

# Primjena eutektskih otapala u ekstrakciji hesperidina iz kora mandarina

---

**Kolarević, Filip**

**Supplement / Prilog**

*Publication year / Godina izdavanja:* **2020**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:555712>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-15**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

*Repository / Repozitorij:*

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






Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet

# PRIMJENA EUTEKTIČKIH OTAPALA U EKSTRAKCIJI HESPERIDINA IZ KORA MANDARINA

**Filip Kolarević**

Mentor: prof. dr. sc. Stela Jokić  
Komentor: izv. prof. dr. sc. Maja Molnar

Osijek, svibanj 2020.



Katedra za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale & Katedra za kemiju i ekologiju




PTF  
OS



*Eksperimentalni dio diplomskog rada realiziran je u sklopu projekta "Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda biljnoga podrijetla" (HRZZ-UIP-2017-05-9909).*

Article

# Sustainable Green Procedure for Extraction of Hesperidin from Selected Croatian Mandarin Peels

Stela Jokić <sup>1</sup>, Silvija Šafranko <sup>1,\*</sup>, Martina Jakovljević <sup>1</sup>, Ana-Marija Cikoš <sup>1</sup>, Nikolina Kajić <sup>2</sup>, Filip Kolarević <sup>1</sup>, Jurislav Babić <sup>1</sup> and Maja Molnar <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia

<sup>2</sup> Faculty of Agronomy and Food Technology, University of Mostar, Biskupa Čule bb, 88000 Mostar, Bosnia and Herzegovina

\* Correspondence: silvija.safranko@ptfos.hr; Tel.: +385-31-224-348

Received: 27 June 2019; Accepted: 18 July 2019; Published: 20 July 2019



**Abstract:** The peels of *Citrus reticulata* Blanco mandarin cultivars of different Croatian varieties (*Zorica rana*, *Chahara*, *Okitsu*, *Kumo*) were extracted using 15 different choline chloride-based deep eutectic solvents (DESs) at 50 °C for 30 min and with 20% water addition. The extracts were analyzed by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) to determine the most suitable DES for the extraction of hesperidin in the samples. The screening results indicated that choline chloride: acetamide (1:2) provided the most efficient hesperidin extraction (112.14 mg/g of plant), while choline chloride: citric acid (1:1) solvent showed the lowest hesperidin yield (1.44 mg/g of plant). The Box–Behnken design was employed to optimize extraction parameters for each variety of mandarin peel, including extraction time, temperature and water content on hesperidin extraction. The results indicated that hesperidin content in mandarin peels was completely variety-dependent. Being a novel and efficient green media for hesperidin extraction, deep eutectic solvents could also serve as promising solvent systems for the production of extracts rich in bioactive compounds.

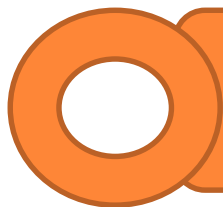
**Keywords:** by-product; deep eutectic solvents; hesperidin; mandarin peel; optimization

## 1. Introduction

Citrus fruits are one of the most important crops with worldwide production, while citrus by-products represent a problem regarding their disposal due to the environmental risk. Traditionally, the waste was either burned, causing an increase in carbon dioxide and other greenhouse gasses, or used for cattle feed, but to decrease environmental risk the concept was developed for obtaining the



U V O D



## Zadatak rada



Utvrđiti koje otapalo daje najveće iskorištenje hesperidina ekstrahiranog iz kora mandarina



Ispitati utjecaj procesnih parametara ekstrakcije na prinos hesperidina iz kora mandarina četiri različite hrvatske sorte (*Zorica rana*, *Okitsu*, *Kuno*, *Chahara*)



Provesti optimizaciju procesa ekstrakcije uz primjenu programa *Design Expert*<sup>®</sup>, v.7, metodom odzivnih površina



# TEORIJSKI DIO

# *Citrus reticulata* Blanco

*mandarina*



Okitsu



Kuno

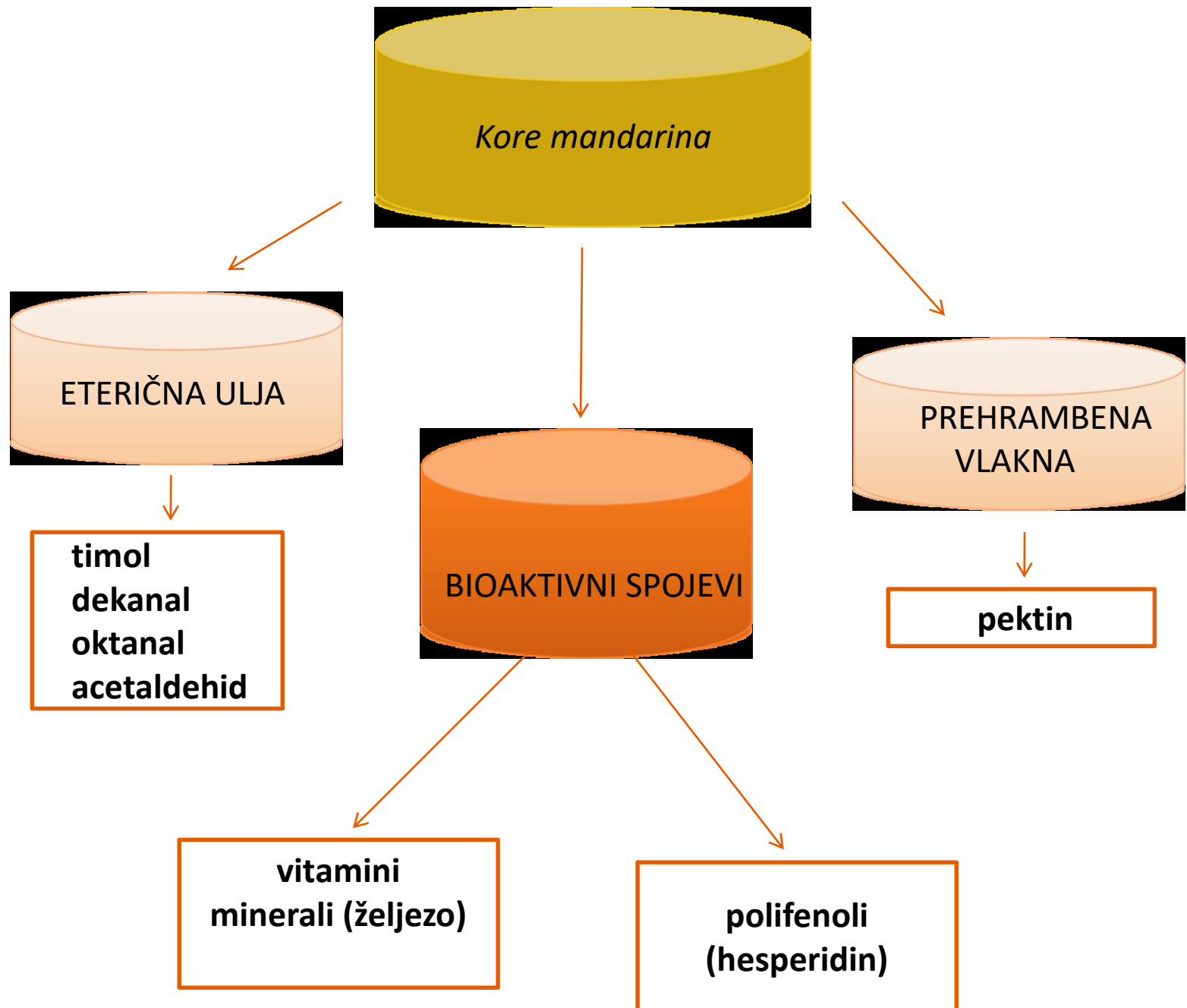


Chahara



Zorica rana





Kore mandarina su nusproizvodi prerade citrusa  
->u većini slučajeva se bacaju (50% s.t.)  
->potencijalni ekološki problemi i trošak

Bogate su bioaktivnim spojevima->u teoriji bi se  
mogle koristiti kao obnovljivi izvor prirodnih  
antioksidanasa->odgovarajuće metode  
ekstrakcije (ekstrakcija eutektičkim otapalima)



# Ekstrakcija

-jedna od temeljnih separacijskih tehnika; na principu molekulske difuzije

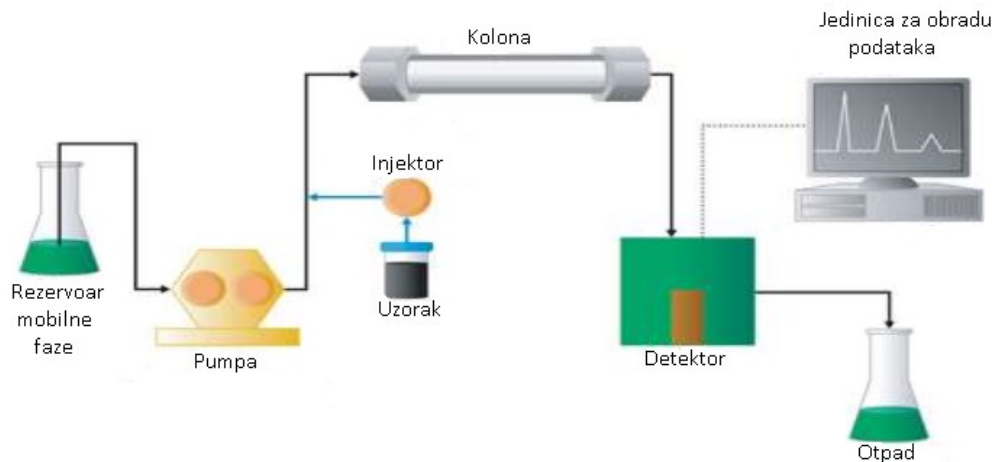
-ekstrakcija otapalima je konvencionalna metoda, najčešće upotrebljavana tehnika->degradacija željenih komponenti (visoke temperature, dugo vrijeme ekstrakcije)->korištenje novih i inovativnih metoda (ekstrakcija superkritičnim tekućinama, mikrovalovima, eutektičkim otapalima...)

-prednosti korištenja eutektičkih otapala: biokompatibilna su, netoksična, biorazgradiva su, jeftina za pripremu

# Visoko tlačna tekućinska kromatografija (HPLC)

-separacija i kvantifikacija komponenti koje su otopljene u zadanom otapalu

-vrlo efikasna metoda idealna u analizi termolabilnih i neisparljivih spojeva



**Optimizacija – poboljšanje svojstava nekog sustava ili procesa uz postizanje maksimalnog prinosa uz što manje troškove.**

**Metoda odzivnih površina (*engl. Response Surface Methodology-RSM*)**

Odabir nezavisnih varijabli  
(parametara)

Izbor dizajna eksperimenta i  
provođenje eksperimenta

Aproksimacija eksperimentalnih  
podataka

Evaluacija prikladnosti modela

**Određivanje optimalnih  
vrijednosti ispitivanih varijabli**

Box-Behnken, centralno  
kompozitni i dr.

Polinom drugog reda



# EKSPERIMENTALNI DIO



**Okitsu**



**Kuno**

**Akceptori vodika**  
kvarterne amonijeve  
ili metalne soli



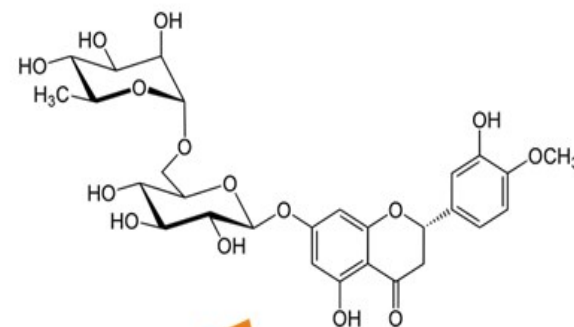
**Donori vodika**  
amidi  
karboksilne kiseline  
alkoholi  
šećeri



**Zorica rana**



**Chahara**



Ekstrakcija hesperidina iz kora mandarina korištenjem eutektičkih otapala

Temperatura ekstrakcije-30,50,70°C  
 Vrijeme ekstrakcije-30,60,90 min  
 Udio vode-10,20,30 %

# Određivanje hesperidina na HPLC sustavu

- Izokratno eluiranje (voda kao faza A, acetonitril kao faza B); sobna temperatura; vrijeme=10min; protok 1ml/min; UV detektor





Aproksimacija eksperimentalnih podataka  
matematičkim modelom

Nezavisne  
varijable

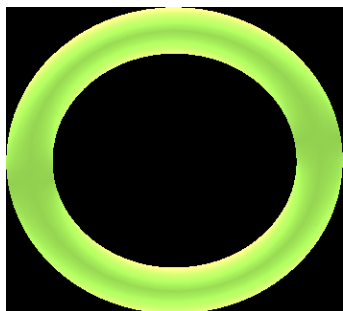
$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

Prozantirni odziv

Statistička analiza  
ANOVA

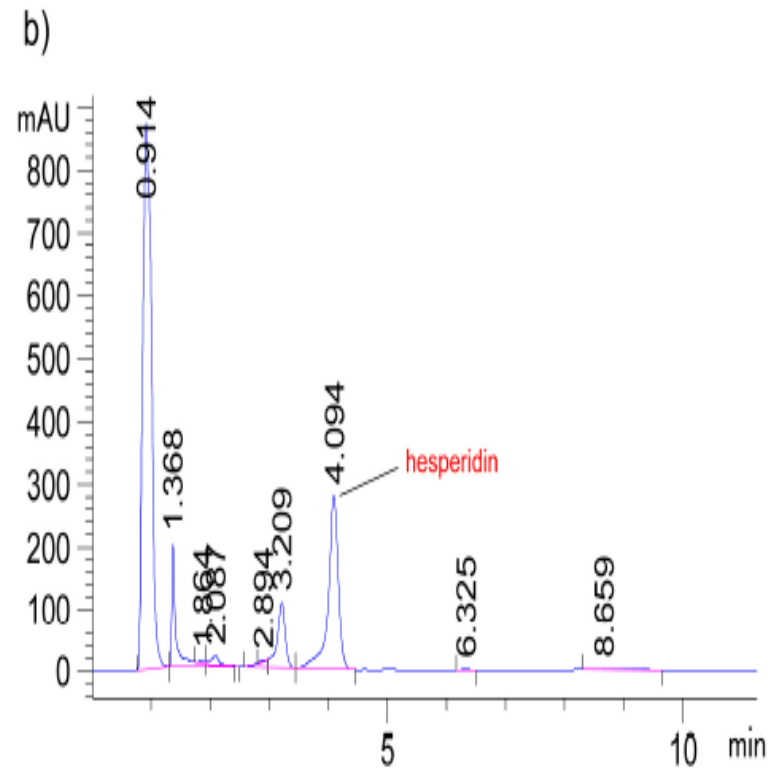
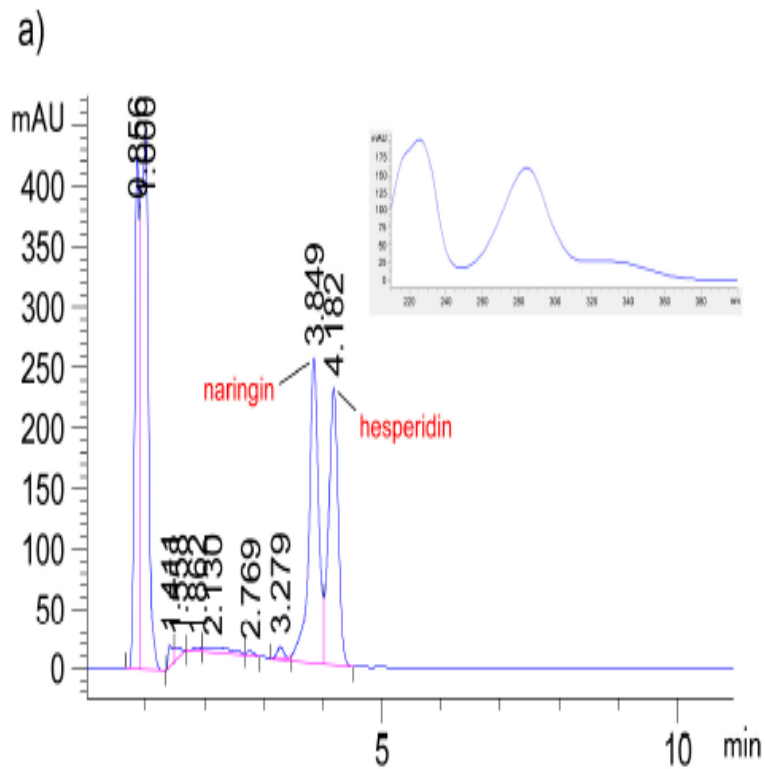
$X_3$  – Udio vode (10, 20,  
30 %)

Numerička  
optimizacija

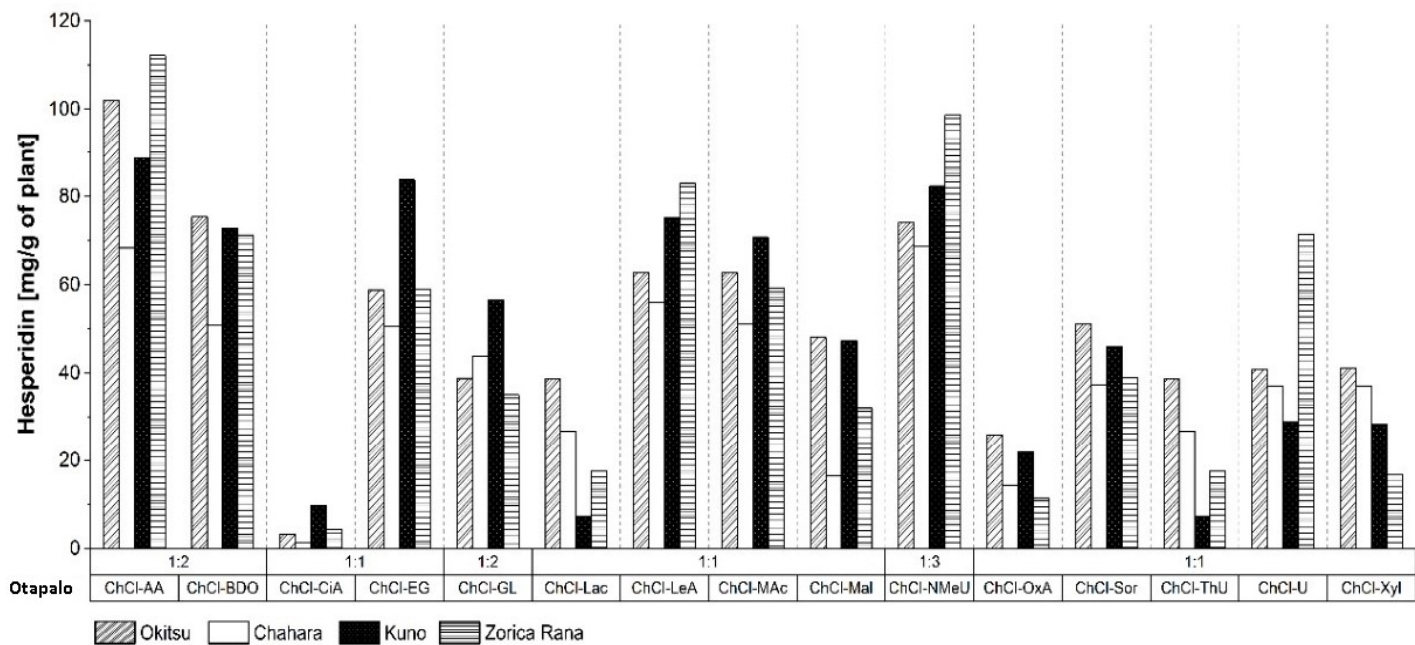


# REZULTATI I RASPRAVA

**a)** HPLC kromatogram standarda naringina i hesperidina (ubačen je i UV spektar standarda hesperidina); **b)** kromatogram hesperidina u uzorcima kora mandarina



# Usporedna analiza dobivenih prinosa hesperidina korištenjem različitih eutektičkih otapala na bazi kolin klorida



## 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><i>Okitsu</i></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><i>Chahara</i></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><i>Kuno</i></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><i>Zorica rana</i></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			

## Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda za udio hesperidina

Naziv sorte	Koeficijent	Standardna pogreška	F-vrijednost	p-vrijednost
<b>Okitsu</b>				
Odsječak	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
<b><math>R^2=0,8703</math></b>				
<b>Chahara</b>				
Odsječak	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
<b><math>R^2=0,8677</math></b>				

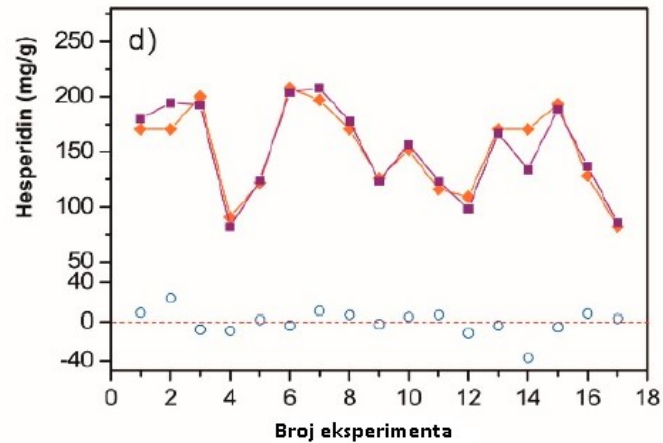
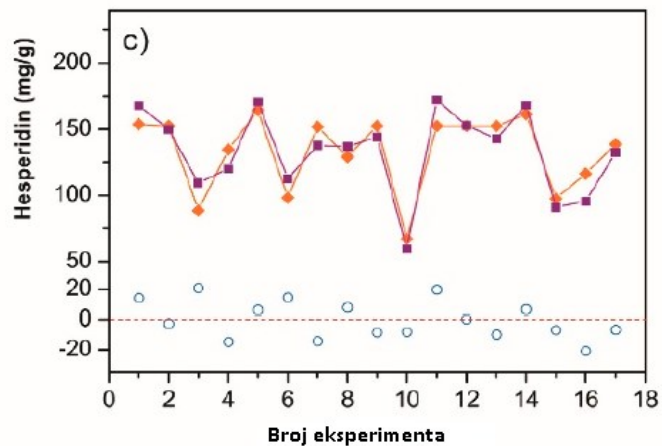
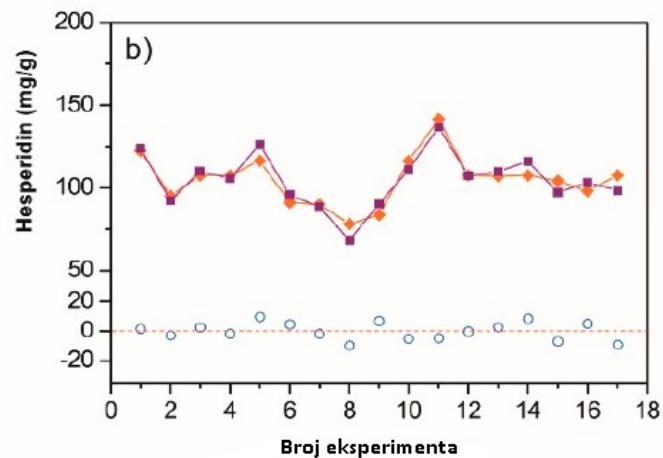
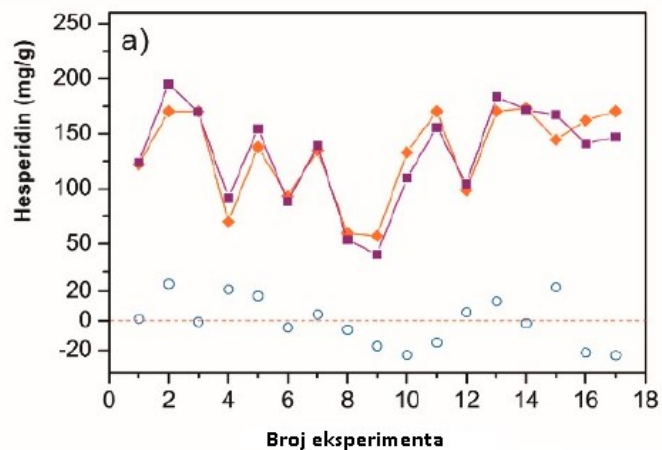
$X_1$ :vrijeme ekstrakcije, $X_2$ :temperatura ekstrakcije, $X_3$ :udio vode; utjecaj faktora je statistički značajan za  $p \leq 0,05$

## Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda za udio hesperidina

Naziv sorte	Koeficijent	Standardna pogreška	F-vrijednost	p-vrijednost
<b>Kuno</b>				
<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
<b>Zorica rana</b>				
<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
<b><math>R^2=0,8703</math></b>				

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

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



—■— Stvarna vrijednost    —◆— Očekivana vrijednost    ○ Ostaci

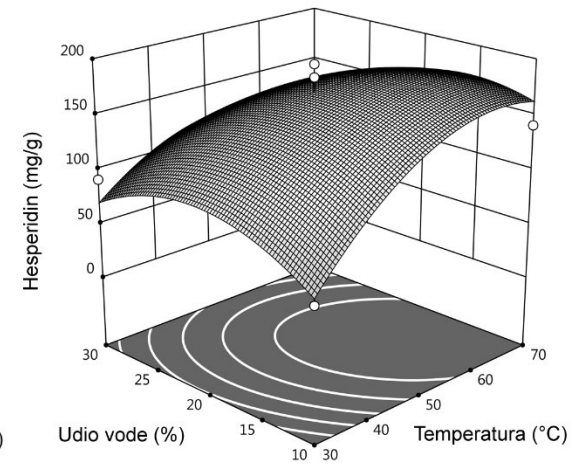
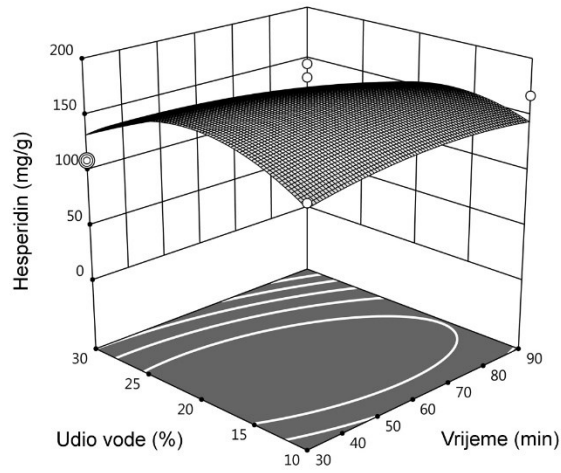
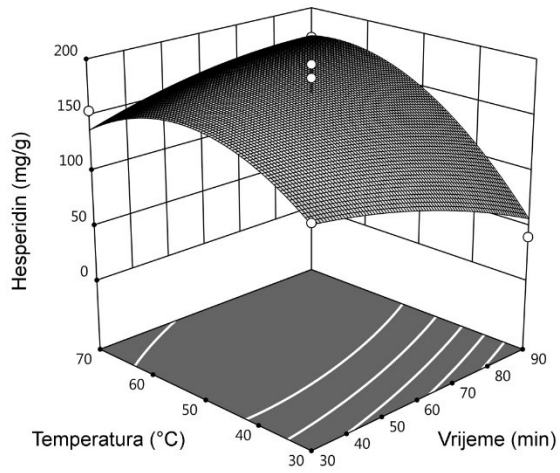


## Ekperimentalna matrica i vrijednost promatranog odziva

				Okitsu	Chahara	Kuno	Zorica rana
Broj eksperimenta	Vrijeme (min)	Temp. (°C)	H <sub>2</sub> O (%)	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

# 3D DIJAGRAMI UTJECAJA ISPITIVANIH VARIJABLI NA PRINOS HESPERIDINA

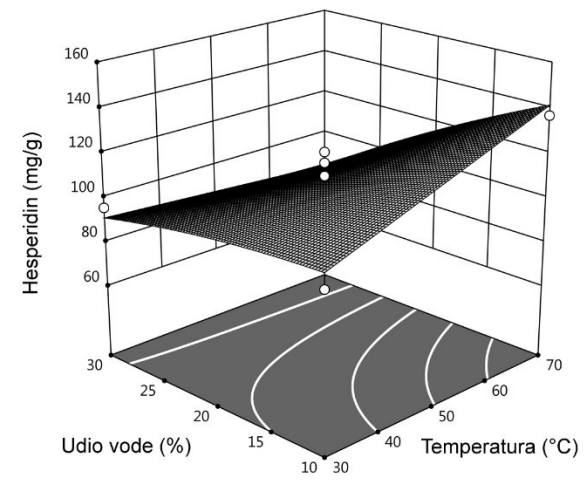
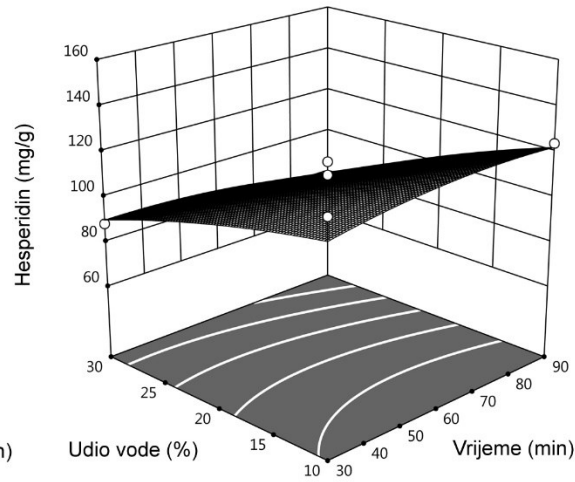
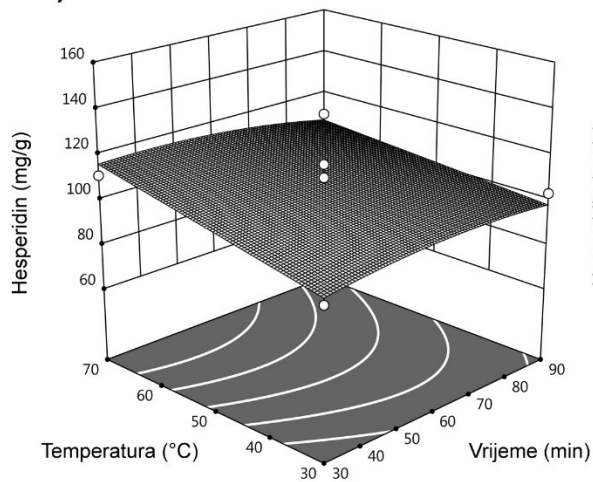
a)



*Okitsu*

# 3D DIJAGRAMI UTJECAJA ISPITIVANIH VARIJABLI NA PRINOS HESPERIDINA

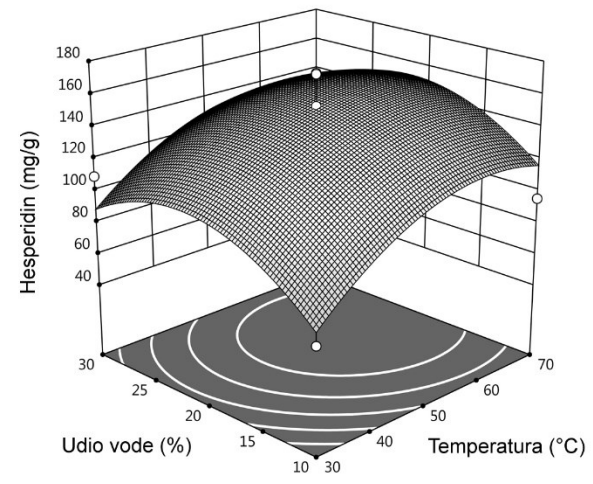
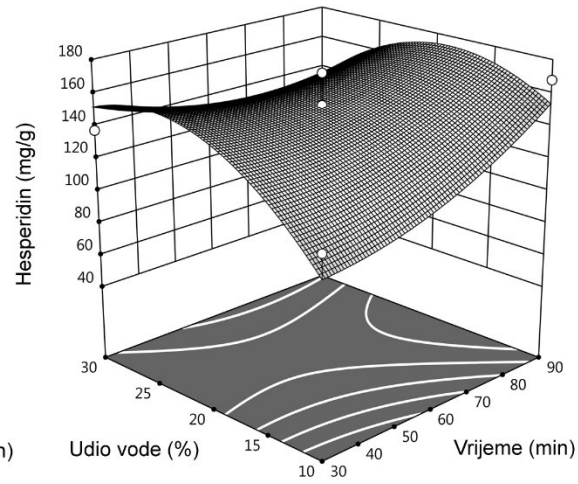
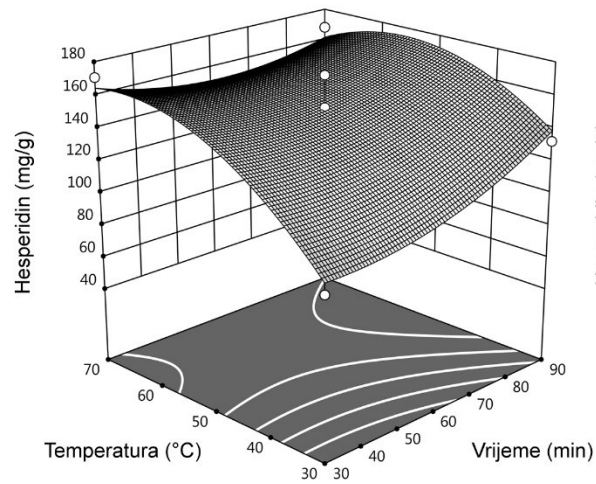
b)



*Chahara*

# 3D DIJAGRAMI UTJECAJA ISPITIVANIH VARIJABLI NA PRINOS HESPERIDINA

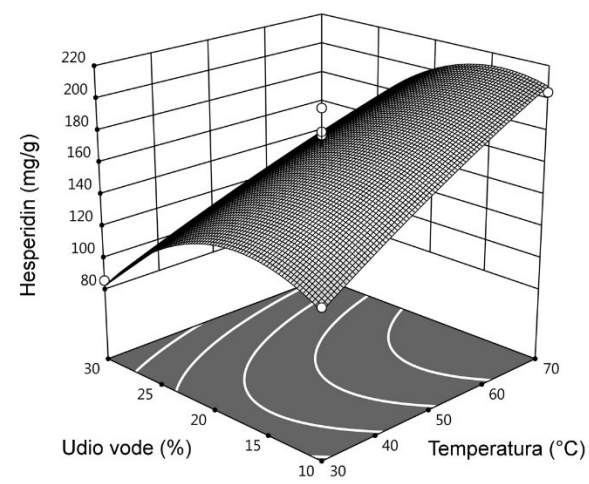
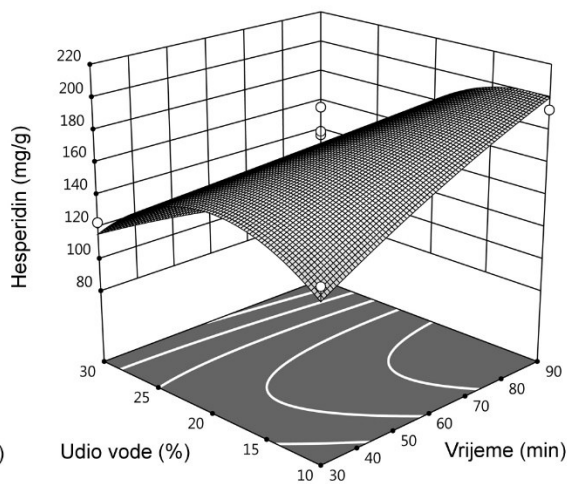
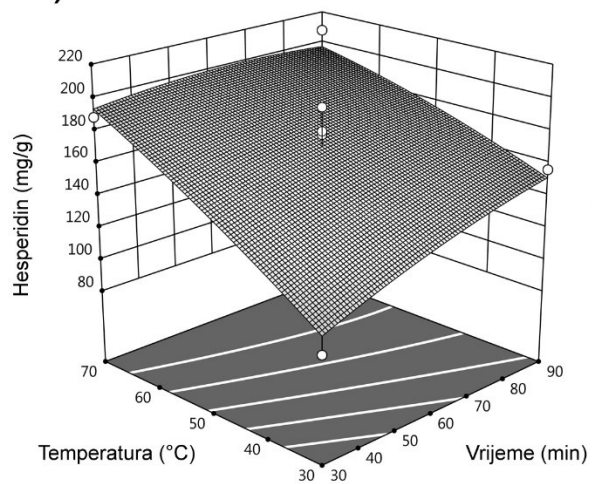
c)



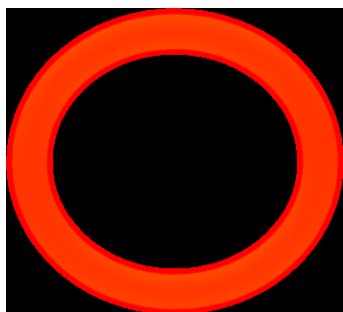
*Kuno*

# 3D DIJAGRAMI UTJECAJA ISPITIVANIH VARIJABLI NA PRINOS HESPERIDINA

d)



*Zorica rana*



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.

*Hvala na pažnji !!! 😊*