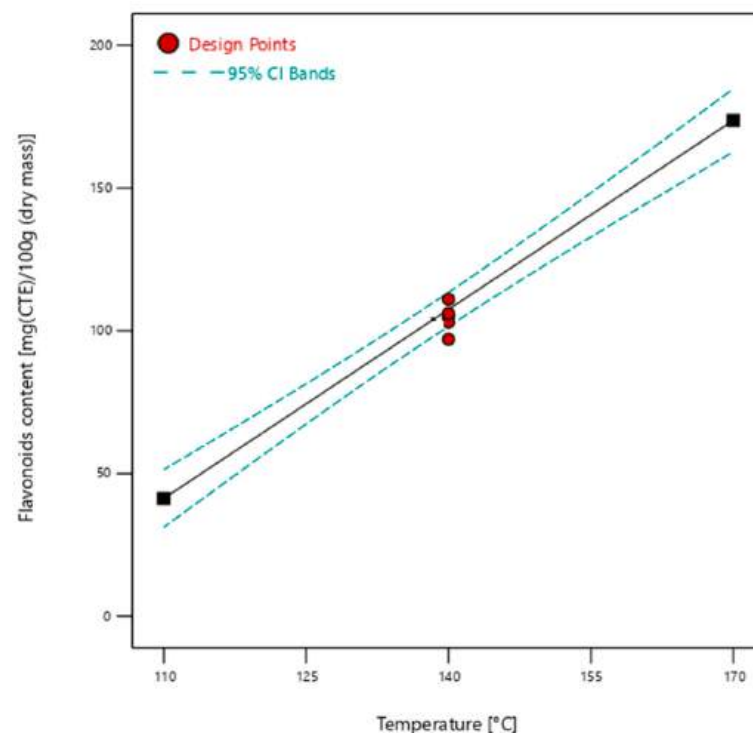


Figure 3. Total flavonoids in relation to extraction temperature.

Based on the analytical results of the flavonoid content, a multivariable analysis of variance was conducted, and the results indicate that the total flavonoids were dependent only on the process temperature. The linear model represents the relation between process temperature and flavonoid content. An increase in the temperature of the process causes an increase in the content of flavonoids in the extract throughout the entire range of the tested parameter. The influence of the reactor shape and process time changes was not observed. Table 5 presents details of the ANOVA analysis.

The model is significant, as indicated by the F-value of 267.82. The likelihood of noise producing an F-value this high is merely 0.01%. *p*-values below 0.05 imply that the model terms are significant. The letter A is a significant model term in this particular case. Considering the pure error, the lack of fit appears not to be significant, as indicated by the 5.91 lack-of-fit F-value. There is a reasonable agreement between the adjusted R^2 (0.9501) and the predicted R^2 (0.9361). Adeq. precision, defined as signal-to-noise ratio, with a value of 34.041, demonstrates an appropriate signal. The resulting model is statistically relevant and may be employed to navigate the investigated space.

Table 5. Details of ANOVA analysis for flavonoid content in relation to extraction temperature.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-Value	
Model	30,395.51	1	30,395.51	267.82	<0.0001	significant
A—Temperature	30,395.51	1	30,395.51	267.82	<0.0001	
Residual	1475.42	13	113.49			not significant
Lack of Fit	1372.22	9	152.47	5.91	0.0513	
Pure Error	103.20	4	25.80			
Cor Total	31,870.93	14				
Fit Statistics			R ²	0.9537		
Std. Dev.	10.65		Adjusted R ²	0.9501		
Mean	103.07		Predicted R ²	0.9361		
C.V. %	10.34		Adeq. Precision	34.0414		

The total flavonoid content can be calculated using Equation (5).

$$\text{TFC} = 2.20705 \text{ T} - 201.50641 \quad (5)$$

where TFC—total flavonoid content (mg(CTE)/100 g (dry mass)); T—temperature (°C).

Studies on the amount of flavonoids in subcritical water extracts of the bark of Norway maple (*Acer platanoides* L.) are not currently available. The available information for sugar maple indicates that flavonoid content in leaves varies with harvesting time; a minimum amount of flavonoids of 3.27 ± 0.26 mg CTE/g (DM) was obtained by extraction from fall leaves [9]. Other studies indicated that flavonoid content in sugar maple ranged from 10.51 to 47.33 mg CTE/g DM in extracts obtained using microwave-assisted extraction [10]. The research conducted indicates that flavonoid content extracted from the branch bark of Norway maple ranged from 26 to 188 mg (CTE)/100 g (DM). Variations in the amount of flavonoids present can be attributed to various factors, including but not limited to distinct extraction techniques, process variables, solvent type, duration of material collection for study, and pre-treatment techniques for raw materials [34]. Changes in the environment, including soil type, climate, and geographic location, affect the chemical structure of phytonutrients [35]. It should be noted that the goal of this study was not to determine the maximum yield for flavonoid extraction but rather to look into how reactor shape, temperature, and process duration affected the total amount of polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity of the extracts that were obtained. A rise in temperature from 110 °C to 170 °C caused a 7.2-fold increase in the amount of flavonoids extracted, similarly to polyphenols. The influence of changes in the process duration and the shape of the pressure cell was not observed.

3.4. Antioxidant Activity

Depending on the experimental conditions, the antioxidant activity of the branch bark extracts obtained from Norway maple (*Acer platanoides* L.) ranged between 1.29 and $16.24 \cdot 10^{-6}$ MTE/1 g (DM). Figure 4 shows the antioxidant activity in relation to process temperature.

Based on the analytical results of the antioxidant activity, a multivariable analysis of variance was conducted, and the results indicate that antioxidant activity is dependent only on the process temperature. The second-order equation represents the relation between process temperature and antioxidant activity. An increase in the temperature of the process causes an increase in antioxidant activity throughout the entire range of the tested parameter. The influence of the reactor shape and process time changes was not observed. Table 6 presents details of the ANOVA analysis.

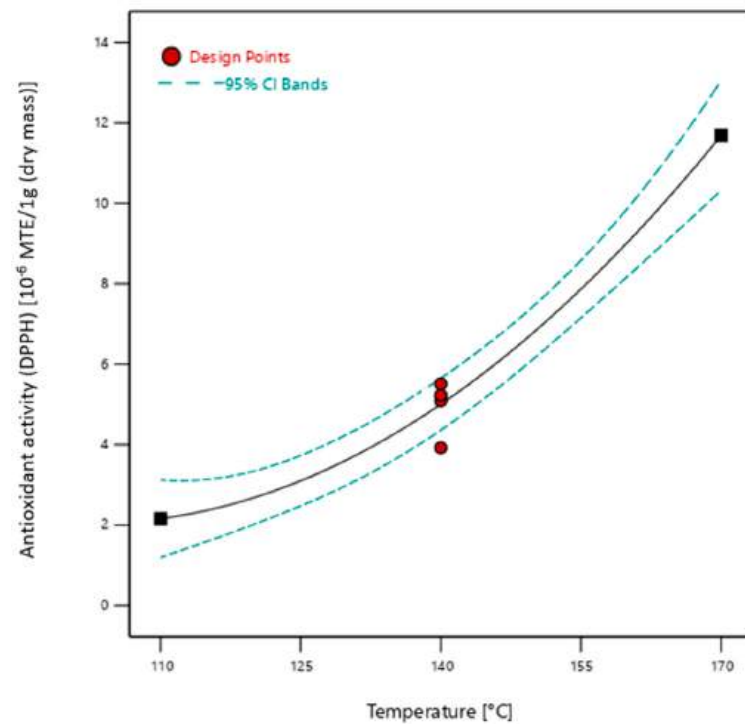


Figure 4. Antioxidant activity in relation to extraction temperature.

Table 6. Details of ANOVA analysis for antioxidant activity in relation to extraction temperature.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Value	p-Value	
Model	121.55	2	60.78	77.20	<0.0001	significant
A—Temperature	51.30	1	51.30	65.16	<0.0001	
A ²	12.35	1	12.35	15.69	0.0019	
Residual	9.45	12	0.7872			
Lack of Fit	7.92	8	0.9900	2.59	0.1866	not significant
Pure Error	1.53	4	0.3818			
Cor Total	131.00	14				
Fit Statistics			R ²	0.9279		
Std. Dev.	0.8873		Adjusted R ²	0.9159		
Mean	5.14		Predicted R ²	0.8749		
C.V. %	17.28		Adeq. Precision	24.0236		

The model is significant, as indicated by the F-value of 77.20. The likelihood of noise producing an F-value this high is merely 0.01%. *p*-values below 0.05 imply that the model terms are significant. The letters A and A² are significant model terms in this particular case. Considering the pure error, the lack of fit appears not to be significant, as indicated by the 2.59 lack-of-fit F-value. There is a reasonable agreement between the adjusted R² (0.9159) and the predicted R² (0.8749). Adeq. precision, defined as signal-to-noise ratio, with value of 24.02, demonstrates an appropriate signal. The resulting model is statistically relevant and may be employed to navigate the investigated space.

The antioxidant activity can be calculated using Equation (6).

$$AC_{DPPH} = 0.002134 T^2 - 0.438588 T + 24.58324 \quad (6)$$

where AC_{DPPH} —Trolox equivalent antioxidant activity (10^{-6} MTE/1 g (DM)); T—temperature (°C).

There is currently a lack of information in the literature regarding the antioxidant properties of extracts made from the bark of Norway maples (*Acer platanoides* L.) utilizing a subcritical water extraction method. The available data refers to extracts obtained from

250 g of sugar and red maple bark with a moisture content of 5.6% and 9.5%, as follows: ground to a particle size from 250 to 500 μm ; separately processed using 2.5 L of water; processed for a duration of 1 h at 90 °C. In this case, the antioxidant activity (ABTS assay) was 45.20 and 128.71 mmol TE/100 g dry extract [19]. A comparable trend of changes in the reference to the change in process temperature can be seen when comparing the values of the antioxidant activity measured in these studies with the total polyphenol and flavonoid content. In line with the polyphenol and flavonoid content, the antioxidant activity rises as the temperature rises over the whole range of the measured parameter. A rise in temperature from 110 °C to 170 °C caused a 12.6-fold increase in the antioxidant activity, much more than for polyphenol and flavonoid content.

4. Conclusions

Applying the Box–Behnken methodology, the present research examined the effects of the subcritical water extraction parameters of temperature, process duration, and extractor shape on the amount of polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity of bark extract from Norway maple (*Acer platanoides* L.). The temperature of the process has a significant impact on the total amount of polyphenols and flavonoids as well as the antioxidant activity of the obtained extracts. The influence of changes in the process duration and the shape of the pressure cell was not observed. A rise in temperature from 110 °C to 170 °C caused a 8.9-fold increase in the polyphenol content, 7.2-fold increase in the flavonoid content, and 12.6-fold increase in the antioxidant activity. The maximum values of polyphenols, flavonoid content, and antioxidant properties were reached at a process temperature of 170 °C, which is the highest point of the temperature variability range observed in these investigations. The study's findings demonstrate how crucial it is to select subcritical water extraction variables carefully in order to achieve the highest extract quality. The temperature rise of the water extraction process in subcritical conditions of Norway maple bark at 170 °C does not result in a decrease in polyphenol and flavonoid content or antioxidant activity. It is suggested that future tests should be performed at higher temperatures, although this may be problematic due to thermal degradation of the raw material. The thermal degradation of extracts was noticeable in previous studies performed on *Juglans regia* L. bark, where a decrease was observed in antioxidant properties, polyphenols, and flavonoid content for temperatures greater than 131.6 °C [36].

Norway maple (*Acer platanoides* L.) bark has not been studied in terms of the influence of process temperature, duration, and reactor shape on the quality of the extract obtained. Chromatographic methods should be used in subsequent research works to examine specific bioactive compounds in order to determine the variability of the chemical composition of the obtained extracts.

Author Contributions: Conceptualization, P.K.; methodology, P.K. and Z.F.; validation, P.K. and Z.F.; formal analysis, P.K.; investigation, P.K, Z.F. and M.G.; resources, K.T.; data curation, P.K.; writing—original draft preparation, P.K.; writing—review and editing, P.K., Z.K. and K.T.; visualization, P.K.; supervision, Z.K., P.K. and K.T.; project administration, P.K.; funding acquisition, P.K. and Z.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by project No. SD/76/IM/2023, provided by the University of Life Sciences in Lublin, Poland.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Treutter, D. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regul.* **2001**, *34*, 71–89. [[CrossRef](#)]
2. Ruhmann, S.; Leser, C.; Bannert, M.; Treutter, D. Relationship between growth, secondary metabolism and resistance of apple. *Plant Biol.* **2002**, *4*, 137–143. [[CrossRef](#)]
3. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 317–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Aherne, S.A.; O'Brien, N.M. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* **2002**, *18*, 75–81. [[CrossRef](#)]
5. Bennett, R.N.; Wallsgrove, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* **1994**, *127*, 617–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Dixon, R.A.; Paiva, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **1995**, *7*, 1085–1097. [[CrossRef](#)]
7. Royer, M.; Diouf, P.N.; Stevanovic, T. Polyphenol contents and radical scavenging capacities of red maple (*Acer rubrum* L.) extracts. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 2180–2188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Yuan, T.; Li, L.; Zhang, Y.; Seeram, N.P. Pasteurized and sterilized maple sap as functional beverages: Chemical composition and antioxidant activities. *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 1582–1590. [[CrossRef](#)]
9. Yeasmen, N.; Orsat, V. Phenolic mapping and associated antioxidant activities through the annual growth cycle of sugar maple leaves. *Food Chem.* **2023**, *428*, 136882. [[CrossRef](#)]
10. Yeasmen, N.; Orsat, V. Advanced separation of phytochemical and bioactive attributes from various morphological components of sugar maple (*Acer saccharum*) tree. *Food Biosci.* **2023**, *56*, 103260. [[CrossRef](#)]
11. Mamphiswana, N.D.; Mashela, P.W.; Mdee, L.K. Distribution of total phenolics and antioxidant activity in fruit, leaf, stem and root of *Monsoniaturkeana*. *Afr. J. Agric. Res.* **2010**, *5*, 2570–2575.
12. Yang, L.G.; Yin, P.P.; Li, K.; Fan, H.; Xue, Q.; Li, X.; Sun, L.W.; Liu, Y.J. Seasonal dynamics of constitutive levels of phenolic components lead to alterations of antioxidant capacities in *Acer truncatum* leaves. *Arab. J. Chem.* **2018**, *11*, 14–25. [[CrossRef](#)]
13. Medic, A.; Zamljen, T.; Hudina, M.; Veberic, R. Identification and quantification of naphthoquinones and other phenolic compounds in leaves, petioles, bark, roots, and buds of *Juglans regia* L., using hplc-ms/ms. *Horticulturae* **2021**, *7*, 326. [[CrossRef](#)]
14. Salem, M.Z.M.; Mansour, M.; Elansary, H.O. Evaluation of the effect of inner and outer bark extracts of sugar maple (*Acer saccharum* var. *saccharum*) in combination with citric acid against the growth of three common molds. *J. Wood Chem. Technol.* **2019**, *39*, 136–147. [[CrossRef](#)]
15. Haque, R.; Bin-Hafeez, B.; Parvez, S.; Pandey, S.; Sayeed, I.; Ali, M.; Raisuddin, S. Aqueous extract of walnut (*Juglans regia* L.) protects mice against cyclophosphamide-induced biochemical toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* **2003**, *22*, 473–480. [[CrossRef](#)]
16. Prior, R.L.; Hoang, H.; Gu, L. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3273–3279. [[CrossRef](#)]
17. Dudonne, S.; Vitrac, X.; Coutiere, P. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1768–1774. [[CrossRef](#)]
18. Yuan, T.; Wan, C.; Liu, K.; Seeram, N.P. New maplexins F-I and phenolic glycosides from red maple (*Acer rubrum*) bark. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 959–964. [[CrossRef](#)]
19. Liu, W.; Ouyang, Y.; Wan, C. Flavonoids of the genus of acer: A mini review. *Asian J. Chem.* **2013**, *25*, 7075. [[CrossRef](#)]
20. Geoffroy, T.R.; Fortin, Y.; Stevanovic, T. Hot-water extraction optimization of sugar maple (*Acer saccharum* marsh.) and red maple (*Acer rubrum* L.) bark applying principal component analysis. *J. Wood Chem. Technol.* **2017**, *37*, 261–272. [[CrossRef](#)]
21. Vardanega, R.; Carvalho, P.I.N.; Santos, D.T.; Angela, M.; Meireles, A. Obtaining prebiotic carbohydrates and beta-ecdysone from Brazilian ginseng by subcritical water extraction. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2017**, *42*, 73–82. [[CrossRef](#)]
22. Nastić, N.; Svarc-Gajić, J.; Delerue-Matos, C.; Fatima Barroso, M.; Soares, C.; Moreira, M.M.; Morais, S.; Masković, P.; Gaurina Srcek, V.; Slivac, I.; et al. Subcritical water extraction as an environmentally—friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *111*, 579. [[CrossRef](#)]
23. Awaluddin, S.A.; Thiruvankadam, S.; Izhar, S.; Hiroyuki, Y.; Danquah, M.K.; Harun, R. Subcritical water technology of enhanced extraction of biochemical compounds from *Chlorella vulgaris*. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 5816974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. King, J.W.; Grabiell, R.D. Isolation of Polyphenolic Compounds from Fruits or Vegetables Utilizing Sub-Critical Water Extraction. U.S. Patent 7208181B1, 24 April 2007.
25. Smith, R.M. Superheated water: The ultimate green solvent for separation science. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 419–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sahin, H.; Topuz, A.; Pischetsrieder, M.; Ozdemir, F. Effect of roasting process on phenolic, antioxidant and browning properties of carob powder. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *230*, 155–161. [[CrossRef](#)]
27. Nastić, N.; Svatc-Gajić, J.; Delerue-Matos, C.; Morais, S.; Fatima Barroso, M.; Moreira, M.M. Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (*Teucrium montanum* L.). *J. Supercrit. Fluids* **2018**, *138*, 200–206. [[CrossRef](#)]
28. Rodriguez-Meizoso, I.; Jaime, L.; Santoyo, S.; Senorans, F.J.; Cifuentes, A.; Ibanez, E. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 456–463. [[CrossRef](#)]
29. Zakaria, S.M.; Kamal, S.M.M. Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: Applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Eng. Rev.* **2016**, *8*, 23–34. [[CrossRef](#)]
30. Cvetanovic, A.; Svarc-Gajic, J.; Zekovic, Z.; Jerkovic, J.; Zengin, G.; Gasić, U.; Tesić, Z.; Masković, P.; Soares, C.; Fatima Barroso, M.; et al. The Influence of the extraction temperature on polyphenolic profiles and bioactivity of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) subcritical water extracts. *Food Chem.* **2019**, *271*, 328–337. [[CrossRef](#)]
31. Plaza, M.; Amigo-Benavent, M.; Del Castillo, M.D.; Ibanez, E.; Herrero, M. Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 2341–2348. [[CrossRef](#)]
32. Aryal, S.; Baniya, M.K.; Danekhu, K.; Kunwar, P.; Gurung, R. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants* **2019**, *8*, 96–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Kobus, Z.; Krzywicka, M.; Starek-Wójcicka, A.; Sagan, A. Effect of the duty cycle of the ultrasonic processor on the efficiency of extraction of phenolic compounds from *Sorbus intermedia*. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 8311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200. [[CrossRef](#)]
35. Gupta, A.; Behl, T.; Panichayupakaranan, P. A review of phytochemistry and pharmacology profile of *Juglans regia*. *Obes. Med.* **2019**, *16*, 100142. [[CrossRef](#)]
36. Kaminski, P.; Tyskiewicz, K.; Fekner, Z.; Gruba, M.; Kobus, Z. The Influence of Subcritical Water Extraction Parameters on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Walnut (*Juglans regia* L.) Bark Extracts. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 12490. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

P3 Kamiński P., Tyśkiewicz K., Fekner Z., Kobus Z., Gruba M.; „*The effect of reactor design and water extraction parameters under subcritical conditions on the quality of extracts from oak bark (Quercus robur L.)*”. *Przemysł Chemiczny* 103/6 (2024), 695-710.

The effect of reactor design and water extraction parameters under subcritical conditions on the quality of extracts from oak bark (*Quercus robur* L.)

Wpływ kształtu reaktora i parametrów ekstrakcji podkrytycznej na jakość ekstraktów otrzymanych z kory dębu (*Quercus robur* L.)

DOI: 10.15199/62.2024.6.5

Zaprojektowano ekstraktor (40 L) do pozyskiwania polifenoli i flawonoidów z kory dębu (*Quercus robur* L.) za pomocą wody w warunkach podkrytycznych. Aktywność antyoksydacyjną oceniano metodą zmiatania rodnika 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazylowego DPPH. Do analizy ekstraktów wykorzystano spektrofotometrię UV-Vis. Stwierdzono istotną korelację między temperaturą procesu a jakością ekstraktu. Zarówno całkowita zawartość polifenoli i flawonoidów, jak i aktywność antyoksydacyjna wzrastały wraz ze wzrostem temp. odpowiednio do 117,2°C, 116,5°C i 123,2°C. Dalszy wzrost temperatury powodował pogorszenie jakości ekstraktu. Doświadczenia prowadzono wg planu Boks a i Behnkena.

Słowa kluczowe: *Quercus robur* L., ekstrakcja wodą podkrytyczną, dąb, aktywność antyoksydacyjna, ekstrakty z kory, gospodarka o obiegu zamkniętym

An extr. cell (40 L) was designed for obtaining polyphenols and flavonoids from bark of oak (*Quercus robur* L.) with water under subcrit. conditions. The antioxidant activity was assessed by using a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging method. The UV-Vis spectrophotometry was used for anal. of the exts. A high correlation between process temp. and ext. quality was found. Both total contents of polyphenols and flavonoids as well as the antioxidant activity increased with increasing temp. up to 117.2°C, 116.5°C, and 123.2°C, resp. Further increase in temp. resulted in deterioration of the ext. quality. The expts. were carried out according to the Box-Behnken method.

Keywords: *Quercus robur* L., subcritical water extraction, oak, antioxidant activity, bark extracts, circular economy

Woda jest najczęściej występującą na Ziemi substancją chemiczną, bezwonną, bezsmakową i przezroczystą. Chociaż nie zawiera żadnych organicznych mikroelementów ani składników pokarmowych, jest niezbędna dla wszyst-

Water is an odorless, tasteless, and transparent chemical substance, most common on the Earth. Even though it doesn't contain any organic micronutrients or food energy, it is essential for all known forms of living organisms.



MSc. Piotr KAMIŃSKI (ORCID: 0000-0001-8352-3808) in 2003 he graduated from the Faculty of Mechanical Engineering of the Lublin University of Technology. He also completed postgraduate studies at the Faculty of Power and Aeronautical Engineering at the Warsaw University of Technology (2009), at the Faculty of Chemical and Process Engineering at the Warsaw University of Technology (2017) and at the Faculty of Mechatronics at the Warsaw University of Technology (2018). Since 2014, he has been working at the Łukasiewicz Research Network – New Chemical Syntheses Institute, currently as the head of the Hydrogen Technologies and Catalysts Research Group. Specialty – hydrogen technology.

Mgr inż. Piotr KAMIŃSKI (ORCID: 0000-0001-8352-3808) w roku 2003 ukończył studia na Wydziale Mechanicznym Politechniki Lubelskiej. Ukończył także studia podyplomowe na Wydziale Mechanicznym Energetyki i Lotnictwa Politechniki Warszawskiej (2009 r.), na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej (2017 r.) i na Wydziale Mechatroniki Politechniki Warszawskiej (2018 r.). Od 2014 r. pracuje w Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Nowych Syntez Chemicznych, obecnie na stanowisku kierownika Grupy Badawczej Technologie Wodorowe i Katalizatory. Specjalność – technologie wodorowe.

* Address for correspondence/Adres do korespondencji:

Department of Technology Fundamentals, University of Life Sciences, Głęboka 28, 20-612 Lublin, Poland, tel.: +48-81-473-17-31, e-mail: piotr.kaminski@ins.lukasiewicz.gov.pl



Ph.D. Eng. Katarzyna TYŚKIEWICZ (ORCID: 0000-0001-6704-8672) in 2013 she graduated from the Faculty of Chemistry of the Maria Curie-Skłodowska University in Lublin. She obtained her Ph.D. in pharmaceutical sciences in 2020 at the Medical University of Lublin. Currently, she works as the director of the Bioeconomy Research and Development Center at the Łukasiewicz Research Network – New Chemical Syntheses Institute in Puławy, where since 2021 she has also been the head of the Supercritical Extraction Research Group. Specialty – plant extracts for food, cosmetic and pharmaceutical applications.

Dr Katarzyna TYŚKIEWICZ (ORCID: 0000-0001-6704-8672) w roku 2013 ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Stopień doktora nauk farmaceutycznych uzyskała w 2020 r. na Uniwersytecie Medycznym w Lublinie. Obecnie pracuje na stanowisku dyrektora Centrum Badań i Rozwoju Biogospodarka w Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Nowych Syntez Chemicznych w Puławach, gdzie od 2021 r. pełni również funkcję kierownika Grupy Badawczej Ekstrakcja Nadkrytyczna. Specjalność – ekstrakty roślinne do zastosowań spożywczych, kosmetycznych i farmaceutycznych.

kich znanych form organizmów żywych. Ekstrakcja wodą w stanie podkrytycznym (SWE) wykorzystuje tę najbardziej powszechną substancję chemiczną jako rozpuszczalnik przyjazny dla środowiska i ludzi. Proces SWE może być wykorzystywany do odzyskiwania substancji biologicznie czynnych z surowców roślinnych w gospodarce o obiegu zamkniętym. Rozpuszczalnik po ekstrakcji, odparowany i oczyszczony, może być ponownie użyty do ekstrakcji lub wykorzystany w innych procesach chemicznych. Woda osiąga punkt krytyczny pod ciśnieniem $P_{cr} = 22,09$ MPa i w temperaturze $T_{cr} = 374,14^{\circ}\text{C}$. Proces SWE jest skalowalny do rozmiarów przemysłowych, ale podgrzewanie dużych ilości wody do wysokich temperatur i ponowne jej odparowanie w celu uzyskania ekstrahowanych substancji może być czasochłonne i kosztowne. Aby zapewnić ekologiczną i ekonomiczną wydajność procesów stosowanych w gospodarce o obiegu zamkniętym, niezwykle ważne jest dobranie ich optymalnych parametrów, co jest bezpośrednio związane z ekonomią odzyskiwania substancji bioaktywnych.

Kora drzew jest surowcem przetwarzanym głównie na produkty chemiczne i termiczne, ale jest także źródłem substancji biologicznie czynnych. Rośliny zawierają metabolity zidentyfikowane m.in. jako polifenole^{1, 2)}. Są one częściowo wytwarzane przez różne enzymy, które wpływają na reakcje metaboliczne i są składnikami substancji biologicznie czynnych³⁾. Ich metabolizm integruje morfologiczne i biochemiczne wzorce regulacyjne roślin⁴⁾. Związki fenolowe wpływają na systemy obronne roślin^{5, 6)}. Polifenole to składniki żywności, które są korzystne dla zdrowia⁷⁾. Kwasy fenolowe, flawonoidy i garbniki to niektóre ze związków przeciwutleniających występujących w ekstraktach z dębu, które przyczyniają się do poprawy ich potencjału przeciwutleniającego⁸⁾. Silne przeciwutleniacze występujące w *Quercus L.* obejmują kwas galusowy, kwas elagowy i elagitaniny, takie jak roburina, wescalagina lub kastalagina. Związki te wykazują również właściwości antymutagenne i przeciwnowotworowe ze względu na ich zdolność przeciwutleniającą⁹⁾. Aktywność antyoksydacyjna i całkowita zawartość polifenoli w ekstraktach są ze sobą silnie skorelowane¹⁰⁾. Stężenie polifenoli w roślinach różni się dla poszczególnych ich elementów, gdy badane są tkanki i organy roślinne nadające się do zbioru^{11, 12)}. Wykryto,

Subcritical water extraction (SWE) uses this most common chemical substance as an environment- and people-friendly solvent. This SWE can be used for recovering biologically active substances from plant raw materials in a circular economy. The solvent after extraction, evaporated and purified, can be recycled to extraction or used in other chemical processes. The water reaches its critical point at pressure $P_{cr} = 22.09$ MPa and temperature $T_{cr} = 374.14^{\circ}\text{C}$. The SWE process is scalable to an industrial size, but heating the large volumes of water solvent to high temperatures, and the re-evaporation of water to obtain the extracted substances can be time-consuming and costly. To ensure the ecological and economic performance of the processes used in the circular economy, it is extremely important to select their optimal parameters, which is directly related to the economics of recovering bioactive substances.

*The bark of tree is a raw material primarily converted into chemical and thermal by-products, but it is also a source of biologically active substances. The plants contain metabolites identified, inter alia, as polyphenols^{1, 2)}. They are produced in part by various enzymes that affect metabolic reactions and are components of biologically active substances³⁾. Their metabolism integrates the morphological and biochemical regulatory patterns of plants⁴⁾. Phenolic compounds influence the plants' defense systems^{5, 6)}. Polyphenols are food ingredients that are beneficial to health⁷⁾. Phenolic acids, flavonoids, and tannins are some of the antioxidant compounds found in oak extracts which contribute to improving their antioxidative potential⁸⁾. Strong antioxidants found in *Quercus L.* include gallic acid, ellagic acid, and ellagitannins like roburin, wescalagin, orcastalagin. The compounds also exhibit antimutagenic and anticarcinogenic properties due to their antioxidant capacity⁹⁾. The antioxidant activity and total polyphenol content in the extracts are highly correlated¹⁰⁾. The concentration of polyphenols in plants varies for particular elements when harvestable plant tissues and organs are examined^{11, 12)}. The concentration of biologically active substances in Red maple was detected in the following ascending order: stem bark, the bark of branches, and twigs⁷⁾, whereas polyphenols content in Walnuts was detected in the order: main root, buds, leaves, and bark¹³⁾. The bark and leaf extracts of *Quercus crispula L.*, *Quercus salicina L.*,*



Dr. Zygmunta FEKNERA (ORCID: 0000-0002-6267-409X) graduated from the Faculty of Chemistry of the Maria Curie-Skłodowska University in Lublin. He obtained his Ph.D. in chemistry in 1997. He is a senior specialist in the Supercritical Extraction Research Group at the Łukasiewicz Research Network – Institute of New Chemical Syntheses in Puławy.

Dr Zygmunta FEKNERA (ORCID: 0000-0002-6267-409X) ukończył studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w 1997 r. Jest starszym specjalistą w Grupie Badawczej Ekstrakcja Nadkrytyczna w Sieci Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Nowych Syntezy Chemicznych w Puławach.



Ph.D. Eng. Zbigniew KOBUS, prof. UP (ORCID: 0000-0003-2155-1090), in 1997 he graduated from the Faculty of Agricultural and Forestry Technology of the Agricultural University of Lublin (currently the University of Life Sciences in Lublin). He obtained his doctoral degree in agricultural sciences in 2004, and his habilitation degree in agricultural engineering in 2014. Currently, he is the head of the Department of Fundamentals of Technology of the University of Life Sciences in Lublin. Speciality – chemical and process engineering.

Dr hab. inż. Zbigniew KOBUS, prof. UP (ORCID: 0000-0003-2155-1090), w roku 1997 ukończył studia na Wydziale Techniki Rolniczej i Leśnej Akademii Rolniczej w Lublinie (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie). Stopień doktora nauk rolniczych uzyskał w 2004 r., a stopień doktora habilitowanego w dziedzinie inżynierii rolniczej w 2014 r. Obecnie jest kierownikiem w Katedrze Podstaw Techniki Inżynierii Przyrodniczego w Lublinie. Specjalność – inżynieria chemiczna i procesowa.

że stężenie substancji biologicznie czynnych w klonie czerwonym rosło w kolejności: kora pnia, kora gałęzi i gałązek⁷), podczas gdy zawartość polifenoli w orzechach włoskich wzrastała w kolejności: główny korzeń, pąki, liście i kora¹³). Ekstrakty z kory i liści *Quercus crispula* L., *Quercus salicina* L. i *Quercus serrata* L. były badane przez Tuyen i współpr.¹⁴) przy użyciu testów DPPH (rodniki 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowe) i ABTS [2,2'-azinobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)]. Zgodnie z wynikami badań, liście zawierały większą ilość związków fenolowych niż kora. Ekstrakty etanolowe z kory *Quercus salicina* L. osiągnęły całkowitą zawartość polifenoli (TPC) 35,89 mg ekwiwalentu kwasu galusowego (GAE, gallic acid equivalent) na 1 g ekstraktu oraz całkowitą zawartość flawonoidów (TFC) 1,41 mg ekwiwalentu rutyny (RE) na 1 g ekstraktu. Profil fenolowy zawiera kwas chlorogenowy, kwas protokatechowy, kwas syringowy, kwas elagowy, kwas cynamonowy, wanilinę, ferul i kwas benzoowy. W ekstraktach etanolowych z kory *Quercus serrata* L. wartość TPC wynosiła 16,15 mg(GAE)/g ekstraktu i TFC 2,49 mg(RE)/g ekstraktu¹⁴). Kora *Quercus scytophylla* L. badana przez Valencia-Avilés i współpr.¹⁵) osiągnęła wartość TPC 329 mg(GAE)/g wodnego ekstraktu i TFC 24,1 mg ekwiwalentu kwercetyny (QE) na 1 g ekstraktu. W ekstraktach etanolowych oznaczono TPC 521 mg(GAE)/g ekstraktu i TFC 29,1 mg(QE)/g ekstraktu. Alañón i współpr.¹⁶) odnotowali zawartość fenoli wynoszącą 72,63 µg(GAE)/g ekstraktu uzyskanego z kory *Quercus robur* L.

Ekstrakty metanolowe z żołądki *Quercus branti* L. zawierały polifenole w ilości 22,64 mg(GAE)/100 g ekstraktu¹⁷), podczas gdy ekstrakty acetonowe z żołądki *Quercus ilex* L. opisane przez Ferreira i współpr.¹⁸) wykazywały TPC 928 mg(GAE)/100 g i aktywność antyoksydacyjną mierzoną przy użyciu rodników DPPH 51,87 µM ekwiwalentu troloksu (TE) na 1 g ekstraktu. Lavado i współpr.¹⁹) ekstrahowali liście *Quercus suber* L. rozpuszczalnikiem etanol-woda (7:3), uzyskując TPC na poziomie 10,6 mg(GAE)/g ekstraktu.

Ekstrakcja wodna jest przyjazną dla środowiska techniką separacji związków bioaktywnych z materiałów roślinnych. Zaletą tej metody jest również jej skalowalność do rozmiarów przemysłowych²⁰⁻²²). Woda jako rozpuszczalnik ma wiele unikatowych właściwości, z których najważniejsze to: wysoka polarność, duża wartość stałej dielektrycznej i wysoka temperatura wrzenia²³). Wahania temperatury

and *Quercus serrata* L. were studied by Tuyen et al.¹⁴), using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals) and ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] assays. According to the results, leaves contained a higher amount of phenolic compounds than the bark. Ethanol extracts from the bark of *Quercus salicina* L. achieved the total polyphenols content (TPC) 35.89 mg of gallic acid equivalent (GAE) per 1 g of extract as well as the total flavonoid content (TFC) 1.41 mg of rutin equivalent (RE) per 1 g of extract. The phenolic profile contains chlorogenic acid, protocatechuic acid, syringic acid, ellagic acid, cinnamic acid, vanillin, ferulic, and benzoic acid. Ethanol extracts from the bark of *Quercus serrata* L. contain TPC 16.15 mg(GAE)/g of extract and TFC 2.49 mg(RE)/g of extract¹⁴). The *Quercus scytophylla* L. bark studied by Valencia-Avilés et al.¹⁵) achieved TPC 329 mg(GAE)/g of aqueous extract and TFC 24.1 mg of quercetin equivalent (QE) per 1 g of extract. The respective ethanolic extracts contain TPC 521 mg(GAE)/g of extract and TFC 29.1 mg(QE)/g of extract. Alañón et al.¹⁶) reported a phenolic content of 72.63 µg(GAE)/g of extract obtained from the bark of *Quercus robur* L.

Methanol extracts from the acorn of *Quercus branti* L. contains total polyphenols 22.64 mg(GAE)/100 g of extract¹⁷), whereas acetone extracts from the acorn of *Quercus ilex* L. reported by Ferreira et al.¹⁸) exhibited TPC 928 mg(GAE)/100 g and antioxidant activity measured using DPPH radicals 51.87 µM of trolox equivalent (TE) per 1 g of extract. Lavado et al.¹⁹) extracted leaves of *Quercus suber* L. with ethanol-water (7:3) solvent obtained a TPC of 10.6 mg(GAE)/g of extract.

Water extraction is an environmentally friendly separation technique of bioactive compounds from plant materials. The advantage of this method is also its scalability to industrial sizes²⁰⁻²²). Water as a solvent has many unique properties, The most important are: high polarity, high dielectric constant, and high boiling point²³). Water temperature variation causes changes in its properties as a solvent, one of the most important changes is its polarity. Low polar molecules can be separated more efficiently by low polar water present at high temperatures, whereas highly polar compounds are separated more easily at lower temperatures. Moreover, an increase in water temperature results in decrease of surface tension and viscosity, which improves the contact between solvent and extracted material^{1, 24, 25}). An increase in water temperature can enhance extraction rate and efficiency, but can also result in thermal degradation of the extracts.

Scientific research conducted so far indicates that extracts obtained with the use of water under subcritical conditions showed high antioxidant activity closely correlated with the temperature of the extraction process²⁵⁻³⁰). Determination of the optimal variability ranges of extraction parameters is crucial to designing plants for the extraction of biologically active compounds with acceptable levels of production cost.



Marcin GRUBA, M.A. (ORCID: 0000-0002-0426-9811) in 2009 he graduated from the Faculty of Chemistry of the Maria Curie-Skłodowska University in Lublin. He works in the Supercritical Extraction Research Group Ł-INS in Puławy in the Biologically Active Compounds Section. Specialty – analytical chemistry, chromatography with supercritical eluent, HPLC, LC-MS/MS.

Mgr Marcin GRUBA (ORCID: 0000-0002-0426-9811) w roku 2009 ukończył studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Pracuje w Grupie Badawczej Ekstrakcja Nadkrytyczna Ł-INS w Puławach w Sekcji Związków Biologicznie Aktywnych. Specjalność – chemia analityczna, chromatografia z eluentem w stanie nadkrytycznym, HPLC, LC-MS/MS.

wody powodują zmiany jej właściwości jako rozpuszczalnika, a jedną z najważniejszych zmian jest zmiana jej polarności. Słabo polarne cząsteczki mogą być skuteczniej oddzielane przez mało polarną wodę znajdującą się w wysokich temperaturach, podczas gdy wysoce polarne związki są łatwiej oddzielane w niższych temperaturach. Co więcej, wzrost temperatury wody powoduje zmniejszenie napięcia powierzchniowego i lepkości, co poprawia kontakt między rozpuszczalnikiem a ekstrahowanym materiałem^{1, 24, 25}). Wzrost temperatury wody może zwiększyć szybkość i wydajność ekstrakcji, ale może również spowodować degradację termiczną ekstraktów.

Przeprowadzone dotychczas badania naukowe wskazują, że ekstrakty otrzymane z wykorzystaniem wody w warunkach podkrytycznych wykazywały silne działanie przeciwutleniające ściśle skorelowane z temperaturą procesu ekstrakcji^{25–30}). Określenie optymalnych zakresów zmienności parametrów ekstrakcji ma kluczowe znaczenie dla projektowania instalacji do ekstrakcji związków biologicznie czynnych przy akceptowalnych poziomach kosztów produkcji. Obejmuje to najważniejsze parametry, takie jak temperatura, czas trwania procesu i konstrukcja reaktora.

Dostępna literatura naukowa określa bioaktywność ekstraktów z kory dębu, ale nie określa wpływu konstrukcji komory ciśnieniowej i innych parametrów procesu na wydajność ekstrakcji i skład ekstraktu. Określenie optymalnych zakresów zmienności parametrów ekstrakcji ma kluczowe znaczenie dla projektowania instalacji do ekstrakcji związków biologicznie czynnych przy akceptowalnych poziomach kosztów produkcji. Dlatego celem niniejszego badania było określenie wpływu najważniejszych parametrów: temperatury, czasu trwania procesu i konstrukcji reaktora na jakość ekstraktu i wydajność procesu.

Część doświadczalna

Materiały

Korę dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) pozyskano do celów badawczych z pni 30-letnich drzew pod nadzorem pracowników Nadleśnictwa Puławy w Lasach Państwowych (lokalizacja 51°25'59.1 „N 22°00'12.9 ”E). Do suszenia kory dębu w temp. 20°C wykorzystano konwekcję naturalną. Następnie do rozdrobnienia kory użyto młyna tnącego Retsch SM100 o prędkości ostrzy 9,4 m/s. Frakcję 0,9–1,4 mm oddzielano za pomocą wytrząsarki laboratoryjnej Multiserv LPzE-2e przez 30 min przy częstotliwości 50 Hz i amplitudzie drgań 2,5 mm. Materiał był dalej suszony do uzyskania wilgotności 5,25%. Na rys. 1 pokazano surowiec przed rozdrobnieniem.

W testach spektrofotometrycznych stosowano: odczynnik Folina i Ciocalteu (AKTYN, Suchy Las, Polska), węglan sodu (≥99%, Stanlab, Lublin, Polska), kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylo-chromano-2-karboksyloowy (Trolox, >98%, Sigma Aldrich, Merck, Niemcy), kwas galusowy (≥98%, Sigma Aldrich, Merck, Niemcy), metanol (≥99%,

This includes the most important parameters like temperature, process duration, and reactor design.

The available scientific literature determines the bioactivity of oak bark extracts but does not specify the effect of pressure cell design and other process parameters on extraction yield and extract composition. Determination of the optimal variability ranges of extraction parameters is crucial to designing plants for the extraction of biologically active compounds with acceptable levels of production cost. Therefore the aim of this work is to determine impact of the most important parameters: temperature, process duration, and reactor design on the extract quality and process efficiency.

Experimental

Materials

*Under the supervision of Puławy Forest District employees, oak (*Quercus robur* L.) trunk bark was harvested for research purposes in the Polish State Forests (location 51°25'59.1” N 22°00'12.9” E) from trunks of 30-year-old trees. Natural convection was used to dry the oak bark at 20°C. Following that, a Retsch SM100 cutting mill with a 9.4 m/s blade speed was used to crush the bark. Using a Multiserv LPzE-2e laboratory shaker, a fraction with a size range of 0.9 to 1.4 mm was separated for 30 min at a frequency of 50 Hz and an amplitude of 2.5 mm vibrations. The material was further dried until it had a 5.25% moisture content. On Fig. 1, the raw material prior to fragmentation was shown.*

In the spectrophotometric assays the following chemical reagents were used: Folin-Ciocalteu reagent (AKTYN, Suchy Las, Poland), sodium carbonate (≥99%, Stanlab, Lublin, Poland), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid (Trolox, >98%, Sigma Aldrich, Merck, Germany), gallic acid (≥98%, Sigma Aldrich, Merck, Germany), methanol (≥99%, Stanlab, Poland), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Aldrich, Merck, Germany), catechin (≥99.05%, Sigma Aldrich, Merck, Germany), aluminum chloride (>98%, Sigma Aldrich, Merck, Germany).

Methods

Plan of experiment

*The experiment plan was developed with Design Expert v13.0 software (Stat-Ease, Minneapolis). Box-Behnken method was used as the foundation for the research. An experimental plan consisting of three levels and three factors was employed to determine the optimal process parameters for *Quercus robur* L. The process parameter's lowest, mean, and maximum examined values were used to define the three-factor levels. TPC, TFC, and antioxidant activity were considered as dependent variables, while reactor diameter, process time, and water temperature served as independent variables.*



Fig. 1. Oak bark (*Quercus robur* L.) prior to fragmentation

Rys. 1. Kora dębu (*Quercus robur* L.) przed rozdrobnieniem

Stanlab, Polska), 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH, Sigma Aldrich, Merck, Niemcy), katechinę ($\geq 99.05\%$, Sigma Aldrich, Merck, Niemcy), chlorek glinu ($> 98\%$, Sigma Aldrich, Merck, Niemcy).

Metodyka badań

Plan eksperymentu

Plan eksperymentu został opracowany przy użyciu oprogramowania Design Expert v13.0 (Stat-Ease, Minneapolis, USA). Jako podstawę badań wykorzystano metodę Boksa i Behnkena. Zastosowano plan eksperymentu składający się z 3 poziomów i 3 czynników w celu określenia optymalnych parametrów procesu dla *Quercus robur* L. Najmniejsze, średnie i maksymalne wartości badanych parametrów procesu zostały wykorzystane do zdefiniowania poziomów 3 czynników. TPC, TFC i aktywność antyoksydacyjną uznano za zmienne zależne, podczas gdy średnica reaktora, czas trwania procesu i temperatura wody służyły jako zmienne niezależne.

Z 5 centralnymi punktami do pomiaru błędu, eksperyment obejmował 17 możliwych kombinacji. W tabeli 1 zebrano rzeczywiste wartości parametrów procesu dla każdej zmiennej ustalonej zgodnie z planem eksperymentu.

Do oceny wartości uzyskanych w badaniu wykorzystano analizę wariancji (Anova). Istotność statystyczną współczynników regresji oceniono za pomocą testu *F*. Wartość *p* mniejsza niż 0,05 została uznana za istotną.

Ekstrakcja

Ekstrakty wodne w stanie podkrytycznym uzyskano, wykorzystując ekstraktor rozpuszczalnikowy Dionex ASE350. W procesie ekstrakcji zastosowano 3 różne pojemności komory ciśnieniowej: 100 mL (średnica 28,8 mm), 45 mL (średnica 19,4 mm) i 12 mL (średnica 10 mm). W celu ochrony systemu w komorach ciśnieniowych zainstalowano filtry z włókna szklanego. Aby zagwarantować stały stosunek masy do objętości, do procesu ekstrakcji wybrano następujące masy surowca: 16,59 g dla 100 mL, 7,53 g dla 45 mL i 2,00 g dla 12 mL. Na potrzeby procedury ekstrakcji do komory ciśnieniowej wstrzyknięto wodę o czystości analitycznej i przewodności 0,09 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Table 1. Plan of experiment

Tabela 1. Plan eksperymentu

Set/ Poz.	A: Process temperature/ Temperatura procesu, °C	B; Reactor diameter/ Średnica reaktora, mm	C: Process time/ Czas trwania procesu, min
1	150	10	10
2	150	19.4	5
3	110	19.4	5
4	110	10	10
5	130	10	5
6	130	19.4	10
7	110	19.4	15
8	130	19.4	10
9	110	28.8	10
10	130	28.8	5
11	150	28.8	10
12	130	19.4	10
13	130	28.8	15
14	150	19.4	15
15	130	19.4	10
16	130	19.4	10
17	130	10	15

With 5 central points to measure the pure error, the experiment included 17 possible combinations. In the Table 1, the actual process parameter values for each variable set as per the experiment design were collected.

Analysis of variance (Anova) was used to evaluate the values obtained in the study. The statistical significance of the regression coefficients was assessed using the *F*-test. The *p*-value of less than 0.05 was considered significant.

Extraction

Subcritical water extracts were obtained by using an accelerated solvent extractor Dionex ASE350. Three different pressure cell capacities were used for the extraction process: 100 mL (diameter 28.8 mm), 45 mL (diameter 19.4 mm), and 12 mL (diameter 10 mm). For the protection of the system, fiberglass filters were integrated into the pressure cells. The following mass of the raw material was chosen for the extraction process to guarantee a constant mass-to-volume ratio: 16.59 g for 100 mL, 7.53 g for 45 mL, and 2.00 g for 12 mL. For the extraction procedure, analytical purity water with a conductivity of 0.09 $\mu\text{S}/\text{cm}$ was injected into the pressure cell. Water and raw material-containing pressure cell was heated up to the appropriate temperature in accordance with the experimental plan (DoE-Design of Experiment) and left for the specified amount of time. After that, the extract was vacuum-dried by water evaporation at 40°C. The extracted materials were kept chilled in the lab refrigerator at 2°C for further investigation.

Celka ciśnieniowa zawierająca wodę i surowiec została podgrzana do odpowiedniej temperatury, zgodnie z planem eksperymentu (*DoE-Design of Experiment*) i pozostawiona na określony czas. Następnie ekstrakt suszono próżniowo przez odparowanie wody w temp. 40°C. Wyekstrahowane materiały przechowywano w lodówce laboratoryjnej w temp. 2°C do dalszych badań.

Oznaczanie TPC

Aby zweryfikować jakość ekstraktu, przeprowadzono spektrofotometryczne oznaczenie TPC metodą Folina i Ciocalteu. Wzorcem odniesienia dla spektrofotometrii stosowanej do oznaczania TPC był kwas galusowy. Wykorzystując proces wyjaśniony przez Sahin i współpr.²⁶⁾, oznaczono TPC. TPC wyrażono w mg(GAE)/g suchego ekstraktu. Krzywa kalibracyjna użyta do oznaczenia TPC została przedstawiona równaniem (1):

$$TPC = 0,1074A + 0,0585 \quad (R^2 = 0,9963) \quad (1)$$

w którym *TPC* ma wymiar 10⁻⁶ g(GAE)/mL, a *A* oznacza absorbancję, dim.

Oznaczanie TFC

TFC mierzono metodą spektrofotometrii przy użyciu katechiny jako wzorca odniesienia. Zastosowana procedura została opisana przez Aryal i współpr.³¹⁾ z kilkoma modyfikacjami³²⁾. Próbkę ekstraktu (1,0 mL) mieszało z 1 mL 2-proc. roztworu AlCl₃·6H₂O na bazie metanolu. Aby osiągnąć objętość 10 mL, do mieszaniny dodano wodę destylowaną. Mieszaninę pozostawiono na 10 min w temperaturze pokojowej w ciemności, po czym zmierzono absorbancję przy 510 nm. Wyniki wyrażono w mg(CTE)/g suchego ekstraktu. Krzywa kalibracyjna użyta do oznaczenia TFC została przedstawiona równaniem (2):

$$TFC = 27,956A + 0,0228 \quad (R^2 = 0,9998) \quad (2)$$

w którym *TFC* ma wymiar 10⁻³ g(CTE)/mL, a *A* oznacza absorbancję, dim.

Oznaczanie aktywności antyoksydacyjnej

W przypadku testu DPPH do oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej zastosowano technikę opisaną przez Blois³³⁾ z kilkoma modyfikacjami³²⁾. Podwielokrotność świeżo przygotowanego 6·10⁻⁵ M rodnika DPPH w metanolu o objętości 5,0 mL mieszało z 60 µL ekstraktu. Po 30-minutowym okresie inkubacji w temperaturze pokojowej zmierzono absorbancję spektrofotometryczną przy 517 nm, stosując metanol jako próbę ślepą. Dla każdej próbki wykonano 3 powtórzenia pomiaru. Wyniki zostały przedstawione w postaci ekwiwalentu troloksu: 10⁻⁶ M(TE)/g suchej masy³²⁾. Aktywność antyoksydacyjną mierzono, stosując metodę DPPH. Krzywa kalibracji została przedstawiona jako równanie (3):

$$AC_{DPPH} = 0,9397A + 0,7561 \quad (R^2 = 0,9993) \quad (3)$$

where *AC_{DPPH}* is antioxidant activity (10⁻³ M(TE)/mL) and *A* means absorbance, dim.

Determination of TPC

To verify the quality of the extract, spectrophotometric determination of the TPC was performed by Folin-Ciocalteu method. The reference standard for spectrophotometry used to determine the TPC was gallic acid. Using the process explained by Sahin et al.²⁶⁾, the TPC was determined. The TPC was expressed in mg(GAE)/g of dry extract. The calibration curve used to determine the TPC was given by equation (1):

$$TPC = 0.1074A + 0.0585 \quad (R^2 = 0.9963) \quad (1)$$

where *TPC*, 10⁻⁶ g(GAE)/mL and *A* means absorbance, dim.

Determination of TFC

The TFC was measured by spectrophotometry using catechin as the reference standard. The procedure was described by Aryal et al.³¹⁾ with a few modifications³²⁾. The extract sample (1.0 mL) was mixed with 1 mL of a 2% AlCl₃·6H₂O solution based on methanol. To reach 10 mL volume, distilled water was added to the mixture. The mixture was left for 10 min at room temperature in the dark, after which the absorbance at 510 nm was measured. The results are expressed in mg(CTE)/g of dry extract. The calibration curve used to determine TFC was given by equation (2):

$$TFC = 27.956A + 0.0228 \quad (R^2 = 0.9998) \quad (2)$$

where *TFC* has dimension of 10⁻³ g(CTE)/mL and *A* means absorbance, dim.

Determination of antioxidant activity

In the case of DPPH assay, the technique described by Blois³³⁾ was used to measure antioxidant activity with a few modifications³²⁾. A 5.0 mL aliquot of freshly produced 6·10⁻⁵ M DPPH radical in methanol was mixed with 60 µL of extract. After a 30-min long incubation period at room temperature, the spectrophotometric absorbance was measured at 517 nm by using methanol as a blank. Every sample got 3 replications of its measurement. The outcomes were reported in terms of Trolox equivalent: 10⁻⁶ M(TE)/g of dry extract³²⁾. The antioxidant activity was measured using the DPPH method. The calibration curve was given as the equation (3):

$$AC_{DPPH} = 0.9397A + 0.7561 \quad (R^2 = 0.9993) \quad (3)$$

where *AC_{DPPH}* is antioxidant activity (10⁻³ M(TE)/mL) and *A* means absorbance, dim.

Results and discussion

Extraction efficiency

By comparing the mass of the dry extract to the mass of the dry raw material, the effectiveness of the extraction

Table 2. Extraction process efficiency

Tabela 2. Skuteczność procesu ekstrakcji

Set/ Poz.	Process temperature/ Temperatura procesu, °C	Reactor diameter/ Średnica reaktora, mm	Process time/ Czas trwania procesu, min	Extract (dry mass)/ Ekstrakt (sucha masa), g	Extraction yield (dry mass)/ Wydajność ekstrakcji (sucha masa), %
1	150	10	10	0.2741	9.11
2	150	19.4	5	0.7116	6.30
3	110	19.4	5	0.3519	3.11
4	110	10	10	0.1190	3.95
5	130	10	5	0.1482	4.92
6	130	19.4	10	0.5912	5.23
7	110	19.4	15	0.4547	4.01
8	130	19.4	10	0.5105	4.51
9	110	28.8	10	0.7377	2.95
10	130	28.8	5	0.7822	3.13
11	150	28.8	10	1.6914	6.77
12	130	19.4	10	0.5995	5.28
13	130	28.8	15	1.2015	4.80
14	150	19.4	15	0.9598	8.49
15	130	19.4	10	0.5539	4.90
16	130	19.4	10	0.4550	4.02
17	130	10	15	0.1744	5.79

$$AC_{DPPH} = 0,9397A + 0,7561 \quad (3)$$

$$(R^2 = 0,9993)$$

w którym AC_{DPPH} oznacza aktywność antyoksydacyjną (10^{-3} M(TE)/mL), a A absorbancję, dim.

Wyniki badań i ich omówienie

Skuteczność ekstrakcji

Porównując masę suchego ekstraktu do masy suchego surowca, oceniono skuteczność procesu ekstrakcji kory dębu (*Quercus robur* L.). Uzyskane wyniki zawierały się w przedziale 2,95–9,11% w zależności od konkretnych warunków eksperymentu. Wyniki każdego zestawu planów eksperymentów (DoE) przedstawiono w tabeli 2. Wyniki oznaczeń TPC i TFC oraz aktywności antyoksydacyjnej przedstawiono w tabeli 3.

Zestaw parametrów nr 9 osiągnął najniższą wydajność ekstrakcji (2,95%), przy temp. procesu 110°C, która była najmniejszą wartością w zakresie zmienności temperatury, podczas gdy zestaw parametrów nr 1 wygenerował najwyższą wydajność ekstrakcji (9,11%), przy temp. procesu 150°C, która była największą wartością testowanych temperatur. TPC i TFC, a także aktywność antyoksydacyjna osiągnęły największe wartości w 130°C, a najmniejsze w 150°C.

Jakość ekstraktu – TPC

Wartość TPC ekstraktów z kory dębu (*Quercus robur* L.) zawierała się w granicach 180,7–381,9 mg(GAE)/g suchego ekstraktu (DE), w zależności od warunków eksperymentu. Zależność zawartości polifenoli od temperatury procesu została zilustrowana na rys. 2. Na rys. 2–4 95-proc. przedziały ufności średniej odpowiedzi zaznaczono niebieskimi przerywanymi liniami, granice przestrzeni projektowej

Table 3. Chemical analyses: TPC, TFC and antioxidant activity (dry extract)

Tabela 3. Wyniki analizy chemicznej: TPC, TFC i aktywności antyoksydacyjnej (suchy ekstrakt)

Set/ Poz.	TPC, mg(GAE)/g	TFC, mg(CTE)/g	Antioxidant activity (DPPH)/ Aktywność antyoksydacyjna (DPPH), 10^{-6} M(TE)/g
1	224.1	111.4	1474
2	243.8	118.7	1544
3	369.5	184.5	1997
4	332.2	167.9	1975
5	381.9	137.7	1880
6	312.5	153.6	2027
7	346.7	167.7	1597
8	328.1	184.7	1934
9	354.2	181.3	1936
10	348.7	175.5	1834
11	250.8	111.6	1471
12	320.9	173.4	2087
13	331.0	171.3	2144
14	180.7	100.8	1313
15	336.2	179.3	2201
16	351.5	176.5	2135
17	323.3	157.3	1621

process of oak (*Quercus robur* L.) bark was assessed. The results obtained showed a variation between 2.95 and 9.11% depending on the specific conditions of the experiment. The outcomes of every set of Design of Experiments (DoE) was shown in Table 2. The TPC and TFC determination results, along with the antioxidant activities, were shown in Table 3.

The data set number 9 achieved the lowest extraction yield (2.95%), with a process temperature of 110°C, which was the lowest value in the temperature variability range, whereas the data set number 1 generated the highest extraction yield (9.11%), with a process temperature of 150°C, which was the highest value of tested temperatures. The

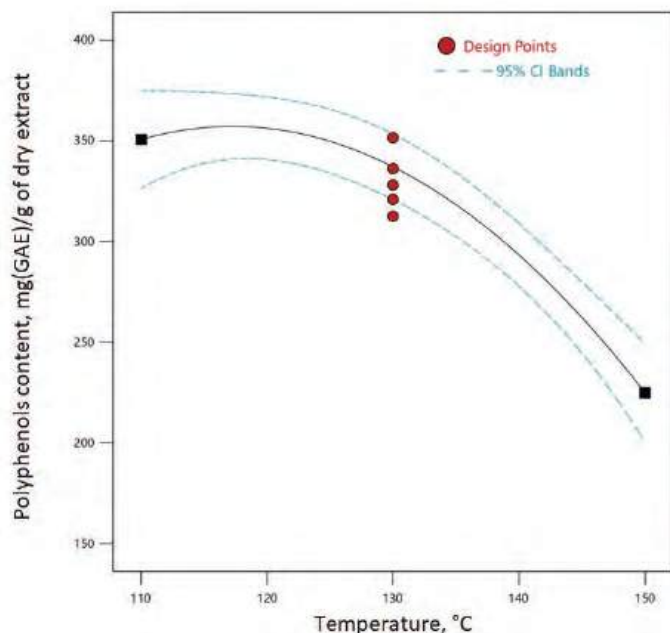


Fig. 2. TPC with regard to temperature of extraction
Rys. 2. TPC w zależności od temperatury ekstrakcji

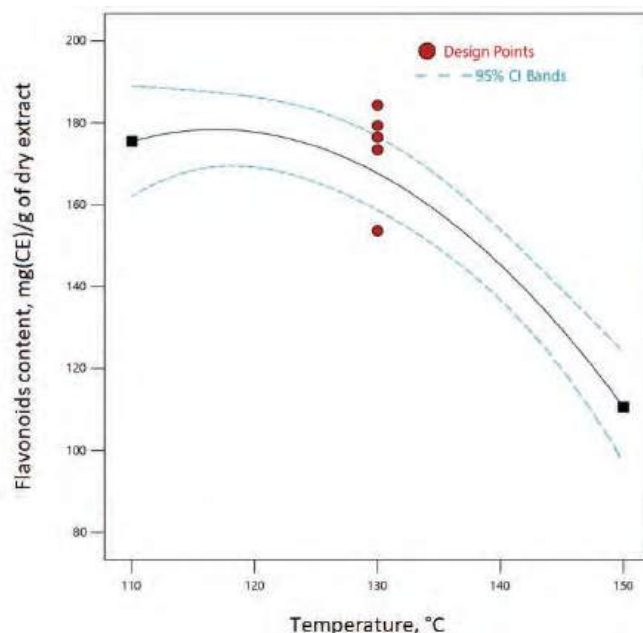


Fig. 3. TFC with regard to temperature of extraction
Rys. 3. TFC w zależności od temperatury ekstrakcji

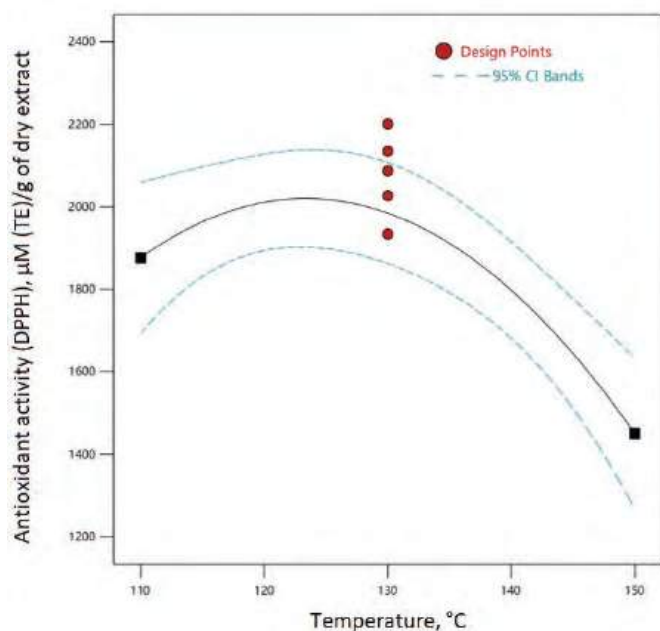


Fig. 4. Antioxidant activity with regard to the temperature of extraction
Rys. 4. Aktywność antyoksydacyjna w zależności od temperatury ekstrakcji

oznaczono czarnymi kwadratami na końcach wykresów, a punkty projektowe (centralne), które zostały wykorzystane do walidacji modelu matematycznego, przedstawiono za pomocą wypełnionych na czerwono okręgów.

Przeprowadzono wielowariantową analizę wariancji, wykorzystując wyniki analityczne zawartości polifenoli, które wykazały, że temperatura procesu była jedynym czynnikiem wpływającym na TPC. Równanie drugiego rzędu zdefiniowało zależność między temperaturą a zawartością polifenoli. Do 117,2°C zawartość polifenoli wzrastała wraz ze wzrostem temperatury, a następnie spadała. Zmiany

TPC and TFC as well as the antioxidant activity reached the highest values at 130°C and the lowest at 150°C.

Extract quality – TPC

The TPC of the extracts from the bark of oak (*Quercus robur* L.) varied from 180.7 to 381.9 mg(GAE)/g of dry extract (DE) depending on the conditions of the experiment. The dependence of polyphenol content on process temperature was illustrated in Fig. 2. In Figs. 2–4, the 95% confidence intervals of the average response were shown by the blue dashed lines. Limits of the design space were shown by the black squares at the ends of the charts. The design (central) points that were utilized to validate the mathematical model were represented by the red-filled circles.

A multivariable analysis of variance was carried out based on the analytical results of polyphenol content, and the findings showed that the process temperature was the only factor influencing the TPC. A second-order equation defined the relationship between temperature and polyphenols content. Up to 117.2°C, the content of polyphenols increased with increasing temperature; after that decreased. Changes in process time and reactor shape did not appear to have an impact on TPC. An Anova analysis was shown in detail in Table 4.

The *F*-value of 40.62 indicates the significance of the model. An *F*-value this high is only 0.01% likely to be the result of noise. The model terms are significant if the *p*-value is less than 0.05. In this particular case, one important model term is the temperature. The 2.84 lack-of-fit *F*-value indicates the lack of fit does not seem to be significant when considering the pure error. The adjusted *R*² of 0.8320 and the predicted *R*² of 0.7753 exhibits a respectable degree of

czasu trwania procesu i kształtu reaktora nie miały wpływu na TPC. Analiza Anova została szczegółowo przedstawiona w tabeli 4.

Wartość F wynosząca 40,62 wskazała na istotność modelu. Prawdopodobieństwo, że tak duża wartość F jest wynikiem szumu wynosi zaledwie 0,01%. Warunki modelu są znaczące, jeśli wartość p jest mniejsza niż 0,05. W tym konkretnym przypadku jedynym istotnym parametrem modelu była temperatura. Wartość F braku dopasowania wynosząca 2,84 wskazywała, że brak dopasowania nie wydawał się być znaczący, biorąc pod uwagę błąd. Skorygowany R^2 wynoszący 0,8320 i przewidywany R^2 wynoszący 0,7753 wskazywały na znaczny stopień zgodności. Odpowiednia precyzja, czyli stosunek sygnału do szumu, pokazała, że sygnał był prawidłowy, z wartością 13,17. Wynikowy model mógł być wykorzystany do zbadania badanego obszaru i był statystycznie istotny.

Do obliczenia ogólnej zawartości polifenoli użyto równania (4).

$$TPC = -0,123401T^2 + 28,93977T - 1339,57077 \quad (4)$$

w którym TPC ma wymiar mg(GAE)/g(DE) , a T oznacza temperaturę, $^{\circ}\text{C}$.

Dotychczas nie prowadzono badań dotyczących ilości polifenoli w podkrytycznych ekstraktach wodnych w zależności od temperatury dla kory dębu (*Quercus robur* L.). Według dostępnych danych w ekstraktach uzyskanych

agreement. A deq. precision, which is the signal-to-noise ratio, shows that the signal is appropriate with a value of 13.17. The resultant model can be used to explore the investigated area and is statistically significant.

Equation (4) was used to compute the overall polyphenol content.

$$TPC = -0.123401T^2 + 28.93977T - 1339.57077 \quad (4)$$

Where TPC mg(GAE)/g(DE) and T temperature, $^{\circ}\text{C}$.

There were currently no studies on the quantity of polyphenols in subcritical water extracts in relation to temperature for oak (*Quercus robur* L.) bark. The available information indicated that extracts obtained from the bark of *Quercus salicina* L. using ethanol as solvent achieved a total polyphenol content of $35.89 \text{ mg(GAE)/g(DE)}$, whereas extracts obtained from the bark of *Quercus serrata* L. using ethanol as solvent achieved $16.15 \text{ mg(GAE)/g(DE)}$ ¹⁴. Three bark of *Quercus scytophylla* L. was the subject of a study by Valencia-Avilés et al.¹⁵ obtained extracts achieved a TPC of $329 \text{ mg(GAE)/g(DE)}$ using water and a TPC of $521 \text{ mg(GAE)/g(DE)}$ using ethanol as a solvent. Alañón et al.¹⁶ reported a phenolic content of $72.63 \mu\text{g(GAE)/g(DE)}$ obtained from the bark of *Quercus robur* L. Subcritical water extracts obtained from the bark of Walnut (*Juglans regia* L.) and Norway maple (*Acer platanoides* L.) achieved a TPC as follows: $192.2 \text{ mg(GAE)/100 g}$ (dry raw material mass) and $943 \text{ mg(GAE)/100 g}$ (dry raw material mass)^{34, 35}.

Table 4. Anova analysis for TPC

Tabela 4. Wyniki analizy Anova w odniesieniu do TPC

Parameter/ Parametr	Sum of squares/ Suma kwadratów	df/ Stopnie swobody	Mean square/ Średni kwadrat	F-Value/ F- Wartość	p-Value/ p-Wartość	
Model	41.961.86	2	20.980.93	40.62	< 0.0001	significant/ znaczące
A – Temperature/ Temperatura	31.642.73	1	31.642.73	61.25	< 0.0001	
A ² – Temperature ² / Temperatura ²	10.319.13	1	10.319.13	19.98	0.0005	
Residual/ Pozostałość	7.232.07	14	516.58			
Lack of fit/ Brak dopasowania	6.339.28	10	633.93	2.84	0.1631	not significant/ nieznaczące
Pure error/ Błąd	892.79	4	223.20			
Cor total/ Skorygowana całkowita suma kwadratów	49.193.92	16				
Fit statistics/ Statystyki dopasowania			R^2	0.8530		
Std. dev./ Odchylenia standardowe	22.73		adjusted R^2 / skorygowany R^2	0.8320		
Mean/Średnia	313.89		predicted R^2 / przewidywany R^2	0.7753		
C.V. %	7.24		adequate precision/ odpowiednia precyzja	13.1740		

z kory *Quercus salicina* L. przy użyciu etanolu jako rozpuszczalnika całkowita zawartość polifenoli wynosiła 35,89 mg(GAE)/g(DE), podczas gdy w ekstraktach uzyskanych z kory *Quercus serrata* L. przy użyciu etanolu jako rozpuszczalnika wynosiła ona 16,15 mg(GAE)/g(DE)¹⁴⁾. Kora drzewa *Quercus scytophylla* L. była przedmiotem badań Valencia-Avilés i współprac.¹⁵⁾ W uzyskanych ekstraktach wartość TPC wyniosła 329 mg(GAE)/g(DE), gdy użyto wody i 521 mg(GAE)/g(DE) przy użyciu etanolu jako rozpuszczalnika. Alañón i współprac.¹⁶⁾ odnotowali zawartość fenoli wynoszącą 72,63 µg(GAE)/g(DE) w ekstrakcie uzyskanym z kory *Quercus robur* L. Podkrytyczne ekstrakty wodne otrzymane z kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) i klonu pospolitego (*Acer platanoides* L.) osiągnęły TPC odpowiednio: 192.2 mg(GAE)/100 g (sucha masa surowca) i 943 mg(GAE)/100 g (sucha masa surowca)^{34, 35)}.

Według niniejszego badania zawartość polifenoli ekstrahowanych z kory pnia *Quercus robur* L. zawierała się w granicach 180,7–381,9 mg(GAE)/g(DE) (526,9–1614,7 mg(GAE)/100 g suchej masy surowca), w zależności od temperatury. Podobną zawartość fenoli uzyskali Valencia-Avilés i współprac.¹⁵⁾ w ekstraktach wodnych z *Quercus scytophylla* L. Różnice w stężeniu polifenoli można przypisać wielu czynnikom, takim jak różne metody ekstrakcji, zmienne procesowe, rodzaj rozpuszczalnika, długość przechowywania materiału przed badaniami, okres zbiorów i metody obróbki wstępnej surowca³⁶⁾. Na strukturę chemiczną fitoskładników mają wpływ zmiany w otaczającym środowisku, takie jak rodzaj gleby, klimat i położenie geograficzne³⁴⁾.

Celem tego doświadczenia było zbadanie, w jaki sposób kształt reaktora, temperatura i czas trwania procesu wpłynęły na całkowitą zawartość polifenoli, flawonoidów i aktywność antyoksydacyjną uzyskanych ekstraktów, a nie określenie maksymalnej wydajności ekstrakcji polifenoli. Stwierdzono, że na zawartość polifenoli duży wpływ miały zmiany temperatury. Zmiany kształtu komory ciśnieniowej i czasu trwania procesu nie miały wpływu na TPC.

Jakość ekstraktu – TFC

Zawartość flawonoidów w ekstraktach z kory dębu (*Quercus robur* L.) wahała się w granicach 100,8–184,9 mg(CE)/g suchego ekstraktu (DE), w zależności od warunków eksperymentu. Zależność zawartości flawonoidów od temperatury procesu zilustrowano na rys. 3. Na rysunku 95-proc. przedziały ufności średniej odpowiedzi zaznaczono niebieskimi przerywanymi liniami, granice przestrzeni projektowej oznaczono czarnymi kwadratami na końcach wykresów, a punkty projektowe (centralne), które zostały wykorzystane do walidacji modelu matematycznego, przedstawiono za pomocą wypełnionych na czerwono okręgów.

Przeprowadzono wielowariantową analizę wariancji na podstawie wyników analitycznych zawartości flawonoidów. Wyniki wykazały, że temperatura procesu była jedynym czynnikiem wpływającym na TFC. Równanie drugiego

*According to this study, the extracted polyphenol content from *Quercus robur* L. trunk bark ranged from 180.7 to 381.9 mg(GAE)/g(DE) (from 526.9 to 1614.7 mg(GAE)/100 g of dry raw material mass) depending on temperature. Similar content of phenols was obtained in the water extracts from *Quercus scytophylla* L. by Valencia-Avilés et al.¹⁵⁾. Differences in the concentration of polyphenols could be attributed to many factors, such as different extraction methods, process variables, type of solvent, length of material storage before research, harvesting period, and raw material pre-treatment methods³⁶⁾. The chemical structure of phytonutrients was influenced by alterations in the surrounding environment, such as soil type, climate, and geographic location³⁴⁾. It should be mentioned that the purpose of this study was to investigate how reactor shape, temperature, and process duration affected the total amount of polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity of the extracts that were obtained, rather than to determine the maximum yield for polyphenol extraction. In this case, polyphenol content was highly affected by temperature variation. Changes in the pressure cell's shape and process duration did not appear to have an impact on TPC.*

Extract Quality – TFC

*The flavonoid content of the extracts obtained from the bark of oak (*Quercus robur* L.) varied from 100.8 to 184.9 mg(CE)/g of dry extract (DE) depending on the conditions of the experiment. The dependence of flavonoid content on process temperature is illustrated in Fig. 3. The 95% confidence intervals of the average response are shown by the blue dashed lines. Limits of the design space are shown by the black squares at the ends of the charts. The design (central) points that were utilized to validate the mathematical model are represented by the red-filled circles.*

A multivariable analysis of variance was carried out based on analytical results of the flavonoid content, and the findings showed that the process temperature was the only factor influencing the TFC. A second-order equation defined the relationship between temperature and flavonoid content. Up to 116.5°C, the content of flavonoids increased with increasing temperature; after that decreased. Changes in process time and reactor shape did not appear to have an impact on TFC. An Anova analysis was shown in detail in Table 5.

The F-value of 34.83 indicated the significance of the model. An F-value this high was only 0.01% likely to be the result of noise. The model terms are significant if the p-value is less than 0.05. In this particular case, one important model term was the temperature. The 1.19 lack-of-fit F-value indicated the lack of fit did not seem to be significant when considering the pure error. The adjusted R² of 0.8088 and the predicted R² of 0.7725 exhibited a respectable degree of agreement. Adequate precision, which is the signal-to-noise ratio, shows that the signal is

Table 5. Anova analysis for TFC

Tabela 5. Wyniki analizy Anova w odniesieniu do TFC

Parameter/Parametr	Sum of squares/ Suma kwadratów	df/ Stopnie swobody	Mean square/ Średni kwadrat	F-Value/ F- Wartość	p-Value/ p-Wartość	
Model	10.971.36	2	5.485.68	34.83	< 0.0001	significant/ znaczące
A – Temperature/ Temperatura	8.404.56	1	8.404.56	53.37	< 0.0001	
A ² – Temperature ² / Temperatura ²	2.566.79	1	2.566.79	16.30	0.0012	
Residual/ Pozostałość	2.204.68	14	157.48			
Lack of fit/ Brak dopasowania	1.649.41	10	164.94	1.19	0.4705	not significant/ nieznaczące
Pure error/ Błąd	555.27	4	138.82			
Cor total/ Skorygowana całkowita suma kwadratów	13.176.04	16				
Fit statistics/ Statystyki dopasowania			R ²	0.8327		
Std. dev./ Odchylenie standardowe	12.55		adjusted R ² / skorygowany R ²	0.8088		
Mean/Średnia	156.07		predicted R ² / przewidywany R ²	0.7725		
C.V. %	8.04		adequate precision/ odpowiednia precyzja	12.2970		

rzędu zdefiniowało zależność między temperaturą a zawartością flawonoidów. Do 116,5°C zawartość flawonoidów wzrastała wraz ze wzrostem temperatury, a następnie spadała. Zmiany czasu trwania procesu i kształtu reaktora nie miały wpływu na TFC. Analiza Anova została szczegółowo przedstawiona w tabeli 5.

Wartość F wynosząca 34,83 wskazała na istotność modelu. Prawdopodobieństwo, że tak duża wartość F była wynikiem szumu wynosiło zaledwie 0,01%. Warunki modelu są znaczące, jeśli wartość p jest mniejsza niż 0,05. W tym konkretnym przypadku jedynym ważnym parametrem modelu była temperatura. Wartość F braku dopasowania wynosząca 1,19 wskazała, że brak dopasowania nie wydawał się być znaczący, biorąc pod uwagę błąd. Skorygowany R^2 wynoszący 0,8088 i przewidywany R^2 wynoszący 0,7725 wykazywały znaczny stopień zgodności. Odpowiednia precyzja, czyli stosunek sygnału do szumu, pokazała, że sygnał był prawidłowy, z wartością 12,30. Wynikowy model mógł być wykorzystany do zbadania badanego obszaru i był statystycznie istotny.

Do obliczenia całkowitej zawartości flawonoidów użyto równania (5):

$$TFC = -0,061545T^2 + 14,38111T - 661,77604 \quad (5)$$

w którym TFC ma wymiar mg(CE)/g(DE), a T oznacza temperaturę, °C.

appropriate with a value of 12.30. The resultant model can be used to explore the investigated area and is statistically significant.

Equation (5) was used to compute the overall flavonoid content:

$$TFC = -0.061545T^2 + 14.38111T - 661.77604 \quad (5)$$

where: TFC , mg(CE)/g(DE), T means temperature, °C.

There were currently no studies on the quantity of flavonoids in subcritical water extracts in relation to temperature for oak (*Quercus robur* L.) bark. The available information indicates that extracts from the bark of *Quercus salicina* L. using ethanol as solvent achieved a TFC of 1.41 mg(RE)/g of dry extract (RE: Rutin Equivalent), whereas extracts obtained from the bark of *Quercus serrata* L. using ethanol as solvent achieved 2.49 mg(RE)/g(DE)¹⁴. Three bark of *Quercus scytophylla* L. was the subject of a study by Valencia-Avilés et al.¹⁵ obtained extracts achieved a total flavonoid content 24.1 mg(QE)/g of extract using water and 12.9 mg(QE)/g of extract using ethanol as a solvent. Subcritical water extracts obtained from the bark of walnut (*Juglans regia* L.) and norway maple (*Acer platanoides* L.) achieved a total flavonoid content as follows: 88.3 mg(QE)/100 g (dry raw material mass) and 188 mg(CE)/100 g (dry raw material mass)^{34, 35}.

Obecnie nie ma badań dotyczących ilości flawonoidów w podkrytycznych ekstraktach wodnych w zależności od temperatury dla kory *Quercus robur* L. Według dostępnych danych w ekstraktach uzyskanych z kory *Quercus salicina* L. przy użyciu etanolu jako rozpuszczalnika wartość TFC wynosiła 1,41 mg(RE)/g suchego ekstraktu (RE: ekwiwalent rutyny), podczas gdy ekstrakty uzyskane z kory *Quercus serrata* L. przy użyciu etanolu jako rozpuszczalnika osiągnęły 2,49 mg(RE)/g(DE)¹⁴. Kora drzewa *Quercus scytophylla* L. była przedmiotem badań Valencia-Avilés i współpr.¹⁵. W ekstraktach uzyskanych przy użyciu wody zawartość flawonoidów wynosiła 24,1 mg(QE)/g ekstraktu i 12,9 mg(GAE)/g w ekstraktach przy użyciu etanolu jako rozpuszczalnika. Podkrytyczne ekstrakty wodne uzyskane z kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) i klonu pospolitego (*Acer platanoides* L.) osiągnęły TFC odpowiednio: 88,3 mg(QE)/100 g (sucha masa surowca) i 188 mg(CE)/100 g (sucha masa surowca)^{34, 35}.

Według niniejszego badania zawartość flawonoidów ekstrahowanych z kory pnia *Quercus robur* L. wahała się w granicach 100,8–184,9 mg(CE)/g(DE) (605,8–900,8 mg(CE)/100 g suchej masy surowca), w zależności od temperatury. Uzyskane stężenie flawonoidów było 4-krotnie większe od zawartości flawonoidów uzyskanych z kory klonu pospolitego w badaniach opisanych w pracy badawczej³⁵. Różnice w stężeniu flawonoidów można przypisać wielu czynnikom, takim jak różne metody ekstrakcji, zmienne procesowe, rodzaj rozpuszczalnika, długość przechowywania materiału przed badaniami, okres zbiorów i metody obróbki wstępnej surowca³⁶. Na strukturę chemiczną fitoskładników wpływ mają zmiany w otaczającym środowisku, takie jak rodzaj gleby, klimat i położenie geograficzne³⁴.

Celem tego doświadczenia było zbadanie, w jaki sposób kształt reaktora, temperatura i czas trwania procesu wpłynęły na całkowitą zawartość polifenoli, flawonoidów i aktywność antyoksydacyjną uzyskanych ekstraktów, a nie określenie maksymalnej wydajności ekstrakcji flawonoidów. Stwierdzono, że na zawartość flawonoidów duży wpływ miały zmiany temperatury. Zmiany kształtu komory ciśnieniowej i czasu trwania procesu nie miały wpływu na TFC.

Jakość ekstraktu – aktywność antyoksydacyjna

Aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z kory *Quercus robur* L. zmieniała się w granicach 1313–2201 $\mu\text{M(TE)}/\text{g}$ suchego ekstraktu (DE), w zależności od warunków eksperymentu. Zależność aktywności antyoksydacyjnej od temperatury procesu została zilustrowana na rys. 4. Na rysunku 95-proc. przedziały ufności średniej odpowiedzi zostały zaznaczone niebieskimi przerywanymi liniami, granice przestrzeni projektowej oznaczono czarnymi kwadratami na końcach wykresów, a punkty projektowe (centralne), które zostały wykorzystane do walidacji modelu matematycznego, zostały przedstawione za pomocą wypełnionych na czerwono okręgów.

*According to this study, the extracted flavonoid content from oak (*Quercus robur* L.) trunk bark ranged from 100.8 to 184.9 mg(CE)/g(DE) (from 605.8 to 900.8 mg(CE)/g of dry raw material mass) depending on the temperature. Obtained flavonoid concentration is 4 times higher than the content of flavonoids achieved from norway maple bark in the studies described in research work³⁵. Differences in the concentration of flavonoids can be attributed to many factors, such as different extraction methods, process variables, type of solvent, length of material storage before research, harvesting period, and raw material pre-treatment methods³⁶. The chemical structure of phytonutrients is influenced by alterations in the surrounding environment, such as soil type, climate, and geographic location³⁴. It should be mentioned that the purpose of this study was to investigate how reactor shape, temperature, and process duration affected the total amount of polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity of the extracts that were obtained, rather than to determine the maximum yield for flavonoid extraction. In this case, flavonoid content was highly affected by temperature variation. Changes in the pressure cell's shape and process duration did not appear to have an impact on TFC.*

Extract quality – antioxidant activity

*The antioxidant activity of the extracts from the bark of oak (*Quercus robur* L.) varied from 1313 to 2201 $\mu\text{M(TE)}/\text{g(DE)}$ depending on the conditions of the experiment. The dependence of antioxidant activity on process temperature was illustrated in Fig. 4. The 95% confidence intervals of the average response were shown by the blue dashed lines. Limits of the design space were shown by the black squares at the ends of the charts. The design (central) points utilized to validate the mathematical model were represented by the red-filled circles.*

A multivariable analysis of variance was carried out based on the analytical results, and the findings showed that the process temperature was the only factor influencing the antioxidant activity. A second-order equation defined the relationship between temperature and antioxidant activity. Up to 123.2°C, antioxidant activity increased with increasing temperature; after that decreased. Changes in process time and reactor shape did not appear to have an impact on antioxidant activity. An Anova analysis was shown in detail in Table 6.

The F-value of 13.66 indicates the significance of the model. An F-value this high is only 0.05% likely to be the result of noise. The model terms are significant if the p-value is less than 0.05. In this particular case, one important model term is the temperature. The 3.52 lack-of-fit F-value indicates the lack of fit does not seem to be significant when considering the pure error. The adjusted R² of 0.6127 and the predicted R² of 0.5142 exhibits a respectable degree of agreement. Adequate precision,

Table 6. Anova analysis for antioxidant activity

Tabela 6. Wyniki analizy Anova dla aktywności antyoksydacyjnej

Parameter/Parametr	Sum of squares/ Suma kwadratów	df/ Stopnie swobody	Mean square/ Średni kwadrat	F-Value/ F-Wartość	p-Value/ p-Wartość	
Model	$8.000 \cdot 10^5$	2	$4.000 \cdot 10^5$	13.66	0.0005	significant/ znaczące
A – Temperature / Temperatura	$3.625 \cdot 10^5$	1	$3.625 \cdot 10^5$	12.38	0.0034	
A ² – Temperature ² / Temperatura ²	$4.375 \cdot 10^5$	1	$4.375 \cdot 10^5$	14.94	0.0017	
Residual/ Pozostałość	$4.100 \cdot 10^5$	14	29.287.95			
Lack of fit/ Brak dopasowania	$3.682 \cdot 10^5$	10	36.824.25	3.52	0.1181	not significant/ nieznaczące
Pure error/ Błąd	41.788.80	4	10.447.20			
Cor total/ Skory- gowana całkowita suma kwadratów	$1.210 \cdot 10^6$	16				
Fit statistics/ Statystyki dopasowania			R ²	0.6611		
Std. dev./ Odchylenie standardowe	171.14		adjusted R ² / skorygowany R ²	0.6127		
Mean/ Średnia	1.833.53		predicted R ² / przewidywany R ²	0.5142		
C.V. %	9.33		adequate precision/ odpowiednia precyzja	7.4317		

Na podstawie wyników oznaczeń analitycznych przeprowadzono wielowariantową analizę wariancji, a jej wyniki wykazały, że temperatura procesu była jedynym czynnikiem wpływającym na aktywność antyoksydacyjną. Równanie drugiego rzędu zdefiniowało zależność między temperaturą a aktywnością antyoksydacyjną. Do 123,2°C aktywność antyoksydacyjna wzrastała wraz ze wzrostem temperatury, a następnie spadała. Zmiany czasu trwania procesu i kształtu reaktora nie miały wpływu na aktywność antyoksydacyjną. Wyniki analizy Anova szczegółowo podano w tabeli 6.

Wartość F wynosząca 13,66 wskazała na istotność modelu. Prawdopodobieństwo, że tak wysoka wartość F jest wynikiem szumu wynosiło zaledwie 0,05%. Warunki modelu są znaczące, jeśli wartość p jest mniejsza niż 0,05. W tym konkretnym przypadku jedynym istotnym parametrem modelu była temperatura. Wartość F braku dopasowania wynosząca 3,52 wskazała, że brak dopasowania nie wydawał się znaczący, biorąc pod uwagę błąd. Skorygowany R^2 wynoszący 0,6127 i przewidywany R^2 wynoszący 0,5142 wykazały znaczny stopień zgodności. Odpowiednia precyzja, czyli stosunek sygnału do szumu, pokazała, że sygnał był prawidłowy, z wartością 7,4317.

which was the signal-to-noise ratio, showed that the signal was appropriate with a value of 7.4317. The resultant model could be used to explore the studied area and was statistically significant.

Equation (6) was used to compute the antioxidant activity:

$$AC_{DPPH} = -0.803507T^2 + 198.26806T - 10210.80208 \quad (6)$$

where: AC_{DPPH} antioxidant activity ($10^{-6} M(TE)/g(DE)$), T means temperature, °C.

There were currently no studies on the antioxidant activity of subcritical water extracts in relation to temperature for oak (*Quercus robur* L.) bark. TPC in the extracts from acorn of *Quercus branti* L. using methanol as a solvent was 22.64 mg(GAE)/100 g of extract¹⁷⁾, whereas Ferreira et al.¹⁸⁾ using acorn of *Quercus ilex* L. and acetone as a solvent reported 928 mg(GAE)/100g and antioxidant activity measured using DPPH radicals 51.87 $\mu M(TE)/g(DE)$. Subcritical water extracts from the bark of walnut (*Juglans regia* L.) and norway maple (*Acer platanoides* L.) achieved antioxidant activity as follows: 21.3 $\mu M(TE)/g$ (dry raw material mass) and 16.24 $\mu M(TE)/g$ (dry raw material mass)^{34, 35)}.

Table 7. The criteria used for the optimization process

Tabela 7. Kryteria stosowane w procesie optymalizacji

Process parameters/ Parametry procesu	Lower limit/ Dolny limit	Upper limit/ Górny limit	Goals/ Cele
Temperature of the process/ Temperatura procesu, °C	110	150	was in range/ była w zakresie
Optimization parameters/ Parametry optymalizacji	Unit/Jednostka		lower limit/ dolny limit
TPC	mg(GAE)/1 g(DE)		maximize/ maksymalizacja
TFC	mg(CE)/1 g(DE)		maximize/ maksymalizacja
Antioxidant activity/ Aktywność antyoksydacyjna	10 ⁻⁶ M(TE)/1 g(DE)		maximize/ maksymalizacja

Wynikowy model mógł być wykorzystany do zbadania badanego obszaru i jest statystycznie istotny.

Do wyznaczania aktywności antyoksydacyjnej użyto równania (6):

$$AC_{DPPH} = -0,803507T^2 + 198,26806T - 10210,80208 \quad (6)$$

w którym AC_{DPPH} oznacza aktywność antyoksydacyjną (10⁻⁶ M(TE)/g(DE)), a T temperaturę, °C.

Obecnie nie ma badań dotyczących aktywności antyoksydacyjnej w podkrytycznych ekstraktach wodnych w zależności od temperatury dla kory dębu (*Quercus robur* L.). TPC w ekstraktach z żółodzi *Quercus branti* L. otrzymanych przy użyciu metanolu jako rozpuszczalnika wynosiło 22,64 mg(GAE)/100 g ekstraktu¹⁷⁾, podczas gdy Ferreira i współpr.¹⁸⁾ przy użyciu żółodzi *Quercus ilex* L. i acetonu jako rozpuszczalnika odnotowali wartość 928 mg(GAE)/100g i aktywność antyoksydacyjną mierzoną przy użyciu rodników DPPH 51,87 μM(TE)/g(DE). Podkrytyczne ekstrakty wodne uzyskane z kory orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) i klonu pospolitego (*Acer platanoides* L.) osiągnęły aktywność antyoksydacyjną odpowiednio: 192.2 mg(GAE)/100 g (sucha masa surowca) oraz 943 mg(GAE)/100 g (sucha masa surowca)^{34, 35)}.

Według niniejszego badania aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z kory pnia *Quercus robur* L. wahała się w granicach 1313–2201 μM(TE)/g(DE) (113,5–117,3 μM(TE)/g suchej masy surowca), w zależności od temperatury. Aktywność antyoksydacyjna otrzymanych ekstraktów była 5,4 razy większa niż działanie ekstraktów z orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.)³⁴⁾ i 7,1 razy większa w odniesieniu do klonu pospolitego³⁵⁾. W tym przypadku na aktywność antyoksydacyjną duży wpływ miały zmiany temperatury. Zmiany kształtu komory ciśnieniowej i czasu trwania procesu nie miały wpływu na aktywność antyoksydacyjną.

Table 8. Maximum values of optimization parameters with associated temperature of solvent

Tabela 8. Maksymalne wartości parametrów optymalizacji w powiązaniu z temperaturą rozpuszczalnika

Optimization parameter/ Parametr optymalizacji	Unit/ Jednostka	Maximum value/ Maksymalna wartość	Process temperature/ Temperatura procesu, °C
TPC	mg(GAE)/ 1 g(DE)	381.9	117.2
TFC	mg(CE)/ 1 g(DE)	184.9	116.5
Antioxidant activity/ Aktywność antyoksydacyjna	10 ⁻⁶ M(TE)/ 1 g(DE)	2201	123.2

According to this study, the antioxidant activity of extracts from oak (*Quercus robur* L.) trunk bark ranged from 1313 to 2201 μM(TE)/g(DE) (from 113.5 to 117.3 μM(TE)/g of dry raw material mass) depending on the temperature. The antioxidant activity of obtained extracts was 5.4 times higher with regard to walnut (*Juglans regia* L.)³⁴⁾ and 7.1 times higher with regard to norway maple (*Acer platanoides* L.)³⁵⁾. In this case, antioxidant activity was highly affected by temperature variation. Changes in the pressure cell shape and process duration did not appear to have an impact on antioxidant activity.

Optimization of process parameters

Optimization of process parameters was performed based on obtained analytical results of extract quality. Considering that the quality of the extract was not found to be dependent on the reactor diameter and process duration, only the temperature of the process was optimized to maximize the TPC, total flavonoids content, and antioxidant activity of the obtained extracts. The criteria used for the optimization process were presented in Table 7.

Optimization of the extraction process parameters carried out based on the criteria presented above allowed to determine the maximum values of the TPC, TFC, and antioxidant activity along with the corresponding process temperatures. The optimization results were presented in Table 8.

Design of extraction cell

The results of research work previously conducted on the bark of norway maple (*Acer platanoides* L.)³⁵⁾ and this research work indicated that changes in the extractor shape did not have an impact on the TPC, TFC, and antioxidant activity. Therefore, the design of extraction vessels for the water extraction process in subcritical conditions should be based on assumptions taking into account the problems of mechanical strength, stability, and ergonomics. The proposition of extractor design with a volume of 40 L was presented in Fig. 5.

Optimalizacja parametrów procesu

Optymalizację parametrów procesu przeprowadzono, wykorzystując uzyskane wyniki analityczne jakości ekstraktu. Biorąc pod uwagę, że jakość ekstraktu nie była zależna od średnicy reaktora i czasu trwania procesu, zoptymalizowano tylko temperaturę procesu, aby zmaksymalizować TPC, TFC i aktywność antyoksydacyjną uzyskanych ekstraktów. Kryteria zastosowane w procesie optymalizacji zostały przedstawione w tabeli 7.

Optymalizacja parametrów procesu ekstrakcji przeprowadzona z wykorzystaniem przedstawionych kryteriów pozwoliła na określenie maksymalnych wartości TPC, TFC i aktywności antyoksydacyjnej wraz z odpowiednimi temperaturami procesu. Wyniki optymalizacji zestawiono w tabeli 8.

Konstrukcja komory ekstrakcyjnej

Wyniki prac badawczych przeprowadzonych wcześniej na korze klonu pospolitego (*Acer platanoides* L.)³⁵⁾ i niniejszej pracy badawczej wykazały, że zmiany kształtu ekstraktora nie miały wpływu na TPC, TFC i aktywność antyoksydacyjną. Dlatego też projektowanie zbiorników ekstrakcyjnych do procesu ekstrakcji wodą w warunkach podkrytycznych powinno opierać się na założeniach uwzględniających problemy wytrzymałości mechanicznej, stabilności i ergonomii. Propozycję konstrukcji ekstraktora o pojemności 40 L przedstawiono na rys. 5.

Ekstraktor został wyposażony w górną i dolną pokrywę wraz z wymiennymi uszczelkami i filtrami. Filtry zostały zastosowane w celu ochrony przed przedostawaniem się surowca do systemów napełniania, zwiększania ciśnienia i opróżniania jednostki ekstrakcyjnej. Konstrukcja górnej i dolnej pokrywy, wraz ze stosunkowo niewielką długością ekstraktora, pozwala na wygodny załadunek i rozładunek ekstrahowanego surowca. Komora ciśnieniowa została wyposażona w płaszcz grzewczy zasilany olejem z zewnętrznego systemu ogrzewania i kontroli temperatury. Przyłącza górnej i dolnej pokrywy wyposażone w półautomatyczne szybkozłącza zostały wykorzystane do napełniania, opróżniania, odgazowywania ekstraktora i kontroli ciśnienia. Zbiornik ekstraktora powinien być zaprojektowany dla ciśnień chroniących system przed wrzeniem wody. Dodatkowo zastosowanie obrotowych sworzni w połowie długości ekstraktora oraz elastycznych połączeń oleju grzewczego pozwoli na obrót ekstraktora do pozycji poziomej, co znacznie ułatwi załadunek i rozładunek surowca do ekstrakcji oraz zapewni czystość. Jest to szczególnie ważne w przypadku zastosowań w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym.

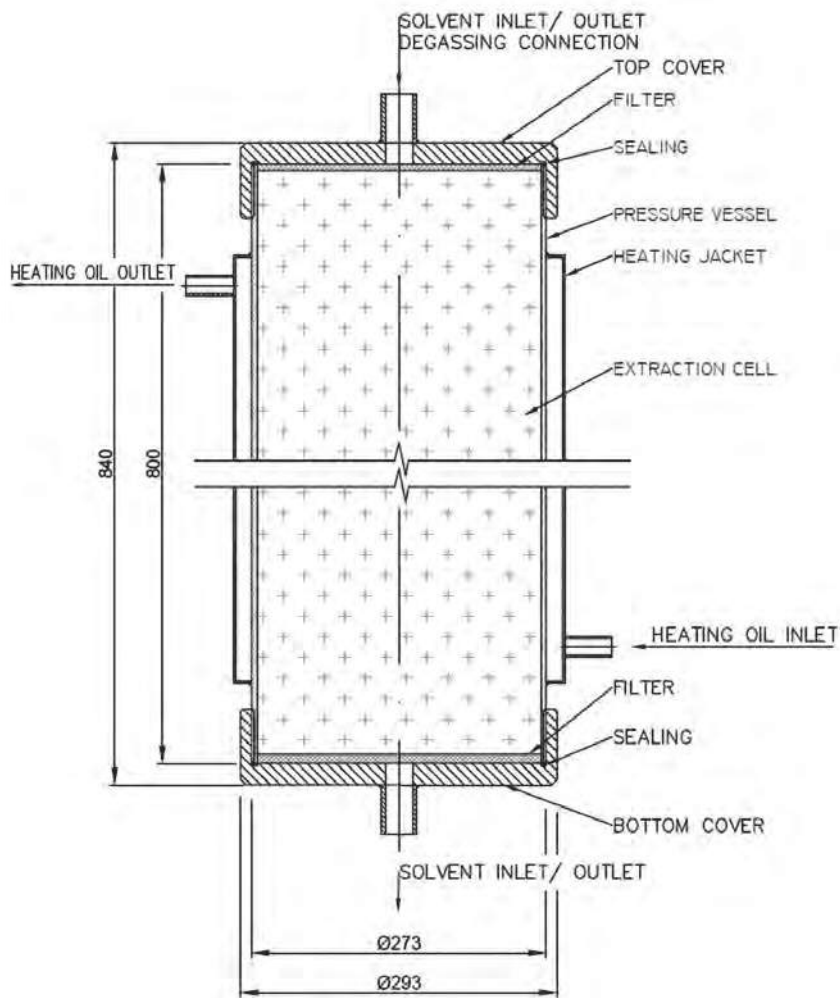


Fig. 5. Extraction cell for subcritical water extraction process

Rys. 5. Komora ekstrakcyjna do procesu ekstrakcji wodą w stanie podkrytycznym

The extractor was equipped with top and bottom covers including replaceable seals and filters. The filters were used to protect against the ingress of the raw material into the filling, pressurization, and emptying systems of the extraction unit. The design of the top and bottom covers, together with the relatively short length of the extractor, allowed for comfortable loading and unloading of the extracted raw material. The pressure cell was equipped with a heating jacket supplied with oil from an external heating and temperature control system. Top and bottom cover connections equipped with semi-automatic quick couplings were used for filling, emptying, degassing the extractor, and pressure control. The extractor vessel should be designed for the pressures protecting the system against water vaporization. The additional use of rotary pivots in the middle of the extractor length and flexible connections of the heating oil will allowed to rotate extractor to the horizontal position, which would significantly facilitate the loading and unloading of the raw material for extraction and ensure cleanliness. This was particularly important for applications in the food, cosmetics, and pharmaceutical industries.

Zawartość polifenoli, flawonoidów i aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z kory dębu (*Quercus robur* L.) określono przy użyciu metodologii Boksa i Behnkena. Jako zmienne procesowe badano parametry ekstrakcji wodą w stanie podkrytycznym, takie jak temperatura, czas trwania procesu i kształt ekstraktora. Całkowita ilość polifenoli i flawonoidów, a także aktywność antyoksydacyjna uzyskanych ekstraktów były znacząco zależne od temperatury procesu. Zależności te zostały wyrażone jako równania drugiego rzędu. Zmiany kształtu komory ciśnieniowej i czasu trwania procesu nie miały wpływu na jakość ekstraktu. Całkowita zawartość polifenoli, flawonoidów i aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z kory *Quercus robur* L. osiągnęły maksymalne wartości (określone przez modele matematyczne), gdy temperatura procesu wynosiła $120 \pm 3,5^\circ\text{C}$.

Wyniki badania wykazały, jak ważne było staranne dobranie parametrów procesu ekstrakcji wodą w stanie podkrytycznym w celu uzyskania najlepszej możliwej jakości ekstraktu. Wpływ kształtu reaktora na jakość uzyskanego ekstraktu z kory *Quercus robur* L. nie był wcześniej badany. W przyszłych badaniach należy zastosować techniki chromatograficzne do badania poszczególnych substancji bioaktywnych w celu identyfikacji zmienności składu chemicznego ekstraktów.

The amount of polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity of bark extracts from oak (*Quercus robur* L.) were determined by using the Box-Behnken methodology. The subcritical water extraction parameters of temperature, process duration, and extractor shape were studied as process variables. The total quantity of polyphenols and flavonoids as well as the antioxidant activity of the resulting extracts were significantly influenced by the process temperature. These relationships were expressed as second-order equations. Changes in the pressure cell shape and process duration did not appear to have an impact on extract quality. The extraction of polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity from oak bark (*Quercus robur* L.) resulted in maximum values (as determined by mathematical models) when the process temperature was $120 \pm 3.5^\circ\text{C}$.

The results of the study showed how important it was to choose subcritical water extraction variables carefully to achieve the best possible extract quality. The impact of reactor shape on the obtained extract quality of oak bark (*Quercus robur* L.) has not been examined before. In future studies, chromatographic techniques should be employed to study particular bioactive substances with the aim of identifying the chemical composition variability of the extracts.

Received/Otrzymano: 10-05-2024

REFERENCES/LITERATURA

- [1] D. Treutter, *Plant Growth Regul.* 2001, **34**, 71.
- [2] S. Ruhmann, C. Leser, M. Bannert, D. Treutter, *Plant Biol.* 2002, **4**, 137.
- [3] L. Bravo, *Nutr. Rev.* 1998, **56**, 317.
- [4] S.A. Aherne, N.M. O'Brien, *Nutrition* 2002, **18**, 75.
- [5] R.N. Bennett, R.M. Wallsgrove, *New Phytol.* 1994, **127**, 617.
- [6] R.A. Dixon, N.L. Paiva, *Plant Cell* 1995, **7**, 1085.
- [7] M. Royer, P.N. Diouf, T. Stevanovic, *Food Chem. Toxicol.* 2011, **49**, 2180.
- [8] E.D. Othón-Díaz, J.O. Fimbres-García, M. Flores-Sauceda, B.A. Silva-Espinoza, L.X. López-Martínez, A.T. Bernal-Mercado, J.F. Ayala-Zavala, *Antioxidants* 2023, **12**, 861.
- [9] M. Taib, Y. Rezzak, L. Bouyazza, B. Lyoussi, *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2020, **2020**, 1920683.
- [10] C. Tanase, S. Coşarçã, D.-L. Muntean, *Molecules* 2019, **24**, 1182.
- [11] N.D. Mamphiswana, P.W. Mashela, L.K. Mdee, *Afr. J. Agric. Res.* 2010, **5**, 2570.
- [12] L.G. Yang, P.P. Yin, K. Li, H. Fan, Q. Xue, X. Li, L.W. Sun, Y.J. Liu, *Arab. J. Chem.* 2018, **11**, 14.
- [13] A. Medic, T. Zamljen, M. Hudina, R. Veberic, *Horticulturae* 2021, **7**, 326.
- [14] P.T. Tuyen, D.T. Khang, P.T. Thu Ha, T.N. Hai, A.A. Elzaawely, T.D. Xuan, *Int. Lett. Nat. Sci.* 2016, **54**, 85.
- [15] E. Valencia-Avilés, M.E. García-Pérez, M.G. Garnica-Romo, J.D.D. Figueroa-Cárdenas, E. Meléndez-Herrera, R. Salgado-Garciglia, H.E. Martínez-Flores, *Antioxidants* 2018, **7**, 81.
- [16] M.E. Alañón, L. Castro-Vázquez, M. Díaz-Maroto, I. Hermosin-Gutiérrez, M.H. Gordon, M.S. Pérez-Coello, *Food Chem.* 2011, **129**, 1584.
- [17] E.R. Nedamani, A.S. Mahoonak, M. Ghorbani, M. Kashaninejad, *J. Food Sci. Technol.* 2014, **52**, 4565.
- [18] V.C.S. Ferreira, D. Morcuende, S.H. Hernández-López, M.S. Madruga, F.A.P. Silva, M. Estévez, *J. Food Sci.* 2017, **82**, 622.
- [19] G. Lavado, L. Ladero, R. Cava, *Ind. Crop. Prod.* 2020, **160**, 113086.
- [20] T.R. Geoffroy, Y. Fortin, T. Stevanovic, *J. Wood Chem. Technol.* 2017, **37**, 261.
- [21] R. Vardanega, P.I.N. Carvalho, D.T. Santos, M. Angela, A. Meireles, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2017, **42**, 73.
- [22] N. Nastić, J. Svarc-Gajić, C. Delerue-Matos, M. Fatima Barroso, C. Soares, M.M. Moreira, S. Morais, P. Masković, V. Gaurina Srcek, I. Slivac et al., *Ind. Crops Prod.* 2018, **111**, 579.
- [23] S.A. Awaluddin, S. Thiruvenkadam, S. Izhar, Y. Hiroyuki, M.K. Danquah, R. Harun, *BioMed Res. Int.* 2016, **2016**, 5816974.
- [24] J.W. King, R.D. Grabiell, *Pat. USA* 7208181B1, 24 April 2007.
- [25] R.M. Smith, *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, **385**, 419.
- [26] H. Sahin, A. Topuz, M. Pischetsrieder, F. Ozdemir, *Eur Food Res Technol.* 2009, **230**, 155.
- [27] N. Nastić, J. Svatc-Gajić, C. Delerue-Matos, S. Morais, M. Fatima Barroso, M.M. Moreira, *J. Supercrit. Fluids* 2018, **138**, 200.
- [28] I. Rodriguez-Meizoso, L. Jaime, S. Santoyo, F.J. Senorans, A. Cifuentes, E. Ibanez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, **51**, 456.
- [29] S.M. Zakaria, S.M.M. Kamal, *Food Eng. Rev.* 2016, **8**, 23.
- [30] A. Cvetanovic, J. Svarc-Gajic, Z. Zekovic, J. Jerkocic, G. Zengin, U. Gasić, Z. Tesić, P. Masković, C. Soares, M. Fatima Barroso et al., *Food Chem.* 2019, **271**, 328.
- [31] S. Aryal, M.K. Baniya, K. Danekhu, P. Kunwar, R. Gurung, *Plants* 2019, **8**, 96.
- [32] Z. Kobus, M. Krzywicka, A. Starek-Wójcicka, A. Sagan, *Sci. Rep.* 2022, **12**, 8311.
- [33] M.S. Blois, *Nature* 1958, **181**, 1199.
- [34] P. Kamiński, K. Tyskiewicz, Z. Fekner, M. Gruba, Z. Kobus, *Appl. Sci.* 2022, **12**, 12490.
- [35] P. Kamiński, M. Gruba, Z. Fekner, K. Tyśkiewicz, Z. Kobus, *Processes* 2023, **11**, 3395.
- [36] A. Gupta, T. Behl, *Obes. Med.* 2019, **16**, 100142.

OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI

Oświadczamy, że w pracy autorstwa Kamiński P., Tyśkiewicz K., Fekner Z., Gruba M., Kobus Z., pt. "The Influence of Subcritical Water Extraction Parameters on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Walnut (*Juglans regia* L.) Bark Extracts" opublikowanej w czasopiśmie Applied Sciences 2022, 12, 12490, (100 pkt. MNiSW), wkład poszczególnych autorów w powstanie pracy wyniósł:

Kamiński Piotr 60%

Piotr Kamiński

Podpis autora

Tyśkiewicz Katarzyna 10%

Katarzyna Tyśkiewicz

Podpis autora

Fekner Zygmunt 10%

Zygmunt Fekner

Podpis autora

Gruba Marcin 10%

Marcin Gruba

Podpis autora

Kobus Zbigniew 10%

Zbigniew Kobus

Podpis autora

Oświadczamy, że w pracy autorstwa Kamiński P., Gruba M., Fekner Z., Tyśkiewicz K., Kobus Z., pt. „*The Influence of Water Extraction Parameters in Subcritical Conditions and the Shape of the Reactor on the Quality of Extracts Obtained from Norway Maple (Acer platanoides L.)*” opublikowanej w czasopiśmie Processes 2023, 11, 3395, (100 pkt. MNiSW) wkład poszczególnych autorów w powstanie pracy wyniósł:

Kamiński Piotr 60%

Piotr Kamiński

Podpis autora

Gruba Marcin 10%

Marcin Gruba

Podpis autora

Fekner Zygmunt 10%

Zygmunt Fekner

Podpis autora

Tyśkiewicz Katarzyna 10%

Katarzyna Tyśkiewicz

Podpis autora

Kobus Zbigniew 10%

Zbigniew Kobus

Podpis autora

Oświadczamy, że w pracy autorstwa Kamiński P., Tyśkiewicz K., Fekner Z., Kobus Z., Gruba M., pt. „*The effect of reactor design and water extraction parameters under subcritical conditions on the quality of extracts from oak bark (Quercus robur L.)*” opublikowanej w czasopiśmie Przemysł Chemiczny 103/6 (2024), 695-710, (70 pkt. MNiSW) wkład poszczególnych autorów w powstanie pracy wyniósł:

Kamiński Piotr 60%



Podpis autora

Tyśkiewicz Katarzyna 10%



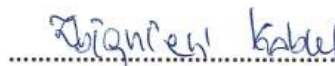
Podpis autora

Fekner Zygmunt 10%



Podpis autora

Kobus Zbigniew 10%



Podpis autora

Gruba Marcin 10%



Podpis autora