

# Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji hesperidina iz kora mandarina

---

Kolarević, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2020

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:254471>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Filip Kolarević**

**PRIMJENA EUTEKTIČKIH OTAPALA U EKSTRAKCIJI HESPERIDINA IZ KORA**  
**MANDARINA**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, svibanj, 2020.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek Zavod za  
procesno inženjerstvo  
Katedra za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Nastavni predmet:** Tehnološko projektiranje/Opća i analitička kemija

**Tema rada** je prihvaćena na XI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 18. rujna 2018. godine.

**Mentor:** prof. dr. sc. *Stela Jokić*

**Komentor:** izv. prof. dr. sc. *Maja Molnar*

**Pomoć pri izradi:** *Martina Jakovljević*, mag. nutr.

*Ana-Marija Cikoš*, mag. ing.

**Primjena eutektičkih otapala u ekstrakciji hesperidina iz kora mandarina**

*Filip Kolarević*, 422-DI

**Sažetak:**

U zadnjih se nekoliko godina pojavila nova generacija otapala, eutektičkih otapala (DES) i pokazala su se kao pogodna i vrlo učinkovita u ekstrakciji različitih visokovrijednih bioaktivnih komponenti iz biljnih materijala. Ove vrste otapala predstavljaju zelene i održive smjese netoksičnih jeftinih komponenata kombiniranih zajedno u obliku eutektičke smjese. S ciljem odabira idealnog DES-a za određenu ekstrakciju, veliki broj karakteristika otapala se mora uzeti u obzir, uključujući njegov sastav, viskoznost, polarnost itd. U ovom radu korišteno je 15 različitih eutektičkih otapala na bazi kolin klorida za ekstrakciju hesperidina iz kora mandarina različitih sorti (*Zorica rana*, *Chahara*, *Okitsu* i *Kuno*). U tako dobivenim ekstraktima određivao se udio hesperidina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Otapalo kolin klorid:acetamid (1:2) pokazalo se kao najučinkovitije u procesu ekstrakcije ciljane komponente.

Nadalje, provedena je optimizacija postupka ekstrakcije za svaku pojedinu sortu mandarina, a vezano za udio hesperidina u ekstraktima, primjenom metode odzivnih površina na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnken-ovom planu pokusa. Dobiveni rezultati pokazuju da sadržaj hesperidina u korama mandarina razlikuje se u ovisnosti o odabranoj sorti mandarina.

**Ključne riječi:** Nusproizvod, kore mandarina, eutektička otapala, hesperidin, optimizacija

**Rad sadrži:** 54 stranice

15 slika

8 tablica

80 literaturnih referenci

1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

1. prof. dr. sc. *Lidija Jakobek Barron*

predsjednik

2. prof. dr. sc. *Stela Jokić*

član-mentor

3. izv. prof. dr. sc. *Maja Molnar*

član-komentor

4. prof. dr. sc. *Darko Velić*

zamjena člana

**Datum obrane:** 15. svibanj 2020.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Process Engineering  
Subdepartment of Process Design and Construction Materials  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Technological Design/Analytical Chemistry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. XI held on 18th September 2018.

Mentor: *Stela Jokić*, PhD, full prof.

Co-Mentor: *Maja Molnar*, PhD, associate prof.

Technical assistance: *Martina Jakovljević*, mag. nutr.

*Ana-Marija Cikoš*, mag. ing.

An application of deep eutectic solvents in extraction of hesperidin from mandarin peels

*Filip Kolarević*, 422-DI

### Summary:

In the last couple of years, a new generation of solvents has emerged-deep eutectic solvents (DES). They showed to be an appropriate and effective solvents in the extraction of various bioactive components from plant-based materials. These types of solvents represent eco-friendly and sustainable mixtures of non-toxic, cheap components mixed in form of eutectic blend. When picking the right DES for certain kind of extraction, many characteristics of solvent must be considered (composition, viscosity, polarity etc.). In this thesis, 15 different choline chloride based DES were used for the extraction of hesperidin from mandarin peels of different varieties (*Zorica rana*, *Chahara*, *Okitsu* and *Kuno*). The obtained extracts were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) to determine the hesperidin amounts. Choline chloride:acetamide (1:2) provided the most efficient hesperidin extraction. Furthermore, extraction process was optimized for each variety of mandarin peel. Optimized set of parameters and their impact on hesperidin yield were determined using response surface methodology. These parameters were obtained according to the Box-Behnken experiment design. The results indicated that hesperidin content in mandarin peels was completely variety-dependent.

**Key words:** by-product, mandarin peel, deep eutectic solvents, hesperidin, optimization

**Thesis contains:** 54 pages  
15 figures  
8 tables  
80 references  
1 supplement

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |                                                   |               |
|---------------------------------------------------|---------------|
| 1. <i>Lidija Jakobek Barron</i> , PhD, full prof. | chair person  |
| 2. <i>Stela Jokić</i> , PhD, full prof.           | supervisor    |
| 3. <i>Maja Molnar</i> , PhD, associate prof.      | co-supervisor |
| 4. <i>Darko Velić</i> , PhD, full prof.           | stand-in      |

**Defense date:** 15th May 2020

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Steli Jokić što mi je omogućila priliku da sudjelujem svojim radom na ovako zanimljivoj temi te što mi je omogućila realizaciju diplomskog rada. Zahvaljujem se komentorici prof. dr. sc. Maji Molnar, Martini Jakovljević, mag. nutr., te Ana-Mariji Cikoš, mag.ing., na pomoći pri izradi rada.*

*Također, zahvaljujem se cijeloj obitelji te prijateljima koji su mi bili konstantna podrška tijekom cijelog studiranja.*

*Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom „Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda biljnoga podrijetla“ (UIP-2017-05-9909).*

## Sadržaj

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD.....                                                                                         | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO .....                                                                               | 5  |
| 2.1. MANDARINA.....                                                                                  | 6  |
| 2.1.1. Kemijski sastav kora mandarine .....                                                          | 6  |
| 2.1.2. Hesperidin .....                                                                              | 7  |
| 2.1.3. Prerada mandarina.....                                                                        | 9  |
| 2.2. EKSTRAKCIJA.....                                                                                | 10 |
| 2.2.1. Svojstva eutektičkih otapala.....                                                             | 11 |
| 2.2.1.1. Točka tališta.....                                                                          | 12 |
| 2.2.1.2. Gustoća.....                                                                                | 13 |
| 2.2.1.3. Viskoznost .....                                                                            | 14 |
| 2.2.2. Vrste eutektičkih otapala .....                                                               | 16 |
| 2.3. KROMATOGRAFSKE METODE.....                                                                      | 17 |
| 2.3.1. Visoko tlačna tekućinska kromatografija .....                                                 | 19 |
| 2.4. OPTIMIRANJE PROCESNIH PARAMETARA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA .....                                | 21 |
| 2.4.1. Box-Behnken-ov plan pokusa .....                                                              | 24 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....                                                                         | 26 |
| 3.1. ZADATAK .....                                                                                   | 27 |
| 3.2. MATERIJALI.....                                                                                 | 27 |
| 3.2.1. Sorte mandarina.....                                                                          | 27 |
| 3.2.2. Kemikalije .....                                                                              | 28 |
| 3.3. METODE .....                                                                                    | 28 |
| 3.3.1. Priprava eutektičkih otapala .....                                                            | 28 |
| 3.3.2. Ekstrakcija hesperidina iz kora mandarina pomoću eutektičkih otapala .....                    | 29 |
| 3.3.3. Priprema uzoraka za analizu visoko tlačnom tekućinskom kromatografijom .....                  | 29 |
| 3.3.4. Određivanje hesperidina na HPLC sustavu.....                                                  | 30 |
| 3.3.5. Optimiranje procesa ekstrakcije eutektičkim otapalima primjenom metode odzivnih površina..... | 30 |
| 4. REZULTATI .....                                                                                   | 32 |
| 5. RASPRAVA .....                                                                                    | 40 |
| 6. ZAKLJUČCI.....                                                                                    | 44 |
| 7. LITERATURA.....                                                                                   | 46 |

### Popis oznaka, kratica i simbola

HPLC – visoko tlačna tekućinska kromatografija (*engl.* High-performance liquid chromatography)

ChCl – kolin klorid

RSM – metoda odzivnih površina (*engl.* Response surface methodology)

ANOVA – analiza varijance (*engl.* Analysis of variance)

y - odzivna funkcija zadana modelom

$\beta_0$  – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma

$\beta_i$  – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

$\beta_{ii}$  – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

$\beta_{ij}$  – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

$x_{i,j}$  – ispitivane nezavisne varijable

k – broj faktora

$C_0$  – broj centralnih točaka

AA – acetamid

BDO – butan-1,4-diol

CiA – limunska kiselina

EG – etilen glikol

GL – glicerol

Lac – mliječna kiselina

LeA – levulinska kiselina

Mac – malonska kiselina

Mal – jabučna kiselina

NMeU – N-metil urea

OxA – oksalna kiselina

Sor – sorbitol

ThU – tiourea

U – urea

Xyl - ksilitol

## **1. UVOD**

Agrumi su jedni od najbitnijih usjeva u svjetskoj proizvodnji hrane, dok odlaganje nusprodukata agruma predstavlja problem zbog rizika onečišćenja okoliša. Tradicionalno, taj otpad se spaljivao što uzrokuje povećanje ugljikovog dioksida i ostalih stakleničkih plinova ili se koristio za ishranu stoke, no u današnje vrijeme postoje metode za dobivanje visoko kvalitetnih produkata koje su ekološki prihvatljivije. Nusprodukti agruma uključuju pulpu, sjemenke i koru. Sjemenke se smatraju vrijednim nusproduktom, kao i kore, zbog toga što sadrže prirodne antioksidanse, naročito flavonoide (Moulehi i sur., 2012). Kore čine najveći udio nastalih nusprodukata agruma te se mogu iskoristiti u skladu sa sadržajem bioaktivnih komponenti (Mamma i Christakopolous, 2014).

S obzirom na raznolikost sorti i vrsta agruma, sadržaj komponenata u sastavu voća može varirati. Geografsko porijeklo i vrijeme branja voća također može utjecati na sastav. Prema tome, flavonoidi mogu biti indikatori određenih karakteristika pojedinih vrsta agruma (Lu i sur., 2006). Spojevi pronađeni u korama mandarina, poput flavonoidnih glikozida i polimetoksi flavona uvelike pridonose biološkoj aktivnosti kora (Huang i Ho, 2010), dok je hesperidin glavna funkcionalna komponenta i flavonoid kojega količinski ima najviše (Tumbas i sur., 2010). Istraživanja su pokazala da može djelovati hipoglikemijski (Jung i sur., 2004), ima antioksidacijski potencijal, protuupalno djeluje (Guardia i sur., 2001) te ima citotoksični efekt na stanice raka (Al-Ashaal i Sheltawy, 2011). Osim navedenih, hesperidin pokazuje i brojne druge pozitivne zdravstvene učinke ispitane u radu Garg i sur. (2011)

S obzirom da se različiti procesi mogu upotrijebiti u svrhu ekstrakcije bioaktivnih tvari iz agruma, vrlo je važno odabrati najefikasniju metodu ekstrakcije koja će omogućiti najveći mogući prinos odabrane bioaktivne komponente. Međutim, količina ekstrahirane bioaktivne tvari može varirati ovisno o primijenjenoj metodi i uvjetima u kojima se proces odvija. Pojedine metode ekstrakcije zahtijevaju upotrebu toksičnih i ekološki neprihvatljivih organskih otapala. Neki autori (Ma i sur., 2008; Safdar i sur., 2016) su istraživali ekstrakciju hesperidina i drugih flavonoida iz kora mandarina pomoću izopropanola, etanola i metanola, gdje je etanol preferiran za upotrebu u procesima prerade hrane jer je kategoriziran kao GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*). Iako se organska otapala mogu primjenjivati za ekstrakciju pojedinih tvari, njihova primjena u

prehrambenoj industriji je neprihvatljiva radi njihove toksičnosti i štetnog učinka na okoliš. Stoga bi se trebala primjenjivati otapala i metode koje su ekološki prihvatljivije. U posljednjih nekoliko godina, eutektička otapala pokazala su se kao vrlo efikasan medij u postupcima ekstrakcije spojeva iz raznih biljnih materijala. Karakteriziraju se kao zelena, netoksična i jeftina otapala koje formiraju akceptori vodikove veze u kombinaciji sa donorima vodikove veze. U eutektičkim smjesama, akceptori vodikove veze su kvarterne amonijeve ili metalne soli, dok donori vodikove veze mogu biti amidi, karboksilne kiseline, alkoholi ili šećeri. Miješanjem donora vodika i akceptora vodika u određenom molarnom omjeru, dobiju se eutektička otapala željenih svojstava (Dai i sur., 2013). U nedavnim su istraživanjima eutektička otapala korištena za ekstrakciju flavonoida iz različitih vrsta voća, povrća i začina (Bajkacz i Adamek, 2018), kao i gorkih naranči (Liu i sur., 2018) te narančinih kora (Van den Bruinhorst i sur., 2016). U tim istraživanjima proučavao se utjecaj količine dodane vode, omjer krute i tekuće tvari, utjecaj vremena, temperature i brzine miješanja na količinu i sastav ekstrahiranih flavonoida. Prema rezultatima, eutektička otapala pokazala su se efikasnijim od tradicionalnih otapala u smislu većeg prinosa ekstrakcije te povećanju topljivosti aktivnih komponenti.

Cilj ovoga rada bio je dobiti ekstrakte bogate hesperidinom iz kora mandarina kultivara *Citrus reticulata* Blanco. Korištene su četiri hrvatske sorte uključujući *Zorica rana*, *Chahara*, *Okitsu* i *Kuno*. *Citrus reticulata* Blanco kultivar je specifičan po najvećoj botaničkoj varijabilnosti (Lota i sur., 2000). Ekstrakcija je provedena s 15 različitih eutektičkih otapala u kojima je akceptor vodikove veze bio kolin klorid, dok su donori vodikove veze bili spojevi poput uree, acetamida, butan-1,4-diola, glicerola, limunske kiseline, jabučne kiseline, sorbitola, ksilitola, oksalne kiseline, levulinske kiseline, etilen glikola, malonske kiseline, tiouree, N-metil uree i mliječne kiseline. Nakon analize kojom se odredilo najprikladnije eutektičko otapalo za ekstrakciju najveće moguće količine hesperidina pomoću visoko tlačne tekućinske kromatografije (HPLC), određeni su optimalni uvjeti za ekstrakciju hesperidina pomoću metode odzivnih površina. Određen je utjecaj temperature (30, 50 i 70°C), vremena ekstrakcije (30, 60 i 90 min) i količine dodane vode u otapalo (10, 20 i 30 %) na količinu hesperidina dobivenu u ekstraktima koristeći kolin klorid:acetamid kao najprikladnije eutektičko otapalo. Ovaj rad je prvo istraživanje u kojem su eutektička otapala korištena za ekstrakciju hesperidina iz četiri

različite hrvatske sorte mandarina. Nadalje, utvrđeno je otapalo koje daje najveće iskorištenje hesperidina ekstrahiranog iz kore mandarina te su utvrđeni optimalni parametri procesa ekstrakcije.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. MANDARINA

Mandarina (lat. *Citrus reticulata* Blanco) je biljka iz porodice *Rutaceae*, a pripada rodu *Citrus*. Uzgajaju se u subtropskim krajevima tj. zemljama s umjerenim ljetima i blagim zimama, posebice u zemljama mediterana, Japanu, Brazilu, Argentini, SAD-u i Australiji te zajedno s narančama, prevladavaju na tržištu svježeg voća. Sorte mandarina su mnogobrojne što rezultira velikom raznolikošću morfoloških i hortikulturoloških karakteristika (oblik, obujam i boja voća, stupanj prijanjanja kore za plod, zrelost, okus i miris itd.). U Hrvatskoj, mandarina najbolje uspijeva u dolini Neretve gdje su uvjeti odlični za plantažni uzgoj (Batinović, 2011).

Zbog navedene raznolikosti, mandarine je problematično kategorizirati. Prema Praloranu (1971), sve sorte spadaju u *Citrus reticulata* dok Tanaka (1961) kategorizira mandarine u više od 30 različitih vrsta. Među njima, najpoznatije su *Citrus unshiu*, *Citrus deliciosa*, *Citrus nobilis* te najpoznatija *Citrus reticulata* Blanco.

Mandarine se uzgajaju i konzumiraju na globalnoj razini radi gospodarskog značaja i blagotvornih utjecaja na ljudsko zdravlje. Pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje može se pripisati prisustvom mikronutrijenata poput vitamina C, A, folne kiseline, vlakana, kalija, kalcija koji pomažu u sintezi kolagena u tijelu, djeluju antioksidativno, pridonose sprječavanju artritisa, gripe te neurodegenerativnih bolesti (Rafiq i sur., 2016).

### 2.1.1 Kemijski sastav kora mandarine

U prehrambenoj industriji, kora mandarina se najčešće ne iskorištava te se obično baca iako je bogata mikronutrijentima koji su iskoristivi u razne svrhe. Baca se iz razloga povećanja troškova, ako bi se nusprodukti obrade mandarine dodatno zbrinjavali.

Prema Ajila i sur. (2007), kora mandarine je potencijalni izvor bioaktivnih spojeva poput vitamina, karotenoida i polifenola, među koje spada i hesperidin. Navedeni spojevi pokazuju antioksidativna, protuupalna i antialergijska djelovanja.

Kora mandarine bogata je topivim prehrambenim vlaknima i značajnim količinama pektina koji se može primjenjivati kao prehrambeni aditiv (Putnik i sur., 2017).

Mineralni sastav kore mandarine je karakteriziran visokim udjelima mikronutrijenata,

posebice željeza. Željeza ima dvostruko više u kori nego u samom plodu. Zbog značajnog sadržaja dušika, fosfora, kalcija, kalija i pektina (4-6 %), kora mandarine se može koristiti i za izolaciju navedenih minerala te pektina (Bakarić, 1983).

Bitan dio kemijskog sastava kora mandarine čine i eterična ulja. Izolirani spojevi iz ulja su metal-N-metil antranilat i timol koji su nosioci okusa i arome mandarine. Ulje kore sadrži u manjim količinama i druge spojeve poput dekanala, oktanala, etanola i acetaldehida koji također pridonose specifičnoj aromi voća (Mazza, 1987).

U **Tablici 1** prikazan je kemijski sastav ploda i kore mandarine izražene na 100 g svježe mase (Kimball, 1996).

**Tablica 1** Kemijski sastav ploda i kore mandarine (g/100 g svježe mase)

| Sastojak       | Plod | Kora |
|----------------|------|------|
| Voda           | 86,7 | 78   |
| Proteini       | 0,7  | 1    |
| Lipidi         | 0,3  | 2,3  |
| Ugljikohidrati | 10,1 | 2,6  |
| Minerali       | 0,7  | 1,3  |

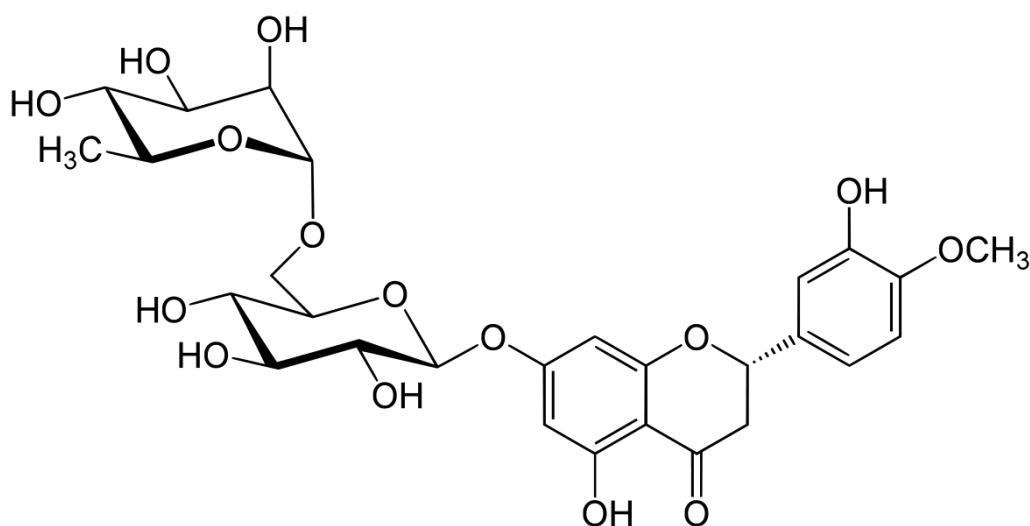
### 2.1.2. Hesperidin

Hesperidin je flavanonski glikozid koji se u većim količinama može pronaći u citrusnom voću poput naranči i limuna te pokazuje širok spektar bioloških djelovanja. Jedan je od i najbitnijih bioflavonoida koje pronalazimo u biljkama roda *Citrus*. Potvrđeno je da posjeduje protuupalna i antioksidativna svojstva prema podacima prikupljenim u mnogim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima (Roohbakhsh i sur., 2014). Po novijim istraživanjima, pokazuje i antikancerogeno djelovanje (Ghorbani i sur., 2012; Roohbakhsh i sur., 2015).

Po kemijskoj strukturi, hesperidin se sastoji od svoga aglikonskog oblika hesperitina koji je vezan za rutinozu. Glikozidni dio hesperidina je disaharid koji sadrži ramnozu i glukozu te se prikazuje u dva izomerna oblika uključujući rutinozu ili neohesperidozu. Rutinoza i neohesperidoza su disaharidi koje nalazimo u biljnim izvorima. Glukoza je vezana na aglikonski dio (hesperetin), a ramnoza na glukozni dio strukture (Garg i sur., 2001). Na

**Slici 1** prikazana je kemijska struktura hesperidina.

Hesperidin nastaje procesom alkalne hidrolize floriglucina i hesperetinske kiseline, a u kiselim uvjetima hidrolize razgrađuje se na hesperetin, D-glukozu i L-ramnozu (Devi i sur., 2015).



**Slika 1** Kemijska struktura hesperidina (Devi i sur., 2015)

U ovom trenutku, opće je poznato da citrusno voće posjeduje farmakološka svojstva zahvaljujući hesperidinu. Utjecaj hesperidina na biokemijske procese u organizmu otkriva da ovaj spoj utječe na razne značajke razvoja raka kao što su stanična smrt, upale te mehanizam oksidativnog stresa. Nadalje, kemopreventivni mehanizmi hesperidina dokazano potiču apoptozu stanica raka (Ismail i sur., 2012). Protuupalni mehanizmi hesperidina smanjuju utjecaj mnogih upalnih posrednika i enzima koji sudjeluju u procesima karcinogeneze (Parhiz i sur., 2014). Također, hesperidin poboljšava antioksidativne obrambene mehanizme povećavajući količine enzimskih i neenzimskih antioksidanasa (Devi i sur., 2015).

### 2.1.3. Prerada mandarina

Svjetska proizvodnja citrusnog voća, uključujući mandarine, značajno je porasla u posljednjih nekoliko godina. Prema podacima USDA (2010), godišnje se proizvodi oko 80 milijuna tona citrusa, od čega 50 milijuna tona naranči koje su komercijalno najvažnije citrusno voće. U prehrambenoj industriji, citrusno voće se generalno prerađuje radi dobivanja soka dok se kora i sjemenke u većini slučajeva bacaju kao smeće ili se koriste kao stočna hrana, iako mogu činiti i do 50 % suhe tvari voća (Balasundram i sur., 2006). Takva praksa predstavlja trošak prerađivačkoj industriji i potencijalne ekološke probleme.

Kore citrusnog voća bogati su izvori raznih organskih komponenti poput vitamina, polifenola, flavonoida, šećera, vlakana, ulja i organskih kiselina (Putnik i sur., 2017). Od nabrojanih, najvažnije bioaktivne komponente su polifenoli i flavonoidi s obzirom na njihovo antioksidativno, antikancerogeno i antibakterijsko djelovanje (Sharma i sur., 2017). Budući da prerađivačka industrija proizvodi velike količine ovih nusprodukata, oni bi se u teoriji mogli koristiti kao obnovljivi izvori prirodnih antioksidanasa uz odgovarajuće metode ekstrakcije.

Konvencionalne metode ekstrakcije polifenolnih spojeva uključuju organska otapala poput metanola, etanola i acetona. Iako su učinkovita za ekstrakciju, organska otapala nisu idealno rješenje radi svoje toksičnosti za okoliš, visoke nestabilnosti te nemogućnosti ponovnog korištenja istih (Yara-Varon i sur., 2016). Stoga, trebaju se uzeti u obzir za okoliš prihvatljivije metode i otapala za ekstrakciju poput eutektičkih otapala.

## 2.2. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je jedan od temeljnih separacijskih procesa u pojedinim granama prehrambene industrije, kao što su proizvodnja šećera i ulja. Također se može koristiti za dobivanje raznih sastojaka iz biljnih sirovina (polifenoli, flavonoidi), proizvodnju ekstrakta kave, u proizvodnji pektina itd. Definira se kao proces izdvajanja neke tvari iz tekuće ili krute smjese prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka smjese. S obzirom na agregatno stanje dviju faza, razlikujemo ekstrakciju: čvrsto-tekuće i tekuće-tekuće.

Princip ekstrakcije sadržan je u pojavi molekulske difuzije, koju karakterizira izjednačavanje koncentracija otopljenih tvari u sustavima koji dođu u međusobni dodir, a matematički se opisuje prvim zakonom A. Ficka (1):

$$N = -D \frac{dc}{dx} \quad (1)$$

gdje  $N$  (kg/s ili kmol/s) označava brzinu prijelaza mase,  $c$  (kg/m<sup>3</sup> ili kmol/m<sup>3</sup>) masenu ili molnu koncentraciju,  $x$  (m) udaljenost, a  $D$  (m<sup>2</sup>/s) koeficijent difuzije ili difuzivnost.

Ekstrakcija otapalima je klasična ili konvencionalna metoda ekstrakcije koja je najčešće upotrebljavana tehnika izolacije polifenolnih spojeva (Ignat i sur., 2011).

S obzirom da konvencionalne metode, poput ekstrakcije otapalima, mogu uzrokovati degradaciju željenih komponenti radi visokih temperatura i dugog vremena ekstrakcije, sve se češće koriste inovativne i novije metode. Neke od novijih metode su ekstrakcija superkritičnim tekućinama, ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom, mikrovalovima, ekstrakcije potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija pomoću hladne plazme te ubrzana ekstrakcija otapalima (Teixeira i sur., 2014).

U ovom radu eutektička otapala su korištena kao sredstvo za ekstrakciju.

### 2.2.1. Svojstva eutektičkih otapala

Eutektička otapala se definiraju kao smjesa dviju ili više komponenata u tekućem ili krutom stanju koja u određenom omjeru imaju niže talište nego pojedinačne komponente smjese (Bubalo i sur., 2016). Eutektičke smjese se najčešće rade od dvije, tri jeftine i sigurne komponente koje se međusobno povezuju vodikovim vezama. U većini slučajeva, pripremaju se na način da se miješa kvarterna amonijeva sol (vodik akceptor) sa donorom vodika (Zhao i sur., 2015). Donori vodikove veze mogu biti karboksilne kiseline, alkoholi, amidi i sl.

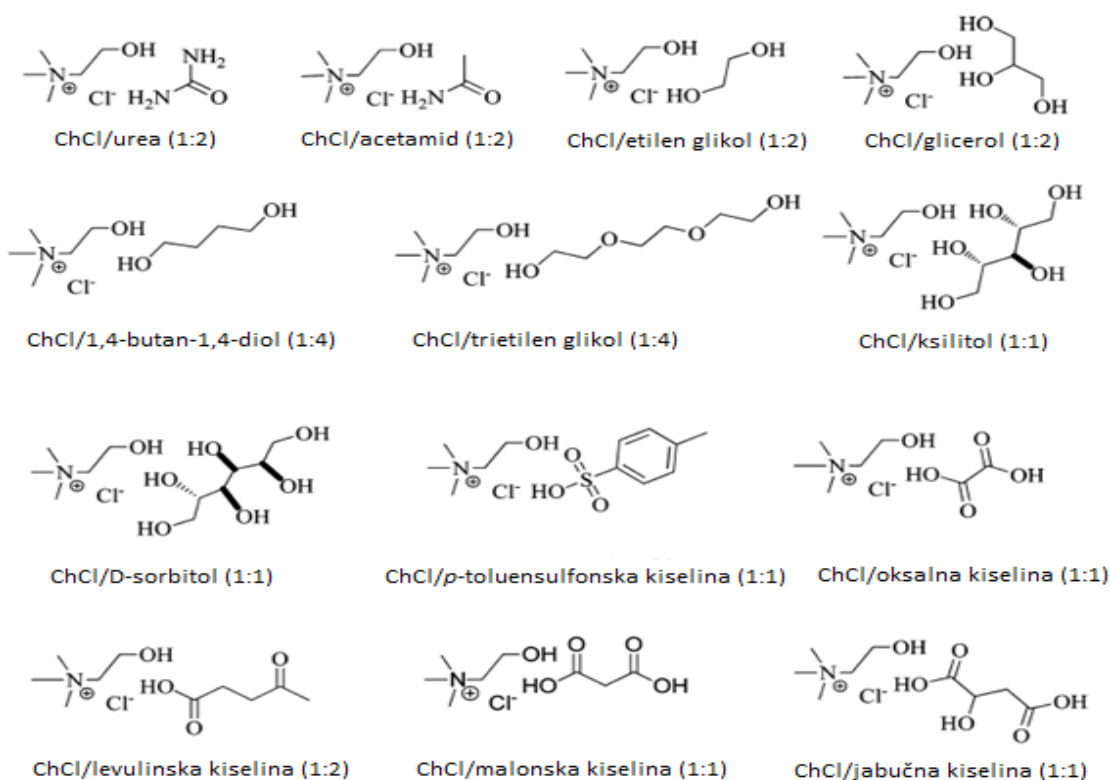
Eutektička otapala su tekućine na temperaturama od 100°C ili manje te pokazuju slična svojstva otapala kao i ionske tekućine. Glavna fizikalno-kemijska svojstva navedenih otapala koja su odgovorna za njihovu uporabu u smislu zelenih otapala su: točke tališta, gustoća, viskoznost, polarnost, ionska vodljivost i bazičnost/kiselost (Plotka-Wasyłka i sur., 2017). Također, većina eutektičkih otapala imaju veću gustoću od vode i vrlo su viskozna pri sobnim temperaturama.

U usporedbi s konvencionalnim organskim otapalima i ionskim tekućinama, eutektička otapala posjeduju brojne prednosti. Biokompatibilna su i netoksična, ne utječu negativno na okoliš pošto su biorazgradiva. Vrlo lako se pripremaju od sastojaka koji su lako dostupni te su jeftina za pripremu. Ionske su prirode i relativno su visoko polarna otapala. S obzirom na širok spektar tvari koje mogu tvoriti eutektička otapala, postoje brojne kombinacije finalnog produkta te postoji mogućnost modificiranja njihovih fizikalno-kemijskih svojstava (Plotka-Wasyłka i sur., 2017).

Široku primjenu u pripravi eutektičkih otapala ima kolin klorid (ChCl) koji je korišten u ovome radu. Kolin klorid je organska sol koja ulazi u interakciju s lako dostupnim donorima vodika (karboksilne kiseline, urea, glicerol i sl.) (Zhao i sur., 2013). Radi se o sirovini koja je dostupna u velikim količinama te zadovoljava karakteristike navedene gore: netoksičnost, biorazgradivost i ekonomičnost. Na **Slici 2** su prikazana neka od eutektičkih otapala napravljena na bazi kolin klorida.

Na stabilnost i formiranje eutektičkih otapala znatno utječe kemijska struktura akceptora vodika i donora vodika. Stabilnost eutektičkih otapala podrazumijeva da pripravljena smjesa ostane u tekućoj fazi što dulje vrijeme, tj. da ne dolazi do pojave kristalnog taloga

(Bubalo i sur., 2016). Uz kemijsku strukturu, na stabilnost vodikovih veza u eutektičkim otapalima utječe i prostorni raspored skupina unutar molekule. Također, bitan faktor stabilnosti otapala je i omjer komponenata u smjesi. Dai i sur. (2013) su navedeno dokazali prilikom pripreve eutektičke smjese koja je sadržavala glukozu i ChCl. Naime, eutektička smjesa pokazala se stabilnom u molarnom omjeru 2:5, dok se kristalni talog pojavljivao prilikom korištenja omjera 1:1, 1:4 i 2:1.



**Slika 2** Kemijska struktura eutektičkih otapala baziranih na kolin kloridu (Zhao i sur., 2013)

### 2.2.1.1. Točka tališta

Kao što je već prije spomenuto, eutektička otapala nastaju miješanjem dvije krute tvari koje su sposobne stvoriti novu, tekuću fazu povezivanjem vodikovim vezama. Novonastalu fazu karakterizira niža točka tališta od točki tališta pojedinih komponenti. Značajan pad u vrijednosti točke tališta rezultat je interakcije halogenog aniona i donora vodikove veze (npr. urea). Točka tališta svih poznatih eutektičkih otapala je ispod 150°C. Općenito, eutektička otapala s točkom tališta nižom od 50°C su primamljivija opcija za korištenje pošto se mogu upotrebljavati kao jeftina i sigurna otapala u mnogim područjima industrije.

Iako postoji široki spektar amida koji u kombinaciji sa  $\text{CHCl}_3$ -om tvore eutektička otapala s točkom tališta nižom od  $100^\circ\text{C}$ , mora se istaknuti da je broj eutektičkih otapala koji su na sobnoj temperature tekućine ograničen. Među njima, urea i 2,2,2-trifloracetamid su tvari koje mogu poslužiti u tvorbi tekućeg eutektičkog otapala, vjerojatno zbog sposobnosti da tvore jače vodikove veze s kolin kloridom. To znači da u slučaju tvorbe eutektičkog otapala sa  $\text{CHCl}_3$ -om, izbor donora vodika je kritična točka u postizanju niže točke tališta (Zhang i sur., 2012).

Eutektička otapala koja su tekuća na sobnoj temperaturi mogu se također dobiti i korištenjem karboksilnih kiselina ili poliola dobivenih iz šećera. Slično kao i u slučaju donora vodika, priroda organskih soli (npr. amonijeve soli) utječe na točku tališta. Anion organske soli također utječe na točku tališta novonastalog eutektičkog otapala. Utjecaj na vrijednost točke tališta ima i molarni omjer organske soli i donora vodika (Zhang i sur., 2012).

Iako se navedeni načini stvaranja eutektičkih otapala karakteriziraju padom temperature točke tališta, ne postoji dokazana poveznica između točke tališta eutektičkih otapala i točki tališta čistih komponenti.

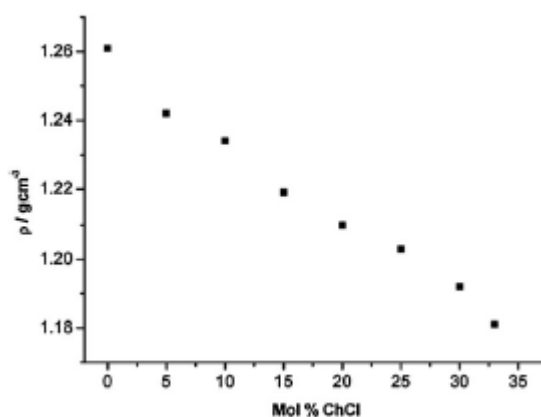
Kada se koriste kiseline kao donori vodika, čini se da kiselina s najmanjom molekularnom masom tvori eutektičko otapalo s najnižom vrijednosti točke tališta. Abbot i sur. (2014) predlažu da točka tališta eutektičkih otapala nastalih miješanjem donora vodika i soli ovisi o latentnoj energiji otapala, načinu na koji anion i donor vodika reagiraju jedan s drugim te promjeni entropije izazvanoj formiranjem tekuće faze. Prema nekoj pretpostavci, pad vrijednosti točke tališta mogao bi biti mjera promjene entropije sustava.

### 2.2.1.2. Gustoća

Gustoća je jedno od najbitnijih fizikalnih svojstava svih vrsta otapala. Općenito, gustoća eutektičkih otapala određuje se uređajem za mjerenje relativne gustoće. Većina eutektičkih otapala imaju veću gustoću od vode.

Raspored molekula u eutektičkim otapalima ima utjecaj na samu gustoću otapala. Također, gustoća eutektičkih otapala je veća od gustoća pojedinačnih komponenata. Ovaj fenomen se može objasniti 'teorijom rupa'. Slično ionskim tekućinama, eutektička otapala se sastoje od 'rupa' ili praznina, tj. slobodnog prostora. Kada je cinkov klorid ( $\text{ZnCl}_2$ ) pomiješan s ureom, prosječni polumjer rupa se smanjio, što rezultira povećanjem gustoće otapala u usporedbi sa čistom ureom (Abbot i sur., 2007).

Molarni omjer organske soli i donora vodika ima očiti utjecaj na gustoću eutektičkih otapala. Dodatak kolin klorida u glicerol rezultira smanjenjem gustoće otapala (**Slika 3**) što se može objasniti slobodnim volumenom u otapalu (Shahbaz i sur., 2012).



**Slika 3** Gustoća glicerol-ChCl eutektičkih otapala s obzirom na molarni sastav (Shahbaz i sur., 2012)

### 2.2.1.3. Viskoznost

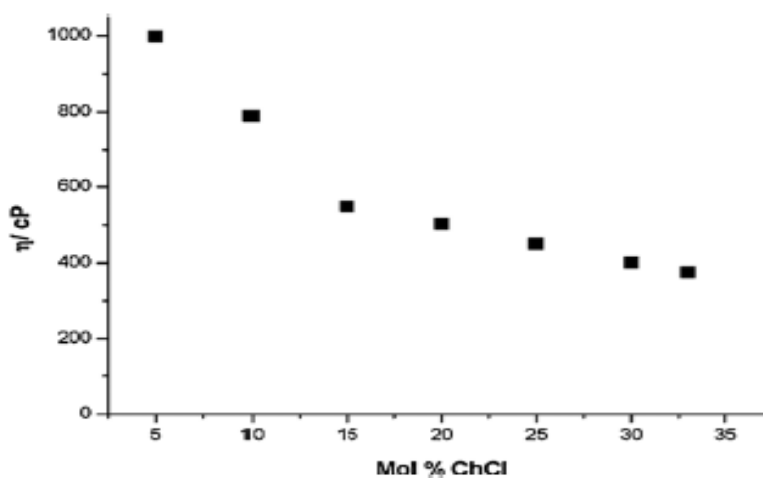
Kao gustoća, viskoznost eutektičkih otapala je vrlo bitno fizikalno svojstvo. Većina eutektičkih otapala pokazuje visoke razine viskoznosti ( $>100$  cP) pri sobnoj temperaturi, osim eutektičke smjese ChCl-etilen glikol. Visoka viskoznost može se pripisati opsežnoj mreži vodikovih veza između pojedinačnih komponenata, što rezultira smanjenom mobilnošću slobodnih tvari u otapalu. Velike ionske molekule i mali volumen praznog prostora u većini eutektičkih otapala, ali i druge sile poput elektrostatskih i van der Waalsovih također pridonose visokoj razini viskoznosti eutektičkih otapala (Zhang i sur., 2012). S obzirom na potencijalno korištenje kao zelenog medija, poželjan je razvoj eutektičkih otapala sa što mogućim manjim razinama viskoznosti. Općenito, na

viskoznost eutektičkih otapala najviše utječu kemijski sastav komponenata (vrsta amonijeve soli i donora vodika, molarni omjer organske soli i donora vodika itd.), temperatura i sadržaj vode. Kao što je već gore navedeno, viskoznost otapala ovisi o volumenu praznog prostora. Primjerice, korištenje malih kationa ili fluoriranih donora vodika može dovesti do nastanka eutektičkog otapala niske viskoznosti (Abbott i sur., 2006).

Viskoznost binarnih eutektičkih smjesa je u osnovi regulirana vodikovim vezama, van der Wallsovim i elektrostatskim interakcijama. Zhang i sur. (2012) su zaključili da viskoznost eutektičkih otapala na osnovi kolin klorida uvelike ovisi o prirodi donora vodika. Npr., ChCl-etilen glikol eutektička smjesa pokazuje najmanju razinu viskoznosti (19 cP pri 20°C). Suprotno tome, upotreba derivata šećera ili karboksilnih kiselina kao donora vodika tvori eutektička otapala visoke viskoznosti uslijed prisutne snažnije međumolekularne mreže vodikovih veza.

Zanimljiv je slučaj eutektičke smjese ChCl/glicerol. Povećanjem molarnog omjera ChCl/glicerol dolazi do smanjenja viskoznosti otapala što se može vidjeti na **Slici 4**. Glicerol ima snažno povezane molekule u sebi zbog prisutnosti mreže vodikovih veza. Dodatkom kolin klorida (ChCl) drastično se smanjuje viskoznost glicerola zbog djelomično raskinute mreže vodikovih veza (Abbott i sur., 2011).

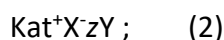
Viskoznost većine eutektičkih otapala se značajno mijenja s obzirom na temperaturu kao i u slučaju ionskih tekućina, viskoznost eutektičkih otapala pada porastom temperature.



**Slika 4** Utjecaj količine kolin klorida na viskoznost eutektičke smjese glicerol-ChCl (Zhang i sur., 2012)

### 2.2.2. Vrste eutektičkih otapala

Općenito, eutektička otapala se mogu opisati formulom (2):



gdje  $\text{Kat}^+$  predstavlja bilo koji amonijev, fosforni ili sumporni kation, a X je Lewisova baza, najčešće halogeni anion. Kompleksne anionske strukture se tvore interakcijom  $\text{X}^-$  i Lewisove kiseline Y (z se odnosi na broj Y molekula koje reagiraju s anionom).

Prema Smith i sur. (2014), eutektička otapala možemo svrstati u 4 tipa/vrste, a navedeni su u **Tablici 2**.

**Tablica 2** Općenite formule za klasifikaciju eutektičkih otapala

| Tip | Općenita formula                                                                     | Termini                                                                            |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | $\text{Kat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x$                                                | $\text{M}=\text{Zn}, {}^{1,5,6}\text{Sn}, {}^7\text{Fe}, \text{Al}, {}^8\text{Ga}$ |
| 2   | $\text{Kat}^+\text{X}^-\text{zMCl}_x \cdot y\text{H}_2\text{O}$                      | $\text{M}=\text{Cr}, {}^{11}\text{Co}, \text{Cu}, \text{Ni}, \text{Fe}$            |
| 3   | $\text{Kat}^+\text{X}^-\text{zRZ}$                                                   | $\text{Z}=\text{CONH}_2, {}^{12}\text{COOH}, {}^{13}\text{OH}$                     |
| 4   | $\text{MCl}_x + \text{RZ} = \text{MCl}_{x-1}^+ \cdot \text{RZ} + \text{MCl}_{x+1}^-$ | $\text{M}=\text{Al}, \text{Zn} ; \text{Z}=\text{CONH}_2, \text{OH}$                |

Prvi tip eutektičkih otapala tvore  $\text{MCl}_x$  i kvarterne amonijeve soli. Primjeri prvog tipa eutektičkih otapala tvore se miješanjem soli imidazola i raznih metalnih halogenida od kojih je najpoznatiji  $\text{FeCl}_2$ . Ostali metalni halogenidi koji se koriste mogu biti:  $\text{AgCl}$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  itd. (Scheffler i Thomson, 1990).

Spektar nehidratiranih metalnih halogenida koji imaju odgovarajuće nisku točku taljenja za tvorbu eutektičkih otapala je ograničen. Doduše, opseg eutektičkih otapala može se povećati korištenjem hidratiranih metalnih halogenida i kolin klorida (drugi tip). Relativno niska cijena navedenih halogenida i njihova otpornost na zrak i vlagu čine ih pogodnim za korištenje u industriji (Abbott i sur., 2006).

Treći tip eutektičkih mješavina nastaje miješanjem različitih soli (najčešće kolin klorida) i donora vodika. Ova vrsta eutektičkih otapala je zanimljiva industriji zbog sposobnosti otapanja klorida i oksida (Abbott i sur., 2006). Istražene su brojne vrste donora vodika u

svrhu tvorbe ovog tipa eutektičkih otapala (amidi, alkoholi, karboksilne kiseline). Tekućine ovakvoga tipa su vrlo jednostavne za pripremu, jeftine su i većina su biorazgradive. Širok obujam donora vodika čini ovu vrstu eutektičkih otapala vrlo prilagodljivom i svestranom za upotrebu. Neke od primjena treće vrste eutektičkih otapala su uklanjanje glicerola iz biodizela, procesiranje metalnih oksida te sinteza derivata celuloze (Abbott i sur., 2006).

Većina ionskih tekućina koje su tekuće na sobnoj temperaturi tvore se koristeći organske katione pošto anorganski kationi generalno ne tvore eutektičke mješavine niskih točki tališta radi vlastite visoke gustoće. Doduše, prethodna istraživanja su pokazala da mješavine anorganskih metalnih halogena i uree mogu tvoriti eutektička otapala s točkom tališta nižom od 150°C (Gambino i sur., 1987). Na temelju navedenih istraživanja, Abbott i sur. (2007) su pokazali da se nekolicina tranzicijskih metala može koristiti za tvorbu eutektičkih smjesa koje su tekuće na sobnoj temperaturi. Takve mješavine su četvrti tip eutektičkih otapala. Najčešće korišteni metalni halogenid je  $\text{ZnCl}_2$  koji tvori eutektičke smjese s ureom, acetamidom i etilen glikolom (Abbott i sur., 2007).

### 2.3. KROMATOGRFSKE METODE

Kromatografija je analitička metoda separacije kod koje se komponente razdjeljuju između faza. Jedna od faza je nepokretna, dok se druga (mobilna faza) kreće u određenom smjeru (Ettre, 1993). Kromatografska analiza uključuje ispitivanje sastava uzorka na temelju brzine kretanja komponenti uzorka po stacionarnoj fazi nošenih mobilnom fazom. Uzorak je otopljen u mobilnoj fazi koja prolazi kroz stacionarnu fazu čime se dijelovi uzorka razdvajaju te ih je moguće kvantitativno odrediti i analizirati. Stacionarna faza može biti tekuća ili čvrsta, a mobilna tekuća ili plinovita (Rosković, 2014).

Kromatografija kao metoda, može biti analitička ili preparativna. U analitičkoj kromatografiji se obično radi s malim uzorcima te se pokušava odrediti udio komponenti prisutnih u uzorku. S druge strane, preparativna kromatografija se bavi razdvajanjem komponenti iz uzorka zbog daljnje obrade. Radi toga se može smatrati i metodom pročišćavanja. Općenito, kromatografija omogućava kvantitativno određivanje tvari

slične kemijske strukture što ju čini jednom od vodećih analitičkih metoda (Skoog i sur., 2007).

Rezultati kromatografske analize temelje se na različitoj brzini prolaska komponenata kroz stupac (plinska, tekućinska kromatografija) ili ploču (tankoslojna kromatografija). Stacionarna faza je fiksirana u stupcu ili ploči i odabrana je tako da selektivno zadržava molekule. To znači da će različiti sastojci smjese biti na nju vezani u različitim vremenskim intervalima što uzrokuje razdvajanje smjese. Stacionarna faza se odabire s obzirom na prirodu ispitivanog spoja, vrstu veze koja nastaje između kromatografske podloge i ispitivanog uzorka i prirode ravnoteže samog procesa (Kaštelan-Macan, 2003). Kako bi se složio adekvatan kromatografski sustav, treba se izabrati pogodan sustav otapala koji čini mobilnu fazu s obzirom na izbor stacionarne faze. Izbor optimalnog otapala se radi na temelju njegove sposobnosti da stvara vodikove veze pošto je to važan faktor kromatografskog procesa. Odabrana otapala ne smiju sadržavati nečistoće koje bi smetale pri kromatografskom određivanju.

Kromatografske metode se mogu podijeliti prema različitim kriterijima. Dijele se s obzirom na mehanizme separacije, prema obliku stacionarne faze, prema fizikalnom stanju obiju faza i fizikalnom stanju mobilne faze itd.

Što se tiče mehanizama separacije, kromatografske metode dijelimo na:

- *ionsku kromatografiju*- omogućuje razdvajanje nabijenih molekula ili iona,
- *razdjelnu kromatografiju*- temelji se na razlici topljivosti komponenata,
- *adsorpcijsku kromatografiju*- separacija temeljena na različitim afinitetima komponenata uzorka prema adsorpciji na aktivne čvrste tvari na površini stacionarne faze,
- *afinitetnu kromatografiju*- mehanizam separacije je jedinstvena interakcija analita i liganda,
- *kromatografija isključenjem*- razdvajanje zbog razlika u obliku, veličini ili naboju čestica.

Kada je riječ o obliku stacionarne faze, razlikujemo:

- *plošnu kromatografiju*- specifično napravljen papir (papirna kromatografija) i tanki homogeni sloj na inertoj podlozi (tankoslojna kromatografija),
- *kolonsku kromatografiju*- stacionarna faza se nalazi unutar kolone (stupca).

Prema fizikalnom stanju obiju faza, kromatografija može biti:

- *plinsko-tekućinska*,
- *tekućinsko-tekućinska*,
- *plinsko-čvrsta*,
- *tekućinsko-čvrsta*.

Dok su prema fizikalnom stanju mobilne faze, kromatografske metode podijeljene na:

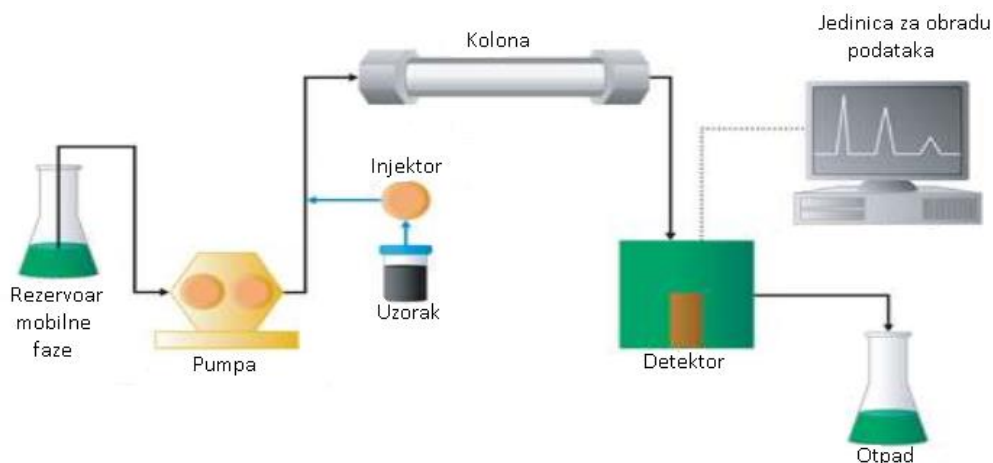
- *tekućinsku kromatografiju*- mobilna faza je kapljevina,
- *plinsku kromatografiju*-mobilna faza je inertni plin,
- *fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima*- mobilna faza je iznad svog kritičnog tlaka i temperature (Cerjan-Stefanović i sur., 1999).

### 2.3.1. Visoko tlačna tekućinska kromatografija

Visoko tlačna tekućinska kromatografija (engl. High performance liquid chromatography) je vrsta tekućinske kromatografije koja se koristi za separaciju i kvantifikaciju komponenti koje su otopljene u zadanom otapalu. HPLC se koristi za određivanje količine određenog spoja u uzorku. Za razliku od plinske kromatografije, HPLC je idealna u analizi termolabilnih i neisparljivih spojeva. Posljednjim unaprjeđenjem tehnologije kolona, efikasnost HPLC metode je drastično napredovala. S obzirom na ostale metode kromatografije, tekućinska kromatografija ima mnogo prednosti. Skoro nikada nije potrebna derivatizacija te je adekvatna metoda za korištenje jednostavnih tehnika pripreme uzorka za analizu (Kelly, 1989).

Kao što je prikazano na **Slici 5**, uređaj za HPLC sastoji se od injektora, kolone, pumpe, detektora, jedinice za obradu podataka i rezervoara mobilne faze. Glavni dio uređaja je kolona gdje se događa separacija komponenti. Stacionarna faza može sadržavati mikronske čestice, stoga je potrebna visokotlačna pumpa koja će pokretati mobilnu fazu kroz kolonu. Kromatografski proces počinje injektiranjem uzorka injektorom u kolonu. Separacija komponenti se događa kako analit i pokretna faza prolaze kroz kolonu. Metoda detekcije komponenti je vrlo važna te se odabire s obzirom na vrstu detektora. Na zaslonu računala se prikazuje kromatogram koji prikazuje odgovore detektora za svaku pojedinačnu komponentu. Neki od detektora koji se koriste su UV, fluorescentni,

detektor indeksa loma itd. Svaki od njih ima svoje mane i prednosti te vrste analita za koje je najučinkovitiji (Kupiec, 2004).



**Slika 5** Shematski prikaz HPLC uređaja

Glavna tehnika separacije u kolonskoj kromatografiji je ispiranje (eluiranje). Eluiranje podrazumijeva ispiranje sastojaka smjese kroz kolonu stalnim dodavanjem čistog otapala. Ono može biti stupnjevito, gradijentno ili izokratno. Stupnjevitim eluiranjem sastav mobilne faze se mijenja u koracima tijekom postupka, gradijentnim se sastav mobilne faze kontinuirano mijenja tijekom eluiranja, dok kod izokratnog eluiranja sastav mobilne faze ostaje stalan (Cerjan-Stefanović i sur., 1999).

S obzirom na polarnost mobilne i stacionarne faze, postoje kromatografija normalnih i kromatografija obrnutih faza. Kromatografija normalnih faza podrazumijeva postupak ispiranja u kojem je stacionarna faza polarnija od mobilne (otapalo je najčešće nepolarno). Kod kromatografije obrnutih faza, mobilna faza je polarnija (otapalo je generalno smjesa vode i polarnog organskog otapala) od stacionarne (Cerjan-Stefanović i sur., 1999). Selektivnost metode i zadržavanje analita se regulira mijenjanjem sastava mobilne faze stoga je izbor mobilne faze vrlo važan. Jednako je važan i izbor stacionarne faze koji ovisi o vrsti uzorka koji se koristi, njegovoj topljivosti i polarnosti. Treba spomenuti i važnost kromatografije obrnutih faza koja se, po određenim procjenama, koristi u 75-90 % svih HPLC separacija (Smith, 1982).

Metode kvantifikacije koje se koriste u HPLC metodi su preuzete uglavnom od metoda koje se koriste u plinskoj kromatografiji. Osnovna metoda koja se koristi je mjerenje

površine i visine pika. Visina i površina pika su proporcionalni koncentraciji u slučaju da su pikovi kvalitetno odijeljeni. Postoje tri različite metode kalibracije koje se koriste u kvantitativnoj analizi te svaka posjeduje svoje prednosti i ograničenja: unutarnja kalibracija, vanjska kalibracija i normalizacija površina. Normalizacija površina se rijetko primjenjuje, dok se unutarnja i vanjska kalibracija najčešće koriste u tekućinskoj kromatografiji (Kupiec, 2004).

U slučaju vanjske kalibracije, pripremaju se standardi u području koncentracija koje se očekuju u uzorcima, a za analizu uzoraka uspoređuju se podaci kromatograma s podacima kalibracijske krivulje svake pojedine komponente. Kod unutarnje kalibracije dodaje se jednaka količina komponente koja nije prisutna u uzorku (interni standard) u uzorke i standardne otopine. Interni standard bi trebao biti stabilan, nereaktivan s nekom od komponenti uzorka te kemijski sličan komponenti koja se određuje. Također, trebao bi imati kraće vrijeme zadržavanja te biti dovoljno odijeljen od ostalih pikova (Kupiec, 2004).

## **2.4. OPTIMIRANJE PROCESNIH PARAMETARA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA**

Optimizacija se definira kao sredstvo otkrivanja i poboljšavanja uvjeta te parametara određenog procesa da bi se postigao najveći mogući prinos (odziv). Često se upotrebljava u analitičkoj kemiji. Optimizacija u analitičkoj kemiji se tradicionalno provodila radi praćenja utjecaja jednog parametra u vremenu na eksperimentalni odziv, gdje bi jedan parametar bio konstantan, a drugi promjenjiv (Bezzera, 2008).

Većina tehnoloških procesa ovisi o mnogobrojnim parametrima stoga je nemoguće dobiti stvarnu sliku utjecaja određenih parametara na proces reguliranjem i praćenjem jednog parametra. Takvim pristupom bi optimizacijski procesi zahtijevali puno utrošenog vremena te velik broj eksperimenata i ono najbitnije – ne uzimaju u obzir međusobne interakcije promatranih parametara. U današnje vrijeme se koriste multivarijantne statističke tehnike koje uzimaju u obzir međusobnu interakciju parametara (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005).

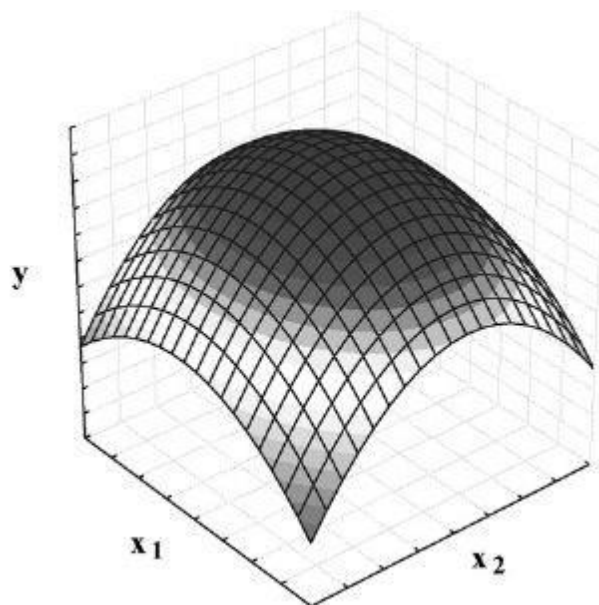
Jedna od često korištenih metoda za statističko planiranje eksperimenata je metoda

odzivnih površina (engl. *Response surface methodology*). Montgomery (2003) ju definira kao skup matematičkih i statističkih tehnika korisnih za modeliranje i analizu utjecaja nekoliko procesnih parametara na odziv s ciljem optimizacije toga odziva. Metoda odzivnih površina se najčešće upotrebljava u industriji u svrhu planiranja i optimizacije kemijskih reakcija. Upotrebljava se i u znanstvenim istraživanjima na području biokemije, poljoprivrede, u kemijskim znanostima, inženjerstvu i sl. radi optimizacije procesa.

Osnovni koraci u korištenju metode odzivnih površina kao sredstva za optimizaciju procesnih parametara su:

- određivanje nezavisnih varijabli s definiranim rasponom ispitivanih parametara koje značajno utječu na proces,
- odabir plana pokusa te provođenje eksperimenta prema predloženoj shemi kombinacije parametara,
- aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom primjenom matematičko-statističkih metoda,
- evaluacija prikladnosti modela,
- određivanje optimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli (Bezzeri i sur., 2008).

Cilj primjene metode odzivnih površina je dobiti odnos nezavisnih varijabli na zavisnu varijablu (odziv) te odrediti utjecaj ulaznih parametara na odziv. Prije nego se metoda primjeni, potrebno je odabrati adekvatni dizajn pokusa kojim će se definirati eksperimenti koje je potrebno provesti. Provedbom pokusa u svim kombinacijama definiranim dizajnom pokusa (matrica plana pokusa), dobije se konturna ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti. Dobivena ploha se naziva odzivna ploha. Odzivna ploha se opisuje funkcijom koja se naziva odzivna funkcija. Ona opisuje ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama te njihove međusobne interakcije. Moguće je izračunati koeficijente jednadžbe pridruživanjem odgovarajućeg polinoma svakoj odzivnoj funkciji. Rezultati metode se mogu predstaviti grafički u obliku trodimenzionalnog grafa (**Slika 6**).



**Slika 6** Trodimenzionalni prikaz odzivne plohe (Bezzera i sur., 2008)

S obzirom na željenu odzivnu funkciju, odabiremo dizajn (plan) pokusa. Plan pokusa za modele prvog reda upotrebljava se kada se eksperimentalni podaci mogu aproksimirati linearnom funkcijom, tj. ne tvore krivulje. Aproksimacijska funkcija za modele prvog reda je (3):

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k \cdot x_k + \varepsilon \quad (3)$$

U slučaju da se eksperimentalni podaci ne mogu opisati linearnom funkcijom, primjenjuje se plan pokusa za kvadratni odziv površine. Tada je aproksimacijska funkcija za modele drugog reda (kvadratni polinom):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_{i=2}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (4)$$

gdje je:

$y$  – odzivna funkcija zadana modelom,

$\beta_0$  – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma,

$\beta_i$  – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,

$\beta_{ii}$  – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,

$\beta_{ij}$  – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma,

$x_{i,j}$  – ispitivane nezavisne varijable (Bezzer i sur., 2008; Montgomery, 2003).

Nakon što se odrede koeficijenti odzivne funkcije, faktori ili njihove međusobne interakcije koje bitno utječu na proces mogu se izdvojiti primjenom studentovog t-testa ili primjenom analize varijance (ANOVA) (Bradley, 2007).

Razlikujemo razne planove pokusa s obzirom na razinu ispitivanih varijabli, odabira eksperimentalnih točaka i broj potrebnih pokusa. Često korišteni planovi pokusa su:

- centralno kompozitni plan pokusa,
- plošno-centrirani kompozitni plan pokusa,
- faktorijski plan pokusa,
- Box-Behnkenov plan pokusa (Bezzer i sur., 2008).

#### 2.4.1. Box-Behnken-ov plan pokusa

Box-Behnken-ov plan pokusa razvijen je 1960. godine. On definira kako odabrati točke eksperimenta u slučaju kada se ispituje utjecaj nekolicine faktora na tri razine. Omogućuje ispitivanje većeg broja varijabli te vrlo precizne procjene koeficijenata matematičkih modela drugog i prvog reda (Ferreira i sur., 2007).

Zbog odnosa između broja koeficijenata koji se pojavljuju u određenom modelu, ovaj plan pokusa ima prednost nad ostalim planovima eksperimenta. Također, ne sadrži kombinacije u kojima su svi faktori paralelno na svojoj najvećoj ili najmanjoj razini stoga nije adekvatna njegova primjena u slučajevima kada se eksperiment izvodi u ekstremnim uvjetima (Ferreira i sur., 2007).

Broj eksperimenata potrebnih za razvoj Box-Behnken-ovog plana pokusa se definira izrazom:

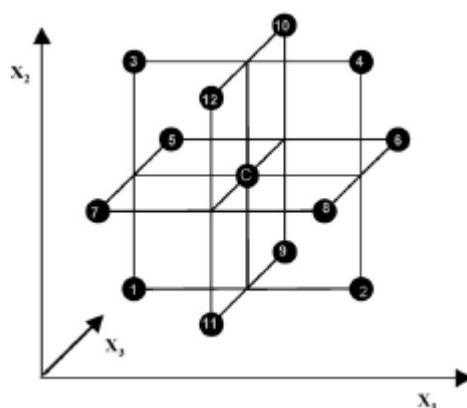
$$N = 2^k(k - 1) + C_0 \quad (5)$$

gdje je:

$k$  – broj faktora,

$C_0$  – broj centralnih točaka.

Sve razine faktora trebaju se svesti na tri razine (-1, 0, 1) s jednakim intervalom među razinama.



**Slika 7** Box-Behnken-ov plan pokusa sa 13 eksperimentalnih točaka za tri varijable  
(Ferreira i sur., 2007)

Rezultat određenog procesa se može opisati i grafički pomoću odzivne površine. Površine je moguće prikazati kao trodimenzionalni dijagram (**Slika 7**) ili u obliku konturnih površina. Svaka kontura odgovara nekoj vrijednosti odziva, a crtaju se u  $x_1$  i  $x_2$  ravnini. Promjena visine ili oblika određenog odziva se događa mijenjanjem razina nezavisnih varijabli  $x_1$  i  $x_2$ . Rezultat toga je nastanak raznih oblika odzivnih površina. Korelacija između nezavisnih varijabli ( $x_1$ ,  $x_2$ ) i odziva ( $y$ ) opisuje se nelinearnom ili linearnom funkcijom različitih oblika.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

Eksperimentalni dio ovoga rada realiziran je na Katedri za projektiranje tehnoloških procesa i kontstrukcijske materijale te na Katedri za kemiju i ekologiju na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda biljnoga podrijetla“ (UIP-2017-05-9909).

### 3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je dobiti ekstrakte bogate hesperidinom iz kora mandarina vrste *Citrus reticulata* Blanco. Odabrane su četiri hrvatske sorte navedenih mandarina – *Zorica rana*, *Chahara*, *Okitsu* i *Kuno*. Ekstrakcija je rađena sa 15 različitih eutektičkih otapala u kojima je akceptor vodika bio kolin klorid, dok su donori vodika bili slijedeći spojevi- urea, acetamid, butan-1,4-diol, glicerol, limunska kiselina, jabučna kiselina, sorbitol, ksilitol, oksalna kiselina, levulinska kiselina, etilen glikol, malonska kiselina, tiourea, *N*-metil urea i mliječna kiselina. Provedena su testiranja sa svih 15 eutektičkih otapala kako bi se odredilo najprikladnije otapalo za ekstrakciju, tj. otapalo koje će ekstrahirati najveću količinu hesperidina iz uzoraka. Sadržaj hesperidina određivao se visoko tlačnom tekućinskom kromatografijom s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD). Određen je utjecaj temperature ekstrakcije (30, 50, 70°C), vremena ekstrakcije (30, 60, 90 min) te količine dodane vode (10, 20, 30 % (v/v)) na sadržaj hesperidina u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom eutektičkim otapalom kolin klorid:acetamid.

Nakon toga, provedena je optimizacija procesa tj. određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije koristeći metodu odzivnih površine (RSM).

### 3.2. MATERIJALI

#### 3.2.1. Sorte mandarina

U radu su korištene kore mandarine četiri različite sorte *Citrus reticulata* Blanco – *Zorica rana*, *Chahara*, *Okitsu* i *Kuno*.

Kore mandarine su dobivene s obiteljske farme Dalibor Ujević (Opuzen, Hrvatska) 2017.

godine u rujnu (sorta *Zorica rana*), listopadu (sorte *Chahara* i *Okitsu*) i studenom (sorta *Kuno*). Prije ekstrakcije, kore mandarine su se sušile i usitnile u laboratorijskom mlinu (IKA M 20 Universal mill).

### 3.2.2. Kemikalije

U radu je korišten standard hesperidina čistoće 89,5 % proizvođača Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Njemačka). Sve ostale korištene kemikalije bile su analitičkog stupnja čistoće proizvođača J.T. Baker (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD). Komponente koje su korištene za pripravu eutektičkih otapala bile su od proizvođača Gram-mol (Zagreb, Hrvatska), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Njemačka) te Acros Organics (Geel, Belgija).

## 3.3.METODE

### 3.3.1. Priprava eutektičkih otapala

Eutektička otapala su pripravljena miješanjem kolin klorida (ChCl) kao akceptora vodika s 15 različitih donora vodika (urea, acetamid, butan-1,4-diol, glicerol, limunska kiselina, jabučna kiselina, sorbitol, ksilitol, oksalna kiselina, levulinska kiselina, etilen glikol, malonska kiselina, tiourea, *N*-metil urea i mliječna kiselina) u određenom molarnom omjeru kako je prikazano u **Tablici 3**. Smjesa se grijala na 80°C uz konstantno miješanje dok nije nastala stabilna homogena tekućina.

**Tablica 3** Eutektička otapala korištena za ekstrakciju hesperidina iz kora mandarina

| Eutektičko otapalo | Akceptor vodika | Donor vodika        | Molarni omjer |
|--------------------|-----------------|---------------------|---------------|
| ChCl-AA            | Kolin klorid    | Acetamid            | 1:2           |
| ChCl-BDO           |                 | Butan-1,4-diol      | 1:2           |
| ChCl-CiA           |                 | Limunska kiselina   | 1:1           |
| ChCl-EG            |                 | Etilen glikol       | 1:1           |
| ChCl-GL            |                 | Glicerol            | 1:2           |
| ChCl-Lac           |                 | Mliječna kiselina   | 1:1           |
| ChCl-LeA           |                 | Levulinska kiselina | 1:1           |
| ChCl-MAc           |                 | Malonska kiselina   | 1:1           |
| ChCl-Mal           |                 | Jabučna kiselina    | 1:1           |

|           |  |                  |     |
|-----------|--|------------------|-----|
| ChCl-NMeU |  | N-metil urea     | 1:3 |
| ChCl-OxA  |  | Oksalna kiselina | 1:1 |
| ChCl-Sor  |  | Sorbitol         | 1:1 |
| ChCl-ThU  |  | Tiourea          | 1:1 |
| ChCl-U    |  | Urea             | 1:1 |
| ChCl-Xyl  |  | Ksilitol         | 1:1 |

### 3.3.2. Ekstrakcija hesperidina iz kora mandarina pomoću eutektičkih otapala

Osušene i usitnjene kore mandarina svake sorte (*Zorica rana*, *Chahara*, *Okitsu*, *Kuno*) (50 mg) su pomiješane sa 1 mL otapala. Prilikom primjene 15 različitih eutektičkih otapala, uz dodatak 20 % vode, smjesa se konstantno miješala na 50°C tijekom 30 min. Nakon što su primijenjena sva otapala iz **Tablice 3**, rađena je optimizacija procesa. Optimizacija je rađena prema odabranim procesnim varijablama navedenim u **Tablici 4** te prema uvjetima prikazanim u **Tablici 7**. Pripravljene uzorci su pomoću magnetske mješalice podvrgnuti ekstrakciji pri 1500 okretaja/min.

**Tablica 4** Nekodirane i kodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu

| Nezavisna varijabla  | Oznaka | Razina     |               |             |
|----------------------|--------|------------|---------------|-------------|
|                      |        | Donja (-1) | Centralna (0) | Gornja (+1) |
| Vrijeme (min)        | $X_1$  | 30         | 60            | 90          |
| Temperatura (°C)     | $X_2$  | 30         | 50            | 70          |
| H <sub>2</sub> O (%) | $X_3$  | 10         | 20            | 30          |

### 3.3.3. Priprema uzoraka za analizu visoko tlačnom tekućinskom kromatografijom

Prije nego što su uzorci analizirani na HPLC-u, trebali su se adekvatno pripremiti za proces. Nakon što je završio proces ekstrakcije, smjesa je centrifugirana pri 6000 okretaja/min te se izvršilo dekantiranje smjese nakon centrifugiranja. Dobiveni supernatant (100 µL) se razrijedio s 900 µL metanola te je filtriran kroz PTFE filter (0,45 µm) prije same HPLC analize.

### 3.3.4. Određivanje hesperidina na HPLC sustavu

Hesperidin je određivan koristeći RP-HPLC metodu opisanu u radu Suna i sur. (2010) na uređaju Agilent 1260 Infinity II (Analytical Instruments, CA, USA) s kromatografskom separacijom dobivenoj na koloni ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent, CA, USA) (100 x 4.6 mm, 5 µm) s izokratnim eluiranjem vode kao faze A i acetonitrila kao faze B pri sobnoj temperaturi tijekom 10 min. Protok je iznosio 1 mL/min, volumen uzorka je bio 20 µL dok je valna duljina UV detektora bila 210 nm. Standardne otopine hesperidina su bile pripremljene u metanolu te je kalibracija napravljena pri 7 različitih koncentracija (20 – 200 mg/L). Linearnost kalibracijske krivulje hesperidina je potvrđena koeficijentom determinacije  $R^2 = 0.99955$  s limitom detekcije (LOD) 0.001062 mg/L, limitom kvantifikacije (LOQ) 0.00354 mg/L te vremenom izlaska hesperidina u iznosu od 4.153 min. Rezultati dobivenog sadržaja hesperidina se nalaze u **Tablici 7**.

### 3.3.5. Optimiranje procesa ekstrakcije eutektičkim otapalima primjenom metode odzivnih površina

U svrhu određivanja utjecaja tri nezavisne varijable na sadržaj hesperidina u korama mandarina, korištena je metoda odzivnih površina. Istraženi su utjecaji vremena ekstrakcije (30-90 min;  $X_1$ ), temperature (30-70°C;  $X_2$ ) te sadržaja vode (10-30 % (v/v);  $X_3$ ) na prinos hesperidina dobivenog ekstrakcijom eutektičkim otapalima.

Aproksimacija dobivenih eksperimentalnih podataka napravljena je matematičkim modelom odzivnih površina, tj. polinomom drugog reda (6):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (6)$$

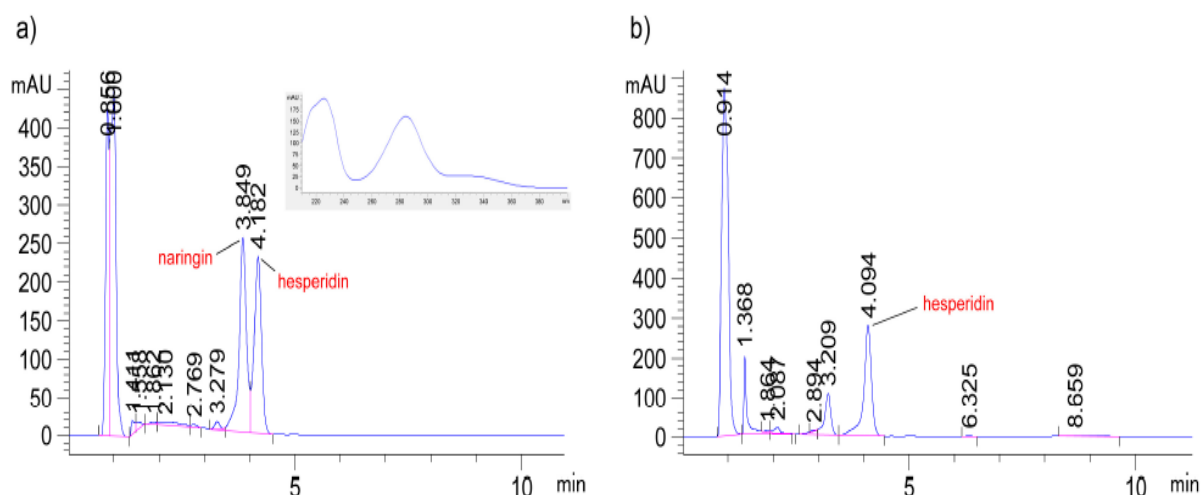
$i < j$

Gdje je  $y$  modelom predviđena odzivna funkcija (prinos hesperidina),  $\beta_0$  je konstanta jednadžbe odzivnog polinoma,  $\beta_i$  i  $\beta_{ii}$  su linearni i kvadratni član jednadžbe odzivnog

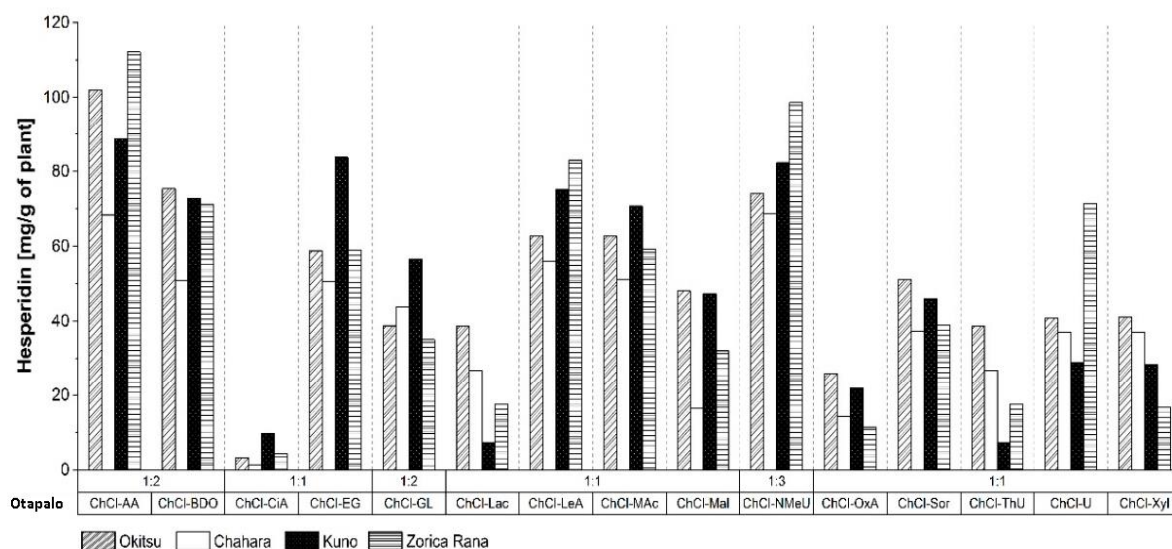
polinoma, a  $X_i$  i  $X_j$  su kodirane nezavisne varijable.  $\beta_{ij}$  je koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma.

Statistička analiza je provedena pomoću softvera *Design-Expert*®, v.7 (Stat Ease, Minneapolis, USA). Prihvatljivost modela je testirana i evaluirana kroz nedostatak modela, F-vrijednost i  $p$ -vrijednost analize varijance (ANOVA). Matematički modeli su postavljeni tako da opisuju utjecaj jednog parametra i njihovu interakciju na više procesnih parametara na svakom ispitivanom odzivu.

## **4. REZULTAT**



**Slika 8** HPLC kromatogrami za analizu hesperidina: **a)** HPLC kromatogram standarda naringina i hesperidina (ubačen je i UV spektar standarda hesperidina); **b)** HPLC kromatogram hesperidina u uzorcima kora mandarina



**Slika 9** Usporedna analiza dobivenih prinosa hesperidina korištenjem različitih eutektičkih otapala od kolin klorida (ChCl) i acetamida (AA), butan-1,4-diola (BDO), limunske kiseline (CiA), etilen glikola (EG), glicerola (GL), mliječne kiseline (Lac), levulinske kiseline (LeA), malonske kiseline (Mac), jabučne kiseline (Mal), N-metil uree (NmeU), oksalne kiseline (OxA), sorbitola (Sor), tiouree (ThU), uree (U) i ksilitola (Xyl)

Tablica 5 Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva

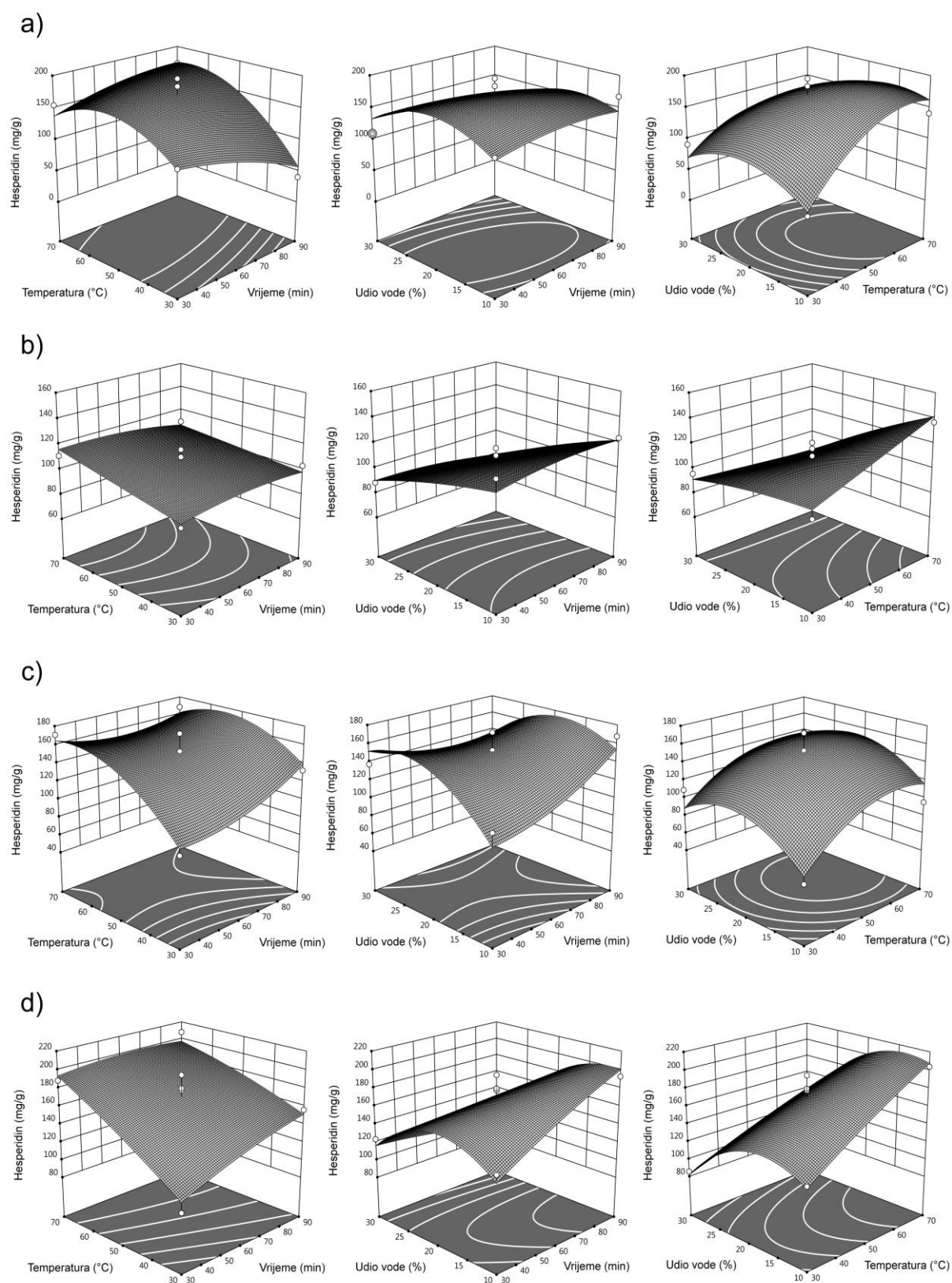
| Izvor varijabilnosti | Suma kvadratnih odstupanja (SS) | Stupnjevi slobode (n-1) | Varijanca-MS        | F-vrijednost | Prob>F ( $p < 0,05$ ) |
|----------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------|--------------|-----------------------|
| <b>Okitsu</b>        |                                 |                         |                     |              |                       |
| Model                | $6,870 \times 10^7$             | 9                       | $7,633 \times 10^6$ | 5,11         | 0,0215                |
| Ostatak              | $1,047 \times 10^7$             | 7                       | $1,495 \times 10^6$ |              |                       |
| Nedostatak modela    | $6,597 \times 10^6$             | 3                       | $1,495 \times 10^6$ | 2,27         | 0,2221                |
| Pogreška             | $3,869 \times 10^6$             | 4                       | $2,199 \times 10^6$ |              |                       |
| Ukupno               | $7,916 \times 10^7$             | 16                      |                     |              |                       |
| <b>Chahara</b>       |                                 |                         |                     |              |                       |
| Model                | $9,149 \times 10^6$             | 9                       | $1,017 \times 10^6$ | 5,10         | 0,0215                |
| Ostatak              | $1,395 \times 10^6$             | 7                       | $1,993 \times 10^5$ |              |                       |
| Nedostatak modela    | $9,823 \times 10^5$             | 3                       | $3,274 \times 10^5$ | 3,17         | 0,1468                |
| Pogreška             | $4,125 \times 10^5$             | 4                       | $1,031 \times 10^5$ |              |                       |
| Ukupno               | $1,054 \times 10^7$             | 16                      |                     |              |                       |
| <b>Kuno</b>          |                                 |                         |                     |              |                       |
| Model                | $3,386 \times 10^7$             | 9                       | $3,762 \times 10^6$ | 4,17         | 0,0364                |
| Ostatak              | $6,309 \times 10^6$             | 7                       | $9,013 \times 10^5$ |              |                       |
| Nedostatak modela    | $4,913 \times 10^6$             | 3                       | $1,638 \times 10^6$ | 4,69         | 0,0847                |
| Pogreška             | $1,396 \times 10^6$             | 4                       | $3,490 \times 10^5$ |              |                       |
| Ukupno               | $4,017 \times 10^7$             | 16                      |                     |              |                       |
| <b>Zorica rana</b>   |                                 |                         |                     |              |                       |
| Model                | $6,218 \times 10^7$             | 9                       | $6,906 \times 10^6$ | 7,34         | 0,0077                |
| Ostatak              | $6,588 \times 10^6$             | 7                       | $9,411 \times 10^5$ |              |                       |
| Nedostatak modela    | $1,438 \times 10^6$             | 3                       | $4,792 \times 10^5$ | 0,37         | 0,7785                |
| Pogreška             | $5,150 \times 10^6$             | 4                       | $1,287 \times 10^6$ |              |                       |
| Ukupno               | $6,877 \times 10^7$             | 16                      |                     |              |                       |

**Tablica 6** Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda za udio hesperidina

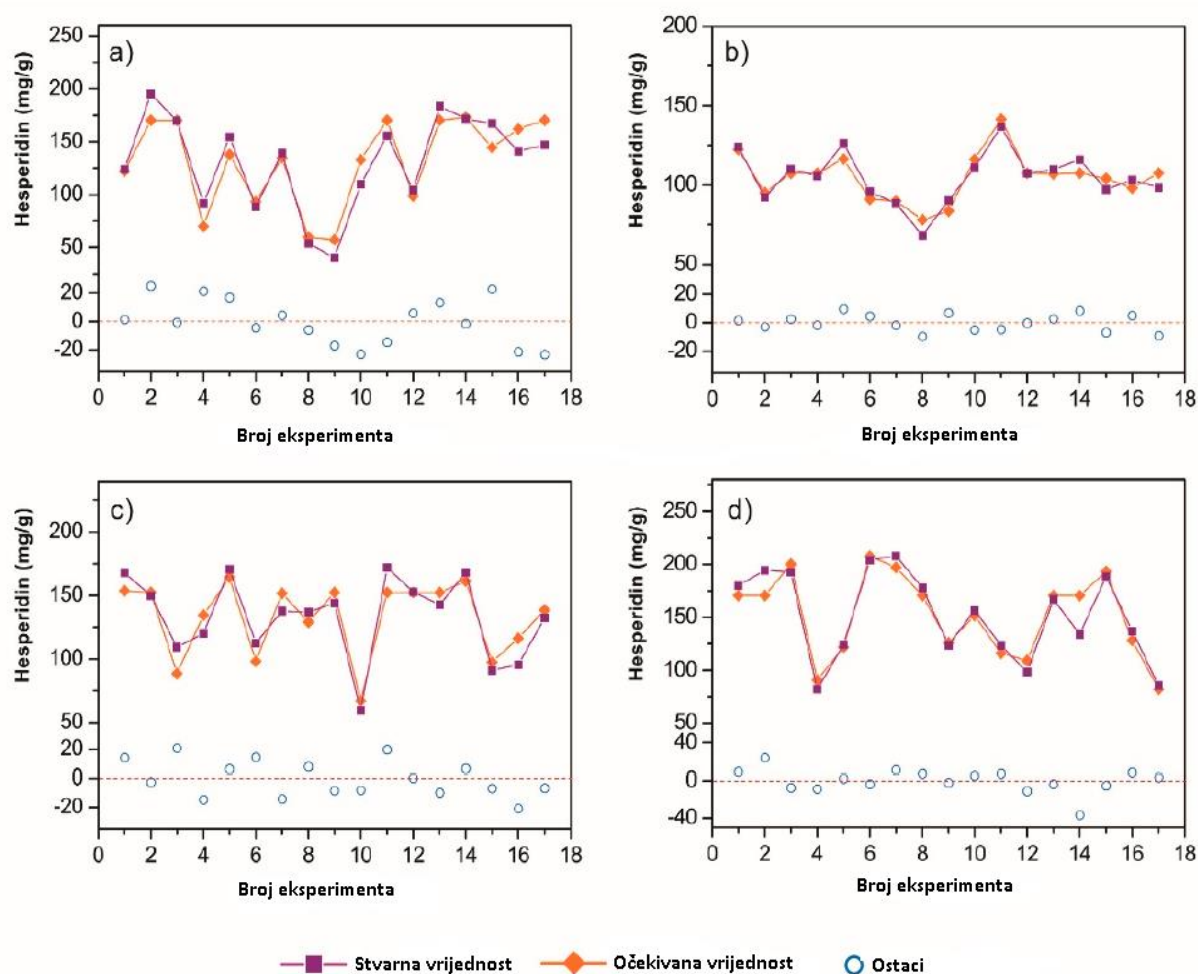
| <u>Naziv sorte</u> | Koeficijent | Standardna pogreška | F-vrijednost        | p vrijednost |
|--------------------|-------------|---------------------|---------------------|--------------|
| <u>Okitsu</u>      |             |                     |                     |              |
| <b>Odsječak</b>    | 8516,50     | 546,82              |                     |              |
| $X_1$              | -372,55     | 432,30              | 0,74                | 0,4173       |
| $X_2$              | 1636,34     | 432,30              | 14,33               | 0,0068       |
| $X_3$              | -667,38     | 432,30              | 2,38                | 0,1666       |
| $X_1^2$            | -472,18     | 595,88              | 0,63                | 0,4541       |
| $X_2^2$            | -1910,59    | 595,88              | 10,28               | 0,0149       |
| $X_3^2$            | -1723,12    | 595,88              | 8,36                | 0,0233       |
| $X_1X_2$           | 1255,52     | 611,37              | 4,22                | 0,0791       |
| $X_1X_3$           | -616,59     | 611,37              | 1,02                | 0,3468       |
| $X_2X_3$           | -927,40     | 611,37              | 2,30                | 0,1731       |
| $R^2=0.8703$       |             |                     |                     |              |
| <u>Chahara</u>     |             |                     |                     |              |
| <b>Odsječak</b>    | 5377,49     | 199,63              |                     |              |
| $X_1$              | -77,22      | 157,82              | 0,24                | 0,6396       |
| $X_2$              | 372,92      | 157,82              | 5,58                | 0,0501       |
| $X_3$              | -883,39     | 157,82              | 31,33               | 0,0008       |
| $X_1^2$            | -169,29     | 217,54              | 0,61                | 0,4619       |
| $X_2^2$            | -2,00       | 217,54              | $8,417 \times 10^5$ | 0,9929       |
| $X_3^2$            | -121,83     | 217,54              | 0,31                | 0,5929       |
| $X_1X_2$           | -149,61     | 223,20              | 0,45                | 0,5241       |
| $X_1X_3$           | -223,26     | 223,20              | 1,00                | 0,0399       |
| $X_2X_3$           | -561,93     | 223,20              | 2,30                | 0,1731       |
| $R^2=0.8677$       |             |                     |                     |              |

| <u>Kuno</u>        |          |        |       |        |
|--------------------|----------|--------|-------|--------|
| <u>Odsječak</u>    | 7615,8   | 424,57 |       |        |
| $X_1$              | 477,83   | 335,65 | 2,03  | 0,1976 |
| $X_2$              | 1119,15  | 335,65 | 11,12 | 0,0125 |
| $X_3$              | 429,21   | 335,65 | 1,64  | 0,2417 |
| $X_1^2$            | 564,54   | 335,65 | 1,49  | 0,2623 |
| $X_2^2$            | -1152,90 | 462,66 | 6,21  | 0,0415 |
| $X_3^2$            | -1450,46 | 462,66 | 9,83  | 0,0165 |
| $X_1X_2$           | -548,54  | 474,68 | 1,34  | 0,2858 |
| $X_1X_3$           | -909,23  | 474,68 | 3,67  | 0,0970 |
| $X_2X_3$           | -107,13  | 474,68 | 9,83  | 0,0165 |
| $R^2=0.8429$       |          |        |       |        |
| <u>Zorica rana</u> |          |        |       |        |
| <u>Odječak</u>     | 8534,27  | 433,84 |       |        |
| $X_1$              | 576,94   | 342,98 | 2,83  | 0,4173 |
| $X_2$              | 1623,64  | 342,98 | 22,41 | 0,0068 |
| $X_3$              | -1520,90 | 342,98 | 19,66 | 0,1666 |
| $X_1^2$            | -211,43  | 472,76 | 0,20  | 0,4541 |
| $X_2^2$            | -187,53  | 472,76 | 0,16  | 0,0149 |
| $X_3^2$            | -1623,41 | 472,76 | 11,92 | 0,0233 |
| $X_1X_2$           | -485,39  | 485,04 | 1,00  | 0,0791 |
| $X_1X_3$           | -1218,10 | 485,04 | 6,31  | 0,3468 |
| $X_2X_3$           | -187,53  | 485,04 | 1,16  | 0,1731 |
| $R^2=0.8703$       |          |        |       |        |

$X_1$ :vrijeme ekstrakcije,  $X_2$ :temperatura ekstrakcije,  $X_3$ :udio vode; utjecaj faktora je statistički značajan uz  $p \leq 0,05$



**Slika 10** Dijagrami odzivne površine prinosa hesperidina dobivenog ekstrakcijom iz različitih sorti mandarina: **a) Okitsu; b) Chahara; c) Kuno; d) Zorica rana**



**Slika 11** Grafička usporedba stvarnih i očekivanih vrijednosti ekstrahirane količine hesperidina iz svake sorte mandarina: **a)** *Okitsu*; **b)** *Chahara*; **c)** *Kuno*; **d)** *Zorica rana*

**Tablica 7** Eksperimentalna matrica i vrijednost promatranog odziva

| Broj eksperimenta | Vrijeme (min) | Temp. (°C) | H <sub>2</sub> O (%) | Okitsu                | Chahara | Kuno    | Zorica rana |
|-------------------|---------------|------------|----------------------|-----------------------|---------|---------|-------------|
|                   |               |            |                      | Hesperidin (mg/100 g) |         |         |             |
| 1                 | 90            | 30         | 20                   | 2022,74               | 5158,66 | 6617,40 | 7823,31     |
| 2                 | 30            | 30         | 20                   | 6200,53               | 4617,60 | 4551,48 | 4906,07     |
| 3                 | 30            | 50         | 30                   | 5501,38               | 4417,85 | 6882,87 | 6174,24     |
| 4                 | 90            | 50         | 30                   | 4444,75               | 3420,60 | 6006,90 | 4099,36     |
| 5                 | 60            | 50         | 20                   | 9765,96               | 5507,70 | 7492,07 | 8998,14     |
| 6                 | 60            | 50         | 20                   | 8490,48               | 5284,90 | 7204,11 | 9725,07     |
| 7                 | 60            | 70         | 30                   | 5219,36               | 4519,89 | 6844,10 | 6179,43     |
| 8                 | 60            | 50         | 20                   | 7791,07               | 5372,30 | 8606,40 | 8892,70     |
| 9                 | 60            | 50         | 20                   | 9177,64               | 5800,85 | 7639,82 | 8352,92     |
| 10                | 60            | 30         | 10                   | 2691,43               | 4863,57 | 2966,68 | 6204,44     |
| 11                | 30            | 50         | 10                   | 6964,46               | 6305,61 | 5633,57 | 6845,31     |

|    |    |    |    |         |         |         |          |
|----|----|----|----|---------|---------|---------|----------|
| 12 | 60 | 70 | 10 | 7047,41 | 6843,00 | 4772,36 | 10202,57 |
| 13 | 60 | 30 | 30 | 4572,97 | 4788,18 | 5466,93 | 4272,91  |
| 14 | 60 | 50 | 20 | 7357,35 | 4921,68 | 7137,02 | 6702,54  |
| 15 | 90 | 70 | 20 | 8577,96 | 5495,56 | 8405,48 | 10393,76 |
| 16 | 90 | 50 | 10 | 8374,19 | 6201,42 | 8394,51 | 9642,82  |
| 17 | 30 | 70 | 20 | 7733,68 | 5552,96 | 8533,71 | 9418,10  |

## **5. RASPRAVA**

S obzirom da su eutektička otapala pripremljena s različitim donorima vodika, posjeduju drugačija fizikalna i kemijska svojstva poput viskoznosti, pH, površinske napetosti i polarnosti. Svi navedeni parametri mogu imati značajan utjecaj na ekstrakciju hesperidina. Kako bi se odredilo najučinkovitije eutektičko otapalo za ekstrakciju hesperidina, proces ekstrakcije se proveo s 15 različitih otapala pri konstantnim procesnim parametrima.

Odabrani parametri ekstrakcije su bili 50°C, 20 % (v/v) udjela vode i 30 min. Vrijeme ekstrakcije od 30 min i temperatura ekstrakcije su izabrani na temelju vlastitog iskustva kao i prema radu Liu i sur. (2018) koji kaže da je 30 min optimalno vrijeme za ekstrakciju hesperidina. Udio vode je bitan za smanjivanje viskoznosti otapala, no visok udio vode smanjuje interakcije među komponentama stoga je odabran udio vode od 20 % (v/v).

Uobičajeni HPLC-DAD kromatogram i UV spektar standarda hesperidina su prikazani na **Slici 8a**, kao i HPLC kromatogram hesperidina iz uzoraka kora mandarina (**Slika 8b**).

Na dobiveni prinos hesperidina, utjecala je sorta mandarine te korišteno eutektičko otapalo što je vidljivo na **Slici 9**. Najveća količina hesperidina se ekstrahirala s eutektičkim otapalom ChCl-AA (102,0, 68,3, 88,7, 112,1 mg/g za sorte *Okitsu*, *Chahara*, *Kuno* i *Zorica rana*), dok se najmanja količina ekstrahirala s otapalom ChCl-CiA (3,3, 1,4, 9,8, 4,2 mg/g za sorte *Okitsu*, *Chahara*, *Kuno*, *Zorica rana*) zbog povećane viskoznosti samog otapala. Općenito, najveća količina hesperidina se ekstrahirala upotrebom bazičnih otapala poput ChCl-AA, ChCl-U i ChCl-NMeU (38,8-102,0, 26,8-68,7, 7,3-8,87, 17,6-112,1 mg/g za sorte *Okitsu*, *Chahara*, *Kuno* i *Zorica rana*). Slični rezultati su postignuti s eutektičkim otapalima kao što su ChCl-EG i ChCl-BDO, dok su najdjelotvornija kisela eutektička otapala bila ChCl-LeA i ChCl-Mac.

Prema radu Budavaria (1996), hesperidin je topljiv u razrijeđenim lužinama što je dokazano i u radu Al-Ashaala i sur. (2011) gdje je najveći prinos hesperidina dobiven ekstrakcijom lužnatim otopinama. S obzirom da se eutektičko otapalo ChCl-AA pokazalo kao najefikasnije za ekstrakciju, ono je korišteno za daljnje istraživanje i optimizaciju.

U svrhu optimizacije procesa ekstrakcije, nužno je ispitati utjecaj procesnih varijabli (vrijeme, temperatura, udio vode) na odziv (prinos hesperidina). Rezultati analize varijance (ANOVA) odzivnih modela prikazani su u **Tablici 5** kako bi se odredio statistički

značaj predloženih modela za svaki promatrani odziv. U ovome radu, promatrani odziv je količina ekstrahiranog hesperidina iz kora mandarina različitih sorti.

S obzirom na dobivene rezultate, regresijski modeli za sve ispitivane odzive *Citrus reticulata* sorti su bili značajni ( $p$ -vrijednost  $<0,05$ ), dok se kvaliteta razvijenih modela prikazala kroz  $R^2$  vrijednost i vrijednost nedostatka modela. Dobivene  $R^2$  vrijednosti za sve razvijene modele su bile u rasponu od 0,8429 do 0,8703. Dobiveni statistički podaci za sortu *Okitsu* pokazuju da vrijeme ekstrakcije i udio vode nemaju značajnog utjecaja na proces ekstrakcije hesperidina eutektičkim otapalima.

Međutim, varijable temperatura, kvadratne vrijednosti temperature te udio vode pokazuju značajan utjecaj na proces ekstrakcije što je vidljivo u **Tablici 6**.

Osim u slučaju sorte *Chahara*, temperatura je bila statistički značajan parametar za sve razvijene modele. Pokazalo se da povećanje temperature rezultira povećanim prinosom hesperidina. Što se tiče utjecaja udjela vode, kod sorti *Chahara* i *Zorica rana* parametar udjela vode bitno utječe na prinos hesperidina iz kora mandarina (**Slika 10**).

Udio vode je bitan faktor pošto smanjuje viskoznost otapala što poboljšava prijenos mase i sami proces ekstrakcije. No pretjerani udio vode može oslabiti interakcije među komponentama otapala, kao i interakcije otapala s željenom komponentom (Bi i sur., 2013). Dodavanje vode do 20 % (v/v) udjela smanjuje viskoznost otapala što pridonosi boljoj ekstrakciji, no daljnjim povećanjem udjela vode iznad 20 % (v/v) oslabljuju interakcije među komponentama, a samim time smanjuje se količina ekstrahiranog hesperidina. Pošto je hesperidin slabo topljiv u vodi, razumljivo je da dodatak vode smanjuje topljivost navedene komponente u otapalu. Za sortu *Okitsu*, dobiveni optimalni uvjeti ekstrakcije hesperidina su: vrijeme ekstrakcije od 90 min, temperatura ekstrakcije 68,14°C te udio vode od 13,83 %. Nadalje, optimalni uvjeti za ekstrakciju hesperidina iz sorte *Chahara* su izračunati na 45,40 min, temperaturu od 69,70°C i udio vode od 10,67 %, dok su optimalni uvjeti za ekstrakciju kod sorte *Kuno* određeni na 88,79 min, 55,02°C te 19,73 % udjela vode. Na kraju, optimalni uvjeti ekstrakcije za sortu *Zorica rana* su se uspostavili pri 54,72 min, temperaturi od 69,66°C te udjelu vode od 14,86 %. Ekstrakcija hesperidina kod svih sorti izvršena je eutektičkim otapalom kolin klorid:acetamid (1:2). Podaci dobiveni RSM analizom za svaku ispitivanu sortu u usporedbi s eksperimentalnim vrijednostima su bili u granicama odstupanja  $\pm 5$  %. U svrhu evaluacije dobivenih modela,

grafički su uspoređene stvarne vrijednosti i očekivane vrijednosti promatranog odziva za sve četiri sorte mandarina (**Slika 11**).

U dostupnoj literaturi nisu pronađeni podaci za ekstrakciju hesperidina eutektičkim otapalima i optimizaciju parametara za *Citrus reticulata*, no postoji nekoliko radova koji istražuju mogućnost ekstrakcije korištenjem drugih otapala. S obzirom da u navedenim radovima postoje razlike u korištenim sortama mandarina za analizu, kao i razlika u geografskom položaju te vremenu prikupljanja uzoraka, teško je usporediti rezultate s rezultatima dobivenim u ovom radu.

Tumbas i sur. (2010) ekstrahirali su hesperidin iz kora mandarina (*Citrus reticulata*) s vodenom otopinom acetona (70 % vode) tijekom 2 sata pri temperaturi 40°C na magnetskoj miješalici. Kvantitativna analiza je pokazala da je količina dobivenog hesperidina iz kora mandarina bila 31,42 mg/g biljke. U slučaju ekstrahiranja hesperidina iz kora mandarina hibridne sorte Kinnow, kao sredstvo za ekstrakciju korišteni su metanol i etanol. Dobivene količine hesperidina ekstrahiranog metanolom bile su u rasponu od  $44,38 \pm 1,08$  do  $61,02 \pm 1,17$  µg/g ekstrakta, a dobivene količine ekstrahirane etanolom od  $75,66 \pm 1,67$  do  $92,92 \pm 1,23$  µg/g ekstrakta (Safdar i sur., 2016).

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Nakon primjene 15 različitih eutektičkih otapala uočeno je da je najefikasnija ekstrakcija hesperidina postignuta korištenjem eutektičkog otapala kolin klorid:acetamid (1:2), dok je najmanje efikasno otapalo bilo kolin klorid:limunska kiselina (1:1).
- Dobiveni rezultati također ukazuju na bitan značaj sorte mandarine na količinu ekstrahiranog hesperidina. Najveća količina hesperidina je dobivena iz sorte *Zorica rana*, nakon koje slijedi sorta *Okitsu*.
- ANOVA je pokazala kako je temperatura ekstrakcije statistički značajan parametar (osim u slučaju sorte *Chahara*). Povećanje temperature rezultira povećanim prinosom hesperidina. Što se tiče udjela vode, kod sorti *Chahara* i *Zorica rana* parametar udjela vode bitno utječe na prinos hesperidina.
- Ovo istraživanje može biti vrlo korisno u svrhu dobivanja vrijednih bioaktivnih spojeva korištenjem novih metoda ekstrakcije. Također, može uvelike pridonijeti smanjenju količine otpada koji nastaje obradom agruma te daje mogućnost iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije. Na taj način bi se mogao zaokružiti proces proizvodnje hrane te bi se djelomično skinuo financijski i ekološki teret u mnogobrojnim granama prehrambene industrije.
- Prisutnost nepoznatih spojeva dobivenih HPLC analizom pruža dobar temelj za buduća istraživanja na temu ekstrakcije i separacije bioaktivnih komponenti prisutnih u korama citrusnog voća.

## **7. LITERATURA**

- Abbott AP, Barron JC, Ryder KS, Wilson D: Eutectic-based ionic liquids with metal-containing anions and cations, *Chemistry–European Journal* 13:6495–6501, 2007.
- Abbott AP, Bell TJ, Handa S, Stoddart B: Cationic functionalisation of cellulose using a choline based ionic liquid analogue, *Green Chemistry* 8:784-786, 2006.
- Abbott A.P, Boothby D, Capper G, Davies D.L, Rasheed R.K: Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids, *Journal of the American Chemical Society* 126, 9142-9147, 2004.
- Ajila CM, Bhat SG, Rao SP: Valuable Components of Raw and Ripe Peels from Two Indian Mango Varieties, *Food Chemistry* 102:1006 – 1011, 2007.
- Al-Ashaal HA, El-Sheltawy ST: Antioxidant capacity of hesperidin from *Citrus* peel using electron spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines, *Pharmaceutical Biology* 49:276-282, 2011.
- Bakarić P: Uzgoj mandarine u Nišu, *Stanica za južne kulture*, Dubrovnik, 1983.
- Batinović T: Uzgoj mandarine na području općina Metković i Opuzen, završni rad, Zagreb, 2011.
- Bezzera MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* 5:965-977, 2008.
- Bi W, Tian M, Row KH: Evaluation of alcohol based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization, *Journal of Chromatography* 1285:22-30, 2013.
- Bradley N: The Response Surface Methodology, *Master of Science*, South Bend, IN, 2007.
- Budavari S: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 12th ed., USA, 1996.
- Cerjan-Stefanović Š, Drevenkar V, Jurišić B, Medić-Šarić M, Petrović M, Šegudović N, Švob V, Turina S: Kromatografsko nazivlje, Zagreb, 1999.
- Cvjetko Bubalo M, Panić M, Radošević K, Radojčić Redovniković I: Metode pripreve eutektičkih otapala, 2016.
- Dai Y, Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH: Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents, *Journal of Natural Products* 11:2162-2173, 2013.
- Ettre LS: Nomenclature for Chromatography, *Pure & Applied Chemistry* 65:819-872, 1993.
- Gambino M, Gaune P, Nabavian M, Gaune-Escard M: Enthalpie de fusion de l'uree et

- de quelques melanges eutectiques a base d'uree, *Thermochimica Acta* 111:37-47, 1987.
- Garg A, Garg S, Zaneveld L, Singla A: Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin, *Phytotherapy Research* 15:655-669, 2001.
- Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE: Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat, *Il Farmaco* 9:683-687, 2001.
- Huang YS, Ho SC: Polymethoxy flavones are responsible for the ant-inflammatory activity of citrus fruit peel, *Food Chemistry* 119:868-873, 2010.
- Ignat I, Volf I, Popa VI: A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry* 126:1821-1835, 2011.
- Ismail I, Gabry MS, Abdalla SK, Ibrahim MA: P53 sensitizes human cololcancer cells to hesperidin through upregulation of Bax and P21, 2012.
- Jung UJ, Lee MK, Jeong KS, Choi MS: The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice, *Journal of nutrition* 10:2499-2503, 2004.
- Kaštelan-Macan M: Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Zagreb, 2003.
- Kelly MT: High performance liquid chromatographic separations in biopharmaceutical Analysis, Dublin, 1989.
- Kimball D: Oranges and Tangerines: Processing fruits, Lancaster, 1996.
- Kupiec T: Quality-control analytical methods: High-performance liquid chromatography, Oklahoma City, 2004.
- Liu Y, Zhang H, Yu H, Guo S, Chen D: Deep eutectic solvent as a green solvent for enhanced extraction of narirutin, naringin, hesperidin and neohesperidin from *Aurantii Fructus*, *Phytochemical Analysis* 2:156-163, 2018.
- Liyana-Pathirana C, Shahidi F: Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology, *Food Chemistry* 93:47-56, 2005.
- Lota ML, de Rocca Serra D, Tomi F, Casanova J: Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins, *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 61-78, 2000.
- Lovrić T: Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Zagreb, 2003.

- Lu Y, Zhang C, Bucheli P, Wei D: Citrus flavonoids in fruit and traditional Chinese medicinal food ingredients in China, *Plant Foods for Human Nutrition* 2:57-65, 2006.
- Ma Y, Ye X, Hao Y, Xu G, Liu D: Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel, *Ultrasonics Sonochemistry* 3:227-232, 2008.
- Mamma D, Christakopoulos P: Biotransformation of citrus by-products into value added products, *Waste and Biomass Valorization* 5:529-549, 2014.
- Manthev JA, Guthrie N: Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 21:5837-5843, 2002.
- Mazza G: Gas chromatography and mass spectrometry study of the aromatic composition of mandarin essential oil, *Science of Alimenation* 4:459-479, 1987.
- Montgomery DC, Runger GC: Applied statistics and probability for engineers, New York, 2003.
- Moulehi I, Bourgou S, Ourghemmi I, Saidani Tounsi M: Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts, *Industrial Crops and Products* 1:74-80, 2012.
- Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM: Response surface methodology: Process and Product Optimisation Using Designed Experiments, New Jersey, 2009.
- Parhiz H, Roohbaksh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M: Antioxidant and inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperitin, *Phytotherapy research* 3:323-331, 2014.
- Plotka-Wasyłka J, Rutkowska M, Owczarek K, Tobiszewski M, Namiesnik J: Extraction with environmentally friendly solvents, *Trends in Analytical Chemistry* 91:12-25, 2017.
- Praloran JC: Les Agrumes, Paris, 1971.
- Rafiq S, Kaul R, Sofi SA, Bashir N, Nazir F, Navik GA: Citrus peel as a source of functional ingredient: A review, University of agricultural sciences and technology, Punjab, 2016.
- Roohbaksh A, Parhiz A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M: Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperitin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases, *Life Science* 124:64-74, 2015.
- Rosković M: Validacija u analitičkoj kemiji, završni rad, Zagreb, 2014.
- Safdar MN, Kausar T, Jabbar S, Mumtaz A, Ahad K, Saddozai AA.: Extraction and

- quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques, *Journal of Food and Drug Analysis* 3:488-500, 2016.
- Shahbaz K, Mjalli FS, Hashim A, Al Nashef M: Prediction of deep eutectic solvents densities at different temperatures, *Thermochimica Acta* 515:67-72, 2011.
- Sharma K, Mahato N, Cho MH, Lee YR: Converting citrus wastes into value added products: Economic and environmentally friendly approaches, *Nutrition* 34:29-46 2017.
- Skoog DA, Crouch SR, Holler FJ: Principles of instrumental analysis, Belmont, 2007.
- Sun Y, Wang J, Gu S, Liu Z, Zhang Y, Zhang X: Simultaneous determination of flavonoids in different parts of *Citrus reticulata* 'Chachi' fruit by high performance liquid chromatography- photodiode array detection, *Molecules* 15:5378-5388, 2010.
- Tanaka T: Citologia: semi centennial commemoration papers on Citrus studies, Osaka, 1961.
- Teixeira A, Baenas N, Dominguez-Perles R, Barros A, Rosa E, Moreno DA, Garcia Viguera C: Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review, *International Journal of Molecular Science* 15:15638-15678, 2014.
- Tumbas VT, Cetković GS, Djilas SM, Čanadanović-Brunet JM, Vulić JJ, Knez Ž, Škerget M: Antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata*) peel, *Acta periodica technologica* 40:195-203, 2010.
- USDA: United States Department of Agriculture/Foreign Agricultural Service, <http://www.fas.usda.gov>, 2010.
- Van den Bruinhorst A, Kouris P, Timmer JMK, de Croon MHJM, Kroon MC: Exploring orange peel treatment with deep eutectic solvents and diluted organic acids, *Natural Products Chemistry and Research* 4:1-5, 2016.
- Zhang Y, Lu XH, Feng X, Shi YJ, Ji XY: Properties and Applications of Choline-Based Deep Eutectic Solvents, *Progress in Chemistry* 25:881-892 2013.
- Zhao H, Zhang C, Crittle TD: Choline based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 85-86:243-247, 2013.