

Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet

Sveučilišta u Mostaru

Prehrambeno inženjerstvo

Maja Matić

**EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ
DUHANSKOG OTPADA PRIMJENOM EUTEKTIČKIH
OTAPALA**

DIPLOMSKI RAD

Mostar, srpanj 2019.

Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet
Sveučilišta u Mostaru
Prehrambeno inženjerstvo

Maja Matić

EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ DUHANSKOG
OTPADA PRIMJENOM EUTEKTIČKIH OTAPALA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj diplomskog rada: prof. dr. sc. Stela Jokić

Mostar, srpanj, 2019.

Ovaj diplomski rad ocijenjen je i obranjen dana _____, s ocjenom
_____ pred povjerenstvom u sastavu:

Prof. dr. sc. Mate Bilić, predsjednik

Prof. dr. sc. Stela Jokić, član-mentor

Prof. dr. sc. Drago Šubarić, član

Izv. prof. dr. sc. Anita Ivanković, zamjena člana

AGRONOMSKI I PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
SVEUČILIŠTA U MOSTARU

IME I PREZIME STUDENTA/ICE: _____ Maja Matić _____

MATIČNI BROJ: 357/DS

IZJAVA STUDENTICE O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Izjavljujem da sam diplomski rad pod nazivom

EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ DUHANSKOG OTPADA
PRIMJENOM EUTEKTIČKIH OTAPALA

izradila samostalno.

Svi dijelovi rada, nalazi ili ideje koje su u radu citirane ili se temelje na drugim izvorima, bilo da su u pitanju knjige, znanstveni ili stručni članci, internet stranice, zakoni i sl. u radu su jasno označeni kao takvi te adekvatno navedeni u fusnotama ili u popisu literature.

U Mostaru, _____

Potpis studentice

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

**Agronomski i prehrambeno-tehnološki fakultet
Sveučilišta u Mostaru
Biskupa Čule bb 88 000 Mostar BiH**

Znanstveno područje:	Biotehničke znanosti
Znanstveno polje:	Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet:	Tehnološko projektiranje II
Tema rada	je prihvaćena na XLVII. sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog i prehrambeno-tehnološkog fakulteta održanoj 11. travnja 2019. godine.
Mentor:	Prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i>
Pomoć pri izradi:	<i>Marija Banožić</i> , mag. preh. ing.

**EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ DUHANSKOG OTPADA PRIMJENOM
EUTEKTIČKIH OTAPALA**

Maja Matić, 357/DS

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je istražiti učinkovitost eutektičkih otapala u ekstrakciji bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada. Ekstrakcija eutektičkim otapalima na duhanskom otpadu još uvijek nije dovoljno istražena te pretraživanjem dostupnih baza podataka nisu pronađeni znanstveni radovi koji se bave takvim istraživanjem. Zbog toga predloženo istraživanje, predstavlja inovativan pristup ekstrakciji bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada. Prije provedbe ekstrakcije, proveden je *screening* različitih eutektičkih otapala, te je na temelju tih preliminarnih rezultata postavljen eksperimentalni plan pokusa. Provedbom eksperimenata prema Box-Behnkenovom planu pokusa utvrđen je utjecaj procesnih parametara ekstrakcije na svojstva samog ekstrakta (ukupne fenole, antioksidacijsku aktivnost, udio klorogenske kiseline i rutina). Postupkom optimizacije, određeni su optimalni parametri za dobivanje ekstrakata poželjnih svojstava. Značenje predloženog istraživanja, ogleda se u maksimalnom iskorištavanju nusproizvoda biljnoga podrijetla, u cilju dobivanja ekstrakata koji se mogu implementirati u druge proizvode i procese. Time je proces prerade duhana zaokružen i ne stvara se velika količina otpada koja predstavlja ogroman financijski i ekološki teret.

Ključne riječi:	duhanski otpad, eutektička otapala, ekstrakcija, HPLC, optimizacija, metoda odzivnih površina
Rad sadrži:	72 Stranice 18 Slika 13 Tablica 1 Prilog 122 Literaturne reference
Jezik izvornika:	Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	Prof. dr. sc. <i>Mate Bilić</i>	Predsjednik
2.	Prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i>	Član-mentor
3.	Prof. dr. sc. <i>Drago Šubarić</i>	Član
4.	Izv. prof. dr. sc. <i>Anita Ivanković</i>	Zamjena člana

Datum obrane: 19. srpnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University of Mostar
Faculty of Agriculture and Food Technology

Scientific area:	Biotechnical sciences
Scientific field:	Food technology
Course title:	Technological design II
Thesis subject	was approved by the Faculty Council of the Faculty of Agriculture and Food Technology at its session no. XLVII held on April 11th 2019.
Mentor:	<i>Stela Jokić</i> , PhD, full prof.
Technical assistance:	<i>Marija Banožić</i> , MSc

EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM TOBACCO WASTE USING DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Maja Matić, 357/DS

Summary:

The objective of these study was to investigate the efficacy of eutectic solvents in the extraction of bioactive compounds from tobacco waste. The exposure to eutectic solvents on tobacco waste has not yet been sufficiently examined, and by checking the available databases, no scientific research papers have been found on this topic. Therefore, the proposed research is an innovative approach in the extraction of bioactive compounds from tobacco waste. Prior to the extraction, screening of various eutectic solvents was carried out. Based on the screening results, the plan design of experiments was set up. According to Box-Behnken's design and Response Surface Methodology the influence of process extraction parameters on the properties of the obtained extracts itself (total phenol, antioxidant activity, chlorogenic acid and rutine) has been determined. By optimization procedure, the optimal parameters for obtaining extracts with desired properties were determined. The meaning of the proposed research is reflected in the maximum utilization of the by-product of plant origin, in order to obtain extracts that can be implemented in other products and processes. Thus, the process of tobacco processing is rounded up and no large amount of waste is generated which is a huge financial and ecological problem.

Key words:	tobacco waste, eutectic solvents, extraction, HPLC, optimization, response surface methodology
Thesis contains:	72 Pages 18 Figures 13 Tables 1 Supplement 122 References
Original in:	Croatian

Defense committee:

1.	<i>Mate Bilić</i> , PhD, full prof.	chair person
2.	<i>Stela Jokić</i> , PhD, full prof.	supervisor
3.	<i>Drago Šubarić</i> , PhD, full prof.	member
4.	<i>Anita Ivanković</i> , PhD, associate prof.	replacement member

Defense date: July 19, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	4
2.1. DUHAN.....	5
2.1.1. Građa duhana	6
2.1.2. Kemijski sastav duhana	6
2.2. DUHANSKI OTPAD	7
2.2.1. Načini obrade duhanskog otpada.....	8
2.2.2. Nastanak duhanskog otpada	10
2.2.3. Sastav duhanskog otpada.....	11
2.2.4. Bioaktivne komponente prisutne u duhanskom otpadu.....	11
2.2.4.1. Alkaloidi	11
2.2.4.2. Solanesol.....	12
2.2.4.3. Rutin	12
2.2.4.4. Sklareol.....	13
2.2.4.5. Niacinamid	13
2.2.4.6. Klorogenska kiselina	13
2.2.3.7. Bjelančevine	13
2.2.3.8. Organske kiseline	14
2.2.3.9. Ugljikohidrati	14
2.2.3.10. Ostale bioaktivne komponente u sastavu duhanskog otpada.....	14
2.3. EKSTRAKCIJA	15
2.3.1. Ekstrakcija eutektičkim otapalima.....	16
2.3.1.1. DES u analitičkoj kemiji.....	19
2.3.1.2. Priprema eutektika.....	20

2.4. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE	21
2.4.1. Box-Behnkenov plan pokusa.....	24
3. EKSPERIMENTALNI DIO	27
3.1. ZADATAK.....	28
3.2. MATERIJALI.....	28
3.2.1. Kemikalije	29
3.2.2. Uređaji	29
3.3. METODE	30
3.3.1. Priprava eutektičkih otapala	30
3.3.2. <i>Screening</i> eutektičkih otapala i tri vrste duhanskog otpada	32
3.3.3. Određivanje ukupnih fenola	33
3.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	35
3.3.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	36
3.3.6. Optimiranje procesa ekstrakcije duhanskog otpada s eutektičkim otapalima primjenom metode odzivnih površina	37
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	39
4.1. OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE EUTEKTIČKIM OTAPALIMA IZ DUHANSKOG OTPADA PRIMJENOM METODE ODZIVNIH POVRŠINA	45
5. ZAKLJUČCI	57
6. LITERATURA	59
7. PRILOZI.....	71

Popis oznaka, kratica i simbola

AIV – Virus ptičje gripe (engl. *Avian Influenza Viruses*)

ANOVA - Analiza varijance (engl. *Analysis Of Variance*)

BBD – Box-Behnkenov plan pokusa (engl. *Box-Behnken design*)

C - ugljik

Cd - kadmij

ChCl – kolin klorid

Cu – bakar

CQAs - kafeoilkine kiseline (engl. *Caffeoylquinic Acids*)

D - željena funkcija (engl. *Desirability function*)

DES - Duboka eutektična otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*)

DPPH – 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (engl. *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

DSPE - disperzijska ekstrakcija čvrste faze (engl. *Dispersive Solid Phase Extraction*)

HCA - metoda hibridnog staničnog automata (engl. *Hybrid Cellular Automaton*)

HPLC - Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

IL - Ionske tekućine (engl. *Ionic Liquids*)

LPME - Mikroekstrakcija tekuće faze (engl. *Liquid-Phase MicroExtraction*)

MAE - ekstrakcijom pomoću mikrovalova (engl. *Microwave Assisted Extraction*)

Mt – mjerna jedinica - mega tona

N - dušik

NADES - Prirodna duboka eutektična otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*)

Ni - nikal

Pb – olovo

PCA - Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*)

RSA - Moć hvatanja slobodnih radikala (engl. *Radical Scavenging Activity*)

RSM - Metoda odzivne površine (engl. *Response Surface Methodology*)

SARS - Teški akutni respiratorni sindrom (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome*)

SHLE – Pregrijana tekuća ekstrakcija (engl. *Superheated Liquid Extraction*)

UAE - Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka (engl. *Ultrasound-Assisted Extraction*)

Zn - cink

1. UVOD

Duhan (*Nicotiana tabacum* L.) se uzgaja kao važna ekonomska kultura i jedna je od najčešće proučavanih biljaka. Najrasprostranjenija je biljka na svijetu i uzgaja se u više od 130 zemalja. Iako se uzgaja širom svijeta (Wang i sur., 2015), Kina se ističe kao najveći potrošač i proizvođač duhanskih proizvoda. Različita područja za sadnju duhana i upotrjebljene tehnologije rezultiraju različitim komponentama i njihovim sadržajem. Duhan se uglavnom koristi za izradu cigareta i cigara. Velike količine duhanskog otpada nastaju tijekom proizvodnje cigareta. Tijekom procesa pripreme nastaje oko 20 % ostataka, koji se zbog svoje fizičke strukture ne mogu izravno primijeniti na proizvodnju mješavina duhana (Agnieszka i sur., 2009). Kao posljedica povećanja proizvodnje duhanskih proizvoda povećala se razina duhanskog otpada. Proizvodnja cigareta u svijetu stalno se povećavala 5 % u razdoblju od 2005. do 2010., odnosno više od 5,7 milijardi cigareta u vrijednosti 665 milijardi dolara. Zbrinjavanje tih otpada postaje pitanje od javnog interesa kao posljedica njihovih potencijalnih utjecaja na okoliš i ljudsko zdravlje (Benitez i sur., 1999; Barrena i sur., 2008). Zbog ograničenja postojećih kapaciteta punjenja, visokih troškova zbrinjavanja, propisi o zaštiti okoliša i zajednički načini uklanjanja više nisu održivi. Izgaranje rezidua duhana pod odgovarajućom kontrolom može biti siguran način zbrinjavanja, osobito kada se koristi zajedno s ugljenom u postojećim objektima koji su već opremljeni odgovarajućim uređajima za kontrolu emisija, ali to nije konačno rješenje. Uglavnom sadrže ostatke u obliku prašine i razne vrste neupotrebljivih dijelova lišća duhana, od kojih se gotovo 110 Mt odlaže se na odlagališta. S obzirom da je duhanski otpad, bogat izvor visokovrijednih komponenti, njegovo iskorištavanje moglo bi dati dodatnu vrijednost i podići nisku otkupnu cijenu duhana, a ujedno riješiti i problem zbrinjavanja ovog opasnog otpada (Banožić i sur., 2018). Poznato je da duhanski otpad još uvijek sadrži visoke razine nikotina. Nikotin je glavni alkaloid prisutan u duhanu; toksičan i vrlo topiv u vodi, što ga čini glavnim čimbenikom ograničenja za odlaganje ovog otpada na odlagalištima, budući da nikotin može potencijalno iscuriti kontaminirajući obližnja vodena tijela (Karačonji i sur., 2005). Postoje brojne studije koje su istraživale alternativne načine postupanja s duhanskim otpadom, tijekom kojih se može povratiti vrijednost, uz istovremeno minimiziranje zahtjeva za odlaganje na odlagališta. Li i sur. (2011) su predložili ekstrakciju vrijednih fenolnih spojeva, to jest klorogenske kiseline, korištenjem Aldrich-ovih metoda ekstrakcije mikrovalovima. Qi i sur. (2008) predlažu primjenu duhanskog otpada za biosorpciju metala i utvrđuju snažnu učinkovitost vezanja za dvovalentne spojeve kao što su Pb, Cu, Cd, Zn i Ni.

U 2005. godini ukupna proizvodnja globalnog duhanskog otpada iznosila je više od 1,25 milijuna tona. Samo u Kini godišnje se proizvede 460 milijuna kilograma duhanskog otpada u

različitim fazama obrade duhana i tijekom proizvodnje proizvoda od duhana (Liu i sur., 2015). Tijekom proizvodnog procesa, proizvede se oko 1 milijun tona duhanskog otpada koji uključuje neželjene listove duhana, stabljike duhana i ostatke (Wang i sur., 2013; Zhong i sur., 2010). Nažalost, ovaj se duhanski otpad obično odlaže na odlagališta ili se spaljuje zbog visokog sadržaja toksičnog nikotina (Okunola i sur., 2016; Zhang i sur., 2012). To ugrožava ljudsko zdravlje i doprinosi zagađenju okoliša. Postoje istraživanja u kojima se duhanski otpad koristi kao supstrat za proizvodnju gnojiva, pektinaze i nekih prekursora za lijekove (Chaturvedi i sur., 2008; Wang i sur., 2015; Zheng i sur., 2016, 2017). Osim toga, visoki sadržaj šećera prisutan u duhanskom otpadu, uključujući glukozu, saharozu, fruktozu i druge polisaharide, čini duhanski otpad obećavajućim supstratom.

Pokazalo se i da je duhanski otpad potencijalno primjenjiv kao etnofarmakološki materijal u farmaceutskoj industriji, zbog neuobičajene dominacije klorogenskih kiselina (klorogenska kiselina, neklorogenska kiselina i kriptoklorogenske kiseline) i rutina sadržanih u otpadu. (Mumba i sur., 2008). Duhanski otpad koji sadrži prirodne klorogenske kiseline i rutin mogu biti korisni za industrijsku primjenu, a različite metode mogu biti korisne za analizu i tumačenje velikog broja resursa duhanskog otpada u svijetu. Klorogenska kiselina i rutin visoko su vrijedni prirodni polifenolni spojevi koji se koriste kao medicinski i industrijski materijali, njihova identifikacija i kvantifikacija u duhanskom otpadu također je i od velike važnosti za njihovu široku primjenu u farmaceutskoj industriji (Wang i sur., 2010).

Zelene održive tehnologije su trenutno jedna od ključnih područja u znanosti jer imaju za cilj očuvanje okoliša i smanjenje mogućih negativnih učinaka na ljudsko zdravlje. Zelene tehnologije smanjuju upotrebu opasnih medija nudeći nove ekološki prihvatljive tehnike kemijskog čišćenja kontroliranjem fizikalnih svojstava medija kao što su temperatura i tlak, te razvoj novih zelenih otapala. Upravo zbog toga, velik se značaj pridaje razvoju ionskih tekućina i eutektičkih otapala koja su razvijena kako bi zamijenila tekuća organska otapala (Dai i sur., 2013).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DUHAN

Duhan je jedna od najraširenijih i najviše uzgajanih biljki na svijetu. Samooplodna je biljna vrsta. Stranooplodnja se provodi insektima, do 2 %. U proizvodnji su zastupljeni linijski (sorte) i hibridni kultivari (hibridi) te autohtone selekcije (Stepić i sur., 2015).

Duhan spada u rod *Nicotiana* koji ima preko 60 vrsta (Goodspeed, 1954). Za pušenje se najviše koristi vrsta *N. tabacum* L. Centrom porijekla duhana smatraju se sjeverozapadna Argentina i Bolivija. Pripada carstvu *Plantae*, diviziji *Magnoliophyta*, razredu *Magnoliopsida*, redu *Solanales*, porodici *Solanaceae*, rodu *Nicotiana* i vrsti *tabacum*. U svijetu su poznate 64 vrste duhana dok ljudi koriste samo dvije vrste *Nicotiana rustica* i *Nicotiana tabacum* iz porodice *Solanaceae*, a obje su autohtone američke vrste. Međusobno se razlikuju po koncentraciji nikotina (*rustica* ima znatno veću koncentraciju i manje listove) te se koristila u različitim šamanskim ritualima. Duhan se konzumira zbog specifičnog i kompleksnog fiziološkog djelovanja sastojaka listova na središnji živčani sustav (Čagalj i sur., 2017, Kozumplik i sur., 2012).

U Hrvatsku, duhan je donesen koncem 16. ili početkom 17. stoljeća. U Hrvatskoj se duhan (*N. tabacum* L.) uzgaja na preko 6000 ha godišnje, od ukupne hrvatske duhanske proizvodnje oko 5000 ha je u organizaciji Hrvatskih duhana. Od ovoga je nešto više od 4500 ha virdžinijski duhan (Virginia), a ostalo je berlej (Burley). Ovom se proizvodnjom duhana bavi oko 2800 proizvođača. Prosječna veličina proizvodnje virdžinijskog duhana po proizvođaču je oko 5 ha, a berleja manje od 1 ha. Oba tipa duhana se uzgajaju uglavnom na području Virovitičko-podravске i Požeško-slavonske županije. Virdžinijski duhan se uzgaja na lakšim pjeskovito-illovastim, a berlej na težim glinasto-illovastim tlima. S obzirom na relativno malu godišnju proizvodnju duhana u Hrvatskoj i izvoz sjemena, te mogućnost proizvodnje velikog broja sjemenki po jednoj biljci, cjelokupna sjemenska proizvodnja organizira se na površini od oko 2 ha godišnje. Tlo na kojem se sjeme proizvodi glinasta je ilovača, pH oko 5.7. Cvatnja duhana je od polovine srpnja do prvih mrazeva. S obzirom na slične klimatske uvjete, jednako vrijedi i za područje Bosne i Hercegovine. Potrošnja duhanskih proizvoda u Bosni i Hercegovini procjenjuje se na 7 000 do 8 000 tona u čemu domaća proizvodnja čini 50 – 60 % . U području Hercegovine proizvodnja je orijentirana na tradicionalne sorte, prvenstveno hercegovački ravnjak, dok je u Bosanskoj Posavini duhanska proizvodnja je već od 60-tih godina orijentirana na proizvodnju robnih sorti Berlej i Virdžinia. Unatoč nešto boljem proizvodnom položaju proizvodnja duhana je u stalnom opadanju za oba robna tipa i to tako da u posljednjim godinama

pala na nivo od 452 tone u 2015. godini da bi u 2016. godini bila oko 429 tona (Banožić i sur., 2018).

2.1.1. Građa duhana

Korijen biljke duhana je vretenast, dobro razvijen i vrlo dobre usisne snage. Prodire u tlo na dubinu od jedan do dva metra i širi se do 80 cm. Stabljika je uspravna, cilindrična, podijeljena na koljenca (nodije) i međukoljenca (internodije), prekrivena dlačicama i ispunjena srži. Može narasti od pola pa i do 3 metra. Izgled lista ponajviše ovisi o sorti i kultivaru, te se može razlikovati po veličini, obliku i naborima (Hrgović, 2005; Jarnević, 2017).

Listovi se razvijaju na koljencima (nodijima) i mogu biti sjedeći ili s kraćom peteljkom, srcoliki, jajoliki, eliptični i kopljasti, ovisno o sorti. Pokriveni su žljezdanim dlačicama, a u njihovim se glavicama nalaze smole i eterična ulja, koja su važna za kvalitetu i aromu duhana. Zbog različite kvalitete listovi su podijeljeni u skupine na osnovi insercije branja: podbir, nadpodbir, srednji listovi, podvršak i ovršak. Za virdžinijski duhan je karakterističan izduženi list naborane površine, koji naraste do 70 cm duljine, a za berlej to je nešto širi list ravne površine. Listovi ravnjaka su veoma krupni, dužine preko 40 cm, širine oko 20 cm i na vrhu zašiljeni (Ozimec i sur., 2009). Cvjetovi duhana su ružičaste, bijele ili žute boje i oblikuju se pojedinačno ili češće u skupovima na vrhu glavne stabljike i zaperaka tvoreći štitac, tj. grozd. Plod je okrugao ili ovalni smeđi tobolac u kojemu se nalazi više tisuća sjemenki. Masa 1 000 sjemenki je od 0,06 - 0,1 g, a hektolitarska težina iznosi oko 40 – 45 kg (Jarnević, 2017).

2.1.2. Kemijski sastav duhana

Duhan kao prirodni materijal sadrži složenu mješavinu različitih organskih i anorganskih tvari. Kemijski sastav lista duhana mijenja se tijekom sazrijevanja, sušenja, fermentacije, prerade i skladištenja, a uvjetovan je načinom uzgoja, sorte, klimatskim uvjetima i sl. Tijekom procesa sušenja, udio škroba opada, a istovremeno raste udio reducirajućih šećera. Osim toga, tijekom procesa fermentacije, opada udio polifenola i ugljikohidrata (Bhisey, 2012; Kopčić, 2011). Navedena tri tipa duhana se najčešće koriste u smjesama za proizvodnju cigareta. Berlej tip duhana karakterizira nizak udio vode, i veoma nizak udio ugljikohidrata. Od svih tipova duhana, Berlej najbolje apsorbira naknadno dodane arome, te je stoga veoma poželjan u mješavinama za cigarete. Tip Virdžinija karakteriziraju veliki listovi i izuzetno dobra tehnološka svojstva. Listovi Virdžinije imaju vrlo visok sadržaj vode i ugljikohidrata (i do 25 %). Orijentalni tipovi duhana, imaju veoma ugodnu i aromu karakterističnu za sortu. Iako se jednim imenom zovu

orijentalni duhani, njihov kemijski sastav ovisi o regiji u kojoj se proizvode. Orijentalni tip duhana ima najmanje nikotina. Među orijentalnim duhanima, najveća količina nikotina, zabilježena je kod duhana s područja Makedonije i to između 1,31-1,77 % (Pisklov i sur., 2004). Poluorijentalni duhan je tip duhana u koji se ubraja i hercegovački ravnjak, sorta koja se dominantno uzgajala na područjima Hercegovine, Dalmacije i dijela Bosne. Njih karakterizira svijetložuta boja osušenih listova, te visoka koncentracija šećera, a niska koncentracija nikotina i dušika (Butorac, 2009).

2.2. DUHANSKI OTPAD

Duhanski otpad tipičan je poljoprivredno-industrijski otpad koji nastaje u duhanskoj industriji, koji uglavnom uključuje stabljike duhana, duhansku prašinu i ostatke duhana. Svake godine velike količine duhanskog otpada se stvaraju tijekom procesa pripreme; proizvodnja od oko 5 milijuna tona sušenog duhana daje 1 milijun tona duhanskog otpada (Yang i sur., 2012).

U ovom radu korišteni su tri vrste duhanskog otpada: duhanska prašina, rebro i refabrikat, koje nastaju u industrijskoj preradi duhana. Duhanska prašina, su dijelovi duhanskog lista, veoma sitne granulacije, koji su premali za bilo koju drugu uporabu u duhanskoj industriji. Uglavnom se odlažu s drugim duhanskim otpadom (Valverde i sur., 2000). Rebro je dio biljke duhana, koji se pruža iz stabljike. Potrebno ga je ukloniti tijekom obrade duhana jer uzrokuje daljnje probleme u obradi cigareta kao što su rupe i promjene u karakteristikama tijekom pušenja (Zielke i sur., 1999). Refabrikat su mali komadi lišća duhana koji su nastali tijekom obrade duhana i nisu prikladni za daljnju obradu. Duhanski otpad nema neposrednu upotrebu i duhanske industrije moraju platiti njegovo daljnje raspolaganje. Ostaci duhana iz primarne proizvodnje i proizvodnje cigareta također su klasificirani kao poljoprivredno-industrijski otpad. Europska unija ga klasificira kao otrovni i opasni otpad, otkad koncentracija nikotina u tim otpadima prelazi 500 mg po kg suhe tvari. Nikotin, kao spoj topiv u vodi, može se ispirati iz otpada duhana tijekom nepravilnog skladištenja i migrirati u okoliš i ući u podzemnu vodu. Zbrinjavanje tog otpada postalo je pitanje od javnog interesa zbog njegovog potencijalnog utjecaja na okoliš i ljudsko zdravlje (Li i sur., 2011; Zhang i sur., 2012; Chen i sur., 2008). Kemijski sastav lišća duhana i otpada iz biomase u posljednjih nekoliko godina dobiva značajnu pažnju, a otpad od duhana smatra se dobrim izvorom velikog broja bioaktivnih tvari. Duhanski otpad sadrži niz vrijednih kemijskih sastojaka, kao što su nikotin, solanesol, sklareol, vitamin E, riboflavin, duhan. Oni se mogu dobiti nizom metoda kemijske ekstrakcije i rafiniranja.

Bioaktivni spojevi mogu se koristiti u farmaceutskoj, kemijskoj i drugim industrijama (Wang i sur., 2010)

2.2.1. Načini obrade duhanskog otpada

Posljedice velikog tehnološkog napretka i porasta stanovništva vidljive su i u sve većoj količini čvrstog otpada. Dok razvijene zemlje posvećuju sve više pažnje, ali i sredstava, zbrinjavanju otpada, zemlje u razvoju, među kojima su i Hrvatska i Bosna i Hercegovina, tek počinju razmatrati različite opcije zbrinjavanja otpada. Prema Wang i Zhao (2009), procjenjuje se da duhanska industrija proizvodi i do 3×10^6 tona duhanskog otpada. Proces prerade duhana uključuje primarnu obradu duhana te preradu duhana odnosno proizvodnju cigareta (Banožić i sur., 2018). Otpad uključuje stabljike, rebro lista i korijena biljke duhana, kao i listove niskog stupnja kvalitete i defektnih listova duhana. Imaju jak miris i uzrokuju ozbiljno onečišćenje okoliša. Njihovo nakupljanje predstavlja nastanak ogromne količine otpada prirodnog biljnog resursa i rezultira ozbiljnim zagađenjem okoliša. Stoga je važna ponovna uporaba ovog industrijskog otpada i njegovo iskorištavanje kao potencijalna biomasa, ili resursa za ekstrakciju. Tekući duhanski otpad uključuje suspenzije čestica duhana, otapala, ulja i masti koji potječu direktno iz proizvodnog procesa, ili samog objekta u kojem se proizvodnja odvija. Kruti otpad podrazumijeva neupotrebljive dijelove biljke duhana, duhansku prašinu, a može sadržavati i dijelove ambalaže i druge tvari koje potječu iz proizvodnog procesa. Otpad koji se prenosi zrakom podrazumijeva neotrovne mirise proizvodnje, hlapljive čestice, čestice duhana i ostale emisije. Procjenjuje se da od ukupne proizvodnje duhana, 25 % otpada na duhanski otpad. Pojedine tvornice upotrebljavaju duhanski otpad tako da ga usitnjavaju i miješaju s duhanom za proizvodnju jeftinijih cigareta, no tako se iskoristi tek oko 40 % duhanskog otpada. Tijekom postupka prerade duhana, oko 20 % sirovine se pretvara u čvrste otpatke koji se mogu spaljivati, kao što su duhanska prašina i lomljene stabljike (Piotrowska-Cyplik i sur., 2009; Li i sur., 2011). Trenutno se ovi otpadi odlažu na odlagališta, ali bi trebalo iskoristiti taj otpad za proizvodnju energije, s obzirom na postojanje različitih tehnologija obrade otpada kao što su kompostiranje, spaljivanje ili odlaganje.

Izgaranje duhanskog otpada i ugljena pod odgovarajućom kontrolom smatra se ne samo sigurnim načinom odlaganja, nego i učinkovitim načinom proizvodnje energije. Istodobno sagorijevanje duhanskog otpada i ugljena u djelotvornoj metodi je od velike važnosti i za zaštitu okoliša i za održivi razvoj resursa. To znači da bi dodavanje duhanskog otpada ugljenu utjecalo na cjelokupne profile izgaranja i performanse, uključujući performanse paljenja i sagorijevanja,

učinke oslobađanja topline, emisije plinovitih onečišćujućih tvari, svojstva šljake itd. (Arias i sur., 2008). Stoga, kako bi se poboljšale performanse sagorijevanja i postigao ekološki prihvatljiv i siguran rad, vrlo je važno istražiti karakteristike ko-sagorijevanja mješavina svih raspona težina i postizanje optimalnog miješanja za postizanje navedenih ciljeva. Nažalost, literatura je ograničena na studijama koje se odnose na optimizaciju miješanja duhana otpada i ugljena do sada. Zbog prisutnosti ostatka nikotina, duhanski otpad je otrovan stoga se provodi kontrolirano odlaganje duhanskog otpada kako bi se izbjegli njegovi štetni učinci. Duhanski otpad predstavlja potencijalnu opasnost za okoliš, stoga odlaganje takvog otpada podliježe posebnoj zakonodavnoj regulativi. Trenutno se većina otpada uništava spaljivanjem ili zakopavanjem. Kao vrsta visoke organske biomase, otpadni duhan koristi se kao adsorpcija desulfurizacije i organskog gnojiva po mjeri.

Puštanje iz odlagališta sastoji se uglavnom od metana i procjednih voda, što je postalo predmetom interesa kao jako onečišćena otpadna voda. U zemljama EU problem pročišćavanja procjednih voda postoji već neko vrijeme, ali nije pronađeno jedinstveno rješenje. Procjedne tvari sadrže visoke koncentracije raznih organskih tvari, anorganskih tvari i otrovne spojeve koji mogu ugroziti okolna tla, podzemne i površinske vode (Renou i sur., 2008). Obrada otpada i procjednih voda nastalih na odlagalištima danas je imperativ zahvaljujući strogom zakonodavstvu o zaštiti okoliša. Tijekom različitih ciklusa prerade i proizvodnje, duhanska industrija proizvodi velike količine organskog otpada. Sastav duhanskog otpada ovisi o mjestu i sustavu proizvodnje cigareta. Može sadržavati prašinu raznih veličinu čestica i cijele ili dijelove lišća duhana. Procjedne vode mogu se tretirati biološkim, kemijskim i fizičkim procesima ili kombinacijom ova tri, kako bi se povećala učinkovitost pročišćavanja i zadovoljili strogi regulatorni zahtjevi (Foo i sur., 2009; Wiszniowski i sur., 2006).

Jedan od najčešće korištenih procesa je biološko pročišćavanje otpadnih voda pomoću aktivnog mulja (Jianqiang i sur., 2000). Ovaj proces se tako široko koristi zbog njegove učinkovitosti u tretiranju komunalnih i industrijskih otpadnih voda ili procjednih voda (Laitinen i sur., 2006; Wei i sur., 2012).

Dosadašnja istraživanja bavila su se poglavito obradom i stabilizacijom duhanskog otpada kompostiranjem. Postupcima kompostiranja pri aerobnim uvjetima, dolazi do smanjenja ukupnog volumena otpada, kao i do smanjenje sadržaja nikotina (Briški i sur., 2003). No u današnje vrijeme sve se više istraživanja provodi u cilju izolacije bioaktivnih komponenti iz različitog biljnog materijala, ali i nusproizvoda biljnoga podrijetla u što spada i duhanski otpad.

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada u najvećoj mjeri se još uvijek provodi primjenom organskih otapala koja su nedovoljno selektivna, toksična, korozivna i dr., te je potrebno istražiti nove metode ekstrakcije i zbog toga se sve više pribjegava tzv. „zelenim“ tehnikama ekstrakcije.

2.2.2. Nastanak duhanskog otpada

Proces nastanka duhanskog otpada može se grubo podijeliti u tri faze:

- otpad nastao pri uzgoju i sušenju duhana - poljoprivredni otpad;
- otpad nastao pri proizvodnji i distribuciji duhanskih proizvoda - industrijski otpad;
- otpad nakon potrošnje - potrošački otpad (Novotny i sur., 2015).

Osim na mjestima za sakupljanje, izdvajanje korisnog otpada vrši se s filter postrojenja koji su povezani kako s odjelom pripreme duhana tako i s odjelom izrade cigareta. Na filter postrojenjima se izdvaja prašina. Osim procesa pripreme duhana (linija za vlaženje i ekspaniranje rebra), dio rebra se odvaja i na odjelu izrade cigareta. Izdvajanje frakcija otpada na uređajima za izradu cigareta vrši se na osnovu specifične težine pomoću vakuuma. Duhanski otpad prikuplja se ovisno o obimu proizvodnje, po potrebi i svaki dan. Isti se otprema u skladište, gdje se kontrolira. Duhanski otpad koji je u skladu sa specifikacijama može se koristiti za daljnju upotrebu kao što je proizvodnja duhanske folije.

Proces prerade duhana i proizvodnje duhana tijekom kojeg nastaje duhanski otpad podrazumijeva nekoliko dijelova:

- Nabavka sirovine i repromaterijala;
- Skladište neprerađenih duhana;
- Skladište repromaterijala;
- Odjel pripreme duhana;
- Odjel izrade filtera, cigareta i pakiranja;
- Odjel operacija razvoja i kontrole kvalitete.

Odjel operacija razvoja i kontrole kvalitete, kao jedan od važnijih odjela je zadužen za praćenje svih segmenata proizvodnog procesa, od nabavke sirovine, repromaterijala, postavljanja

parametara, te kontrole kvalitete kroz sve faze procesa, pa sve do praćenja same kvalitete cigarete kao finalnog proizvoda.

Najveća količina duhanskog otpada nastaje tijekom procesa pripreme duhanske mješavine za izradu cigareta, na odjelu pripreme duhana. Nakon izdavanja duhanske mješavine iz skladišta, slijedi obrada na odjelu pripreme duhana (Nurkić i sur., 2017).

2.2.3. Sastav duhanskog otpada

Sastav duhanskog otpada ovisi o mjestu u kojem nastaje tijekom procesa prerade duhana. Duhanski otpad nastao preradom duhana vlažan je materijal pH-vrijednosti od 5,1 do 6,7, omjera C:N od 17:1 do 21:1 i sadrži znatne količine nikotina zbog čega tu vrstu otpada nije moguće odložiti na odlagalište neopasnog otpada (Kopčić, 2011; Vuković i sur., 2012). Osim nikotina, duhanski otpad je relativno dobar izvor alkaloida, aromatičnih supstanci i proteinskih frakcija (Rincón i sur., 1998).

2.2.4. Bioaktivne komponente prisutne u duhanskom otpadu

2.2.4.1. Alkaloidi

Više od 40 vrsta alkaloida iz duhana je izolirano i identificirano te predstavljaju skupinu bioaktivnih komponenti koje su u duhanu i duhanskom otpadu najviše istražene. Glavni alkaloidi iz duhana su nikotin, kotinin, nornikotin, miozmin, nikotirin, anabazin i anatabin. Sadržaj nikotina velik je kod većine alkaloida.

Nikotin

Nikotin je glavni alkaloid lišća duhana, i čini preko 95 % sadržaja alkaloida u duhanu. U čistom stanju, on je bezbojna, uljasta tekućina bez mirisa, iako ponekad zbog prisutnih onečišćenja može biti do svijetlosmeđe boje. Sadržaj nikotina je prvenstveno određen sortom, ali i uvjetima uzgoja. Slabiji duhan sadrži manje od 1 % nikotina, srednje jak između 1 i 2 %, a jak više od 2 %. Nikotin je topljiv u vodi, što predstavlja značajan ekološki problem kod odlagališta duhanskog otpada jer zajedno s padalinama dospijeva u procjednu vodu koja zagađuje okoliš i podzemne vode. (Karačonji, 2005; Vuković i sur., 2012). Sam nikotin ima široku primjenu, od kemijske, farmaceutske industrije, kao i u samoj duhanskoj industriji kao osnovni aditiv u proizvodnji cigareta. Nikotin ima akutnu i kroničnu toksičnost te negativan utjecaj na krvožilni, dišni, gastrointestinalni i imunološki sustav (Karačonji, 2005). S druge strane, dokazano je pozitivno djelovanje nikotina kod bolesnika sa demencijom (White i Levin, 1999), i

šizofrenijom (Levin i sur., 1996), dopaminergičkim neuronima i aksonima (Maggio i sur., 1998), te blagom kognitivnom disfunkcijom (Newhouse i sur., 2012). Nikotin iz duhana se može koristiti kao pesticid, te se kategorizira kao ekološki prihvatljiv pesticid zbog svoje niske toksičnosti. Nikotin se također uobičajeno koristi za sintezu niacina i niacinamida (ključni međuprodukti). Smanjivanjem sadržaja nikotina upotrebom različitih metoda ekstrakcije iz zagađene krute tvari do razina ispod zakonskog praga, bilo bi moguće promijeniti razvrstavanje otpada iz opasnog u poseban otpad, koji bi se zatim mogao ukloniti jednostavno kao gradski otpad ili nadalje koristiti kao polazni materijal za ekstrakciju bioaktivnih komponenti (Civilini i sur., 1997).

2.2.4.2. *Solanesol*

Osim nikotina, duhanski otpad sadrži i veliku količinu solanesola, acikličkog triseskviterpenskog alkohola, koji je otkriven 1956. godine i izoliran upravo iz duhana. Solanesol je poliizoprenoidni alkohol koji se uglavnom nalazi na površini listova duhana. Solanesol se uglavnom nalazi u dimljenom sušenom duhanu sa sadržajem od 0,5 % do 1 % (w / w). Solanesol posjeduje antioksidacijska, antibakterijska i antiupalna svojstva. Solanesol u kombinaciji s nikotinom snažno inhibira rast bakterija kao što su *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, i *Micrococcus lysodeikticus*. Solanesol se koristi u farmaceutskoj industriji za sintezu koenzima 10 i kao analog vitaminu K (Duan i sur., 2016; Keča i sur., 1997; Hu i sur., 2015). S obzirom da je koenzim Q10 prisutan na tržištu u obliku dodatka prehrani i to za olakšavanje bolova izazvanih migrenama (Sándor i sur., 2005), zaštitne uloge kod Parkinsonove te drugih neurodegenerativnih bolesti (Matthews i sur., 1998; Shults i sur., 2002; Müller i sur., 2003), pozitivnog učinka na regulaciju krvnog tlaka te glikemije kod bolesnika s dijabetesom tipa 2 (Hodgson i sur., 2002), potražnja za solanesolom je u porastu (Lipshutz i sur., 2005). S obzirom da je sinteza solanesola veoma zahtjevna, za njegovo dobivanje najčešće se koristi ekstrakcija iz biljnih sirovina, kao što su duhan, rajčica, krumpir, patlidžan i paprika. Dobivanje ovog spoja iz otpada biljnog podrijetla bilo bi u potpunosti u skladu s principima održive poljoprivrede (Yan i sur., 2015).

2.2.4.3. *Rutin*

Rutin je jedan od medicinski najvažnijih flavonoida. Prirodni je antioksidans, a u osušenom duhanu ga ima oko 1 %, što čini duhan dobrim izvorom ovog spoja. Zanimljivo je napomenuti da fermentirani listovi duhana sadrže manje rutina (0,5 %) od nefermentiranih (1,5 %). Razlog tome je što se rutin razgrađuje djelovanjem enzima u procesu fermentacije (Fathiazad i sur.,

2006). Rutin djeluje blagotvorno pri liječenju modrica, proširenih vena i varikoznih vena. Zbog toga je veoma važno, razviti nove alternativne izvore za njegovo dobivanje. Pri tome je važno osigurati homogenost duhanskog otpada kao i riješiti probleme prilikom njegovog prikupljanja (Fathiazad i sur., 2006; Wang i sur., 2010). Rutin je dio fitokemijske skupine spojeva čija "zaštitna" svojstva uključuju antioksidativno, antimikrobno, antikancerogeno i kardiovaskularno-zaštitno djelovanje (Gobbo-Neto i sur., 2008).

2.2.4.4. *Sklareol*

Obilan u muškatnoj kadulji (*Salvia sclare* L.) i duhanu vrste *Nicotiana glutinosa*, je diterpenski prirodni proizvod visoke vrijednosti za industriju mirisa. Njegov ugljični skelet labdane i njegove dvije hidroksilne skupine također ga čine vrijednim građevnim blokom za druge kemikalije. Sklareol pokazuje različite bioaktivnosti, kao što su antiinflamatorna, antiinfekcijska i antikancerogena aktivnost s nižom toksičnošću.

2.2.4.5. *Niacinamid*

Niacinamid je amid nikotinske kiseline (vitamin B3 / niacin), vitamin topiv u vodi, koji je dio skupine vitamina B. Niacin je s druge strane jedan od vitamina povezanih s bolešću nedostatka pandemije: nedostatak niacina (pellagra). Niacin se koristi već više od pola stoljeća kako bi se povećala razina lipoproteina velike gustoće (HDL-a) u krvi i nađeno je da umjereno smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti.

2.2.4.6. *Klorogenska kiselina*

Klorogenska kiselina je član obitelji kafeoilkinih kiselina, koja posjeduje širok raspon bioloških aktivnosti, kao što su antibakterijska, antioksidativna, antikancerogena, antimutagena, zaštitni hepatociti te ima inhibitorno djelovanje na HIV-1 RT, humani herpes simplex virus, adenoviruse, teški akutni respiratorni sindrom (SARS) i virus ptičje gripe (AIV - H5N1) (Wang i sur., 2010). Klorogenska kiselina i drugi polifenoli imaju široku primjenu u medicini, proizvodnji kemikalija i prehrambenoj industriji. Dosadašnji izvori klorogenske kiseline su veoma skupi i teško dostupni, te je veoma važno pronaći novi izvor na njihovu proizvodnju. Također, dokazano je da ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ultrazvukom daje puno bolje rezultate od klasične ekstrakcije (Chen i sur., 2007).

2.2.3.7. *Bjelančevine*

Bjelančevine iz duhana vrlo su neuobičajene u biljnom carstvu po tome što su potpune i dobro uravnotežene u svom aminokiselinskom sadržaju. Taj sadržaj aminokiselina dostiže oko 20,5% suhe tvari duhana. Postoji više od 43 vrste aminokiselina koje se nalaze u duhanu, uključujući visoke razine osam esencijalnih aminokiselina za ljudsko tijelo (glutaminska kiselina, prolinska kiselina, arginin, histidin, alanin, asparaginska kiselina itd.). Biljni proteini su izvrsni prirodni prehrambeni sastojci i dodatci hrani. Čak i neke aminokiseline imaju terapijsku ulogu, na primjer aspartat ima potencijalno štetan sporedni učinak za srčanu insuficijenciju. Bjelančevine duhanske biljke ne mogu postati samo zamjena za životinjske bjelančevine, posebno za pacijente koji ne podnose laktozu, već se mogu dodati i proizvodima od mesa, jaja, ribe i kolača kako bi se povećala njihova prehrambena vrijednost.

2.2.3.8. *Organske kiseline*

Duhan je također bogat organskim kiselinama, uglavnom jabučnom kiselinom, limunskom kiselinom, oksalnom kiselinom i malonskom kiselinom, itd. Značajan dio takvih kiselina je kompleksiran kao soli s nikotinom, amonijakom i anorganskim anionima kalcija, kalija i natrija. Sadržaj jabučne kiseline je viši od ostalih organskih kiselina i može se koristiti za sintezu polihidroksialkanoata za oporavak kostiju i regeneraciju mišića.

2.2.3.9. *Ugljikohidrati*

Duhan sadrži mnogo polisaharida, uključujući celulozu, hemicelulozu, lignin, itd. Sadržaj ugljikohidrata može doseći do oko 22 % suhe težine duhana. Polisaharidi se mogu koristiti kao sirovina za kemijske građevne blokove, kao što su fumarna kiselina, jantarna kiselina, itd. Nedavno izvješće ukazuje da polisaharidi duhana imaju antioksidacijsku aktivnost (Xu i sur., 2014). Ugljikohidrati prisutni u duhanu sudjeluju zajedno s aminokiselinama u Maillardovim reakcijama i tako stvaraju karakteristične arome i boju duhana (Banožić i sur., 2018).

2.2.3.10. *Ostale bioaktivne komponente u sastavu duhanskog otpada*

Nakon ekstrakcije solanesola iz listova duhana također ostaju velike količine otpada koje još uvijek sadrže polifenolne spojeve, osim klorogenske i kofeinske kiseline te rutina, sadrži: kvercetin, kaempferol 3-O-rutinozid, eskuletin, skopoletin, p-kumarinsku kiselinu, ferulinsku kiselinu, galnu kiselinu, salicilnu kiselinu te njima slične spojeve (Wang i sur., 2008; Wang i sur., 2010; Chen i sur., 2012; Popova i sur., 2015).

Kofeinska kiselina je jedna od prirodnih fenolnih spojeva široko rasprostranjenih u biljnim materijalima, a nedavne farmakološke studije pokazale su da kofeinska kiselina ima

antihiperглиkemijski, antioksidativni (Chen i Ho, 1997; Gülçin, 2006), anti-apoptički (Chen i Ho, 1997; Nardini i sur., 2001), antidepresivni (Takeda i sur., 2002) i antikarcinogeni učinak (Gao i sur., 2000). Prema Wang i sur. (2009) otpad u duhanskoj industriji je potencijalna sirovina za proizvodnju kofeinske kiseline. Važno je naglasiti da su većina nabrojanih spojeva prisutnih u duhanskom otpadu prvenstveno visokovrijedne komponente, te je stoga veliki gubitak ne iskoristiti ih, odnosno ekstrahirati i koristiti u daljnim procesima, odnosno u druge svrhe.

2.3. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija i izolacija bioaktivnih spojeva iz prirodnih izvora odvija se prema dobro utvrđenim postupcima:

- ekstenzivna ekstrakcija (maceracija, para ili hidro-destilacija, prešanje, infuzija, perkolacija i Soxhlet ekstrakcija);
- dodatna kemijska obrada ekstrakata kako bi se ciljni spojevi izolirali u čistom obliku (Chemat i sur., 2012).

Konvencionalni procesi ekstrakcije su prilično naporni, dugotrajni, uključuju velike količine otapala kao što su ugljikovodici, alkoholi i kloroalkani, budući da većina bioaktivnih spojeva nije topljiva u vodi i, na kraju, može uzrokovati određenu degradaciju ciljne molekule i djelomični gubitak hlapljivih tvari (Cravotto i sur., 2008). Iznad svega, unatoč visokoj potrošnji energije i velikoj količini otapala, prinos je često vrlo nizak (Chemat et al., 2012). Stoga su u proteklom desetljeću razmatrane sigurnije i učinkovitije tehnike ekstrakcije utemeljene na razumnom kompromisu između ekonomskih, socijalnih i ekoloških zahtjeva. Pojam zelenih tehnika ekstrakcije uveden je u tehnike izdvajanja ekstrakta za zelenu i održivu tehnologiju kroz šest načela: valorizacija nusproizvoda putem poboljšanja i optimizacije uzbudljivih procesa; korištenje nenamjenske opreme, i inovacije u procesima i postupcima i otkrivanje alternativnih otapala. U zelenoj ekstrakciji, potpuno obnovljivi resursi moraju biti favorizirani bilo intenzivnim uzgojem ili in vitro rastom biljnih stanica ili organizama (Chemat i sur., 2012). Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka (engl. *Ultrasound assisted extraction*, UAE) odabrana je za početno probiranje zbog svojih učinkovitih, jednostavnih i brzih svojstava u ekstrakciji prirodnog proizvoda (Maran i sur., 2015). Budući je nekoliko studija pokazalo da se bioaktivni spojevi (npr. šećeri organskih kiselina, šećerni alkoholi, alkanoli, aminokiseline, kolin klorid i betain) mogu otopiti 10 do 100 puta bolje u eutekticima nego u vodi ili lipidima (Dai i sur.,

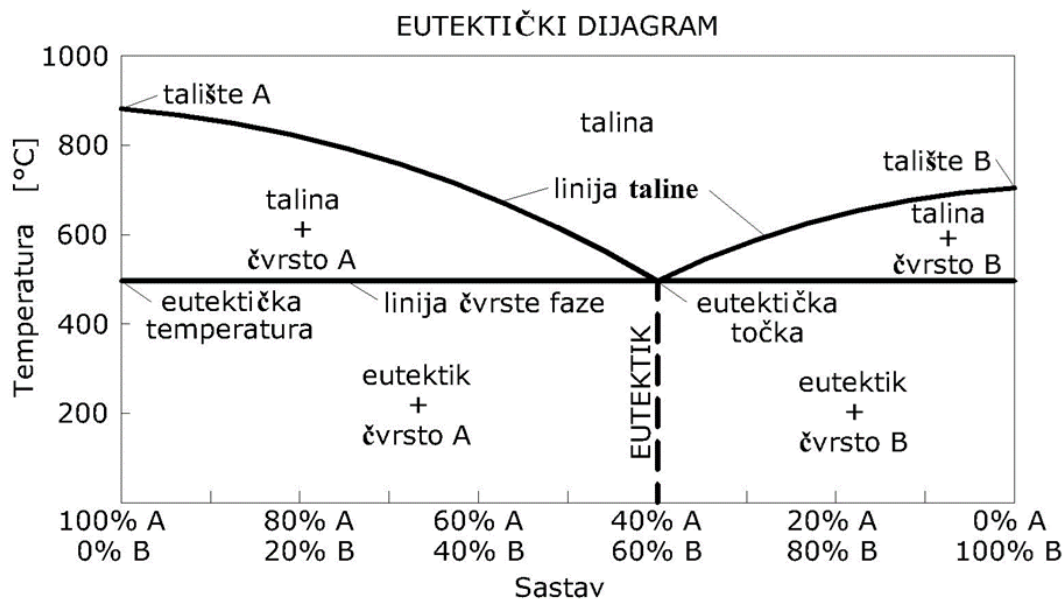
2014), eutektici mogu poslužiti za proizvodnju biljnih ekstrakata za izravnu uporabu u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i agrokemijskoj primjeni bez potrebe za skupim koracima pročišćavanja (Bi i sur., 2013).

2.3.1. Ekstrakcija eutektičkim otapalima

S ciljem razvoja ekološki prihvatljivih otapala, nedavno su se pojavila eutektična otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DESs) kao nova i zelena otapala. DES se može lako sintetizirati s kvaternom amonijevom soli (obično kolin kloridom, ChCl) i davateljem vodikove veze (HBD) nakon blagog zagrijavanja (60-90 °C). Oni pokazuju visoku čistoću i ekološka svojstva i primjenjuju se u ekstrakciji i odvajanju širokog spektra spojeva, uključujući fenolne spojeve, flavonoide, šećere, proteini i tako dalje (Nie i sur., 2017). Prirodna eutektična otapala (engl. *Natural deep eutectic solvents*, NADES), koja su izravno sastavljena od prirodnih proizvoda, kao što su organske kiseline, aminokiseline, šećeri, kolin ili urea, primila su sve veću pozornost jer se sastoje od primarnih metabolita u živim stanicama. NADES, sastavljena su od prirodnih primarnih metabolita koja se danas široko koriste kao zelena i održiva otapala za ekstrakciju bioaktivnih komponenti. Konvencionalna organska otapala se obično koriste u ekstrakciji i pročišćavanju bioaktivnih komponenata (Grodowska i sur., 2010). Međutim, većina tih otapala su hlapljiva, nisu ekološki prihvatljivi i imaju toksične učinke na operatera procesa. Štoviše, nisu sposobni za istovremenu ekstrakciju nepolarnih i polarnih komponenti. Prema tome, postoji velika potreba za razvojem novih otapala za ekstrakciju koja bi mogla očuvati okoliš i smanjiti negativan utjecaj na čovjeka, i što je još važnije, omogućiti učinkovitiji uzorak ekstrakcija u analizi farmaceutskih lijekova (Chemat i sur., 2012).

DES kao novi sustav otapala, sastoje se od dvije ili više od 2 komponente / kemikalije, te kombiniraju vodikove veze (donori i akseptori) kako bi se dobila kombinirana eutektička smjesa koja ima nisku točku taljenja. Eutektička otapala su smjese spojeva koji imaju mnogo niže talište od bilo kojeg od njegovih pojedinačnih komponenata, uglavnom zbog stvaranja međumolekularnih vodikovih veza. Eutektička točka (**slika 1**) je najniža temperatura na kojoj eutektična smjesa može postojati u tekućoj fazi, i u njoj je jednak sastav tekuće i krute faze (Matković, 2009). Stvaranje DES je pokazano za smjese kvaternarnih amonijevih soli (Abbott i sur., 2003) s nizom amida i karboksilnih kiselina (Abbott i sur., 2004), a kasnije prošireno na kolin klorid s alkoholima i uree s šećerima ili organskim kiselinama (Imperato i sur., 2005; Gore i sur., 2011). Neke značajke ovih DES daju im prednost u odnosu na ionske tekućine (engl. *Ionic Liquids*, IL) jer se lakše pripremaju, visoke su čistoće i niske cijene. Te su

komponente zelene, nezapaljive, netoksične, kompatibilne s vodom, razgradive, sigurne, jeftine i lako dostupne. Otopine metanola i vode u različitim omjerima uobičajeno se koriste za ekstrakciju bioaktivnih spojeva i srodnih pripravaka u kineskoj farmakopeji. Tako je korištena vodena otopina 70 %-tnog metanola kao uobičajeno ekstrakcijsko otapalo za izvođenje usporedbe ekstraktivnosti s onom različitih NADES, dok je voda korištena kao održivo otapalo. Komponente NADES-a imaju značajan utjecaj na njegova fizikalno-kemijska svojstva, kao što su polaritet, viskoznost i sposobnost otapanja, što izravno utječe na učinkovitost ekstrakcije ciljnih spojeva. Kako bi se postigla veća učinkovitost ekstrakcije, optimiraju se uvjeti ekstrakcije, uključujući temperaturu, vrijeme i količine NADES-a i uzoraka. Kao što je poznato, temperatura ima značajan utjecaj na viskoznost i topljivost otapala za ekstrakciju. U postupku ekstrakcije, potrebno je povisiti temperaturu da bi se smanjio viskozitet NADES-a, kako bi postupak ekstrakcije bio učinkovitiji. NADES su se pokazali kao izvrsna otapala za širok raspon metabolita niskog do srednjeg polariteta koji su netopljivi ili slabo topljivi u vodi. Makromolekule kao što su DNA, proteini i polisaharidi su također topljivi u NADES. Njihova visoka solubilizacijska sposobnost povezana je s njihovom supermolekularnom strukturom i širokim rasponom polariteta. Postojanje NADES u biljkama i njihova svojstva ukazuju da bi NADES mogao biti uključen u biosintezu i skladištenje raznih netopivih metabolita u stanicama i podrazumijeva ulogu NADES-a u zaštiti organizama od ekstremnih uvjeta. To podrazumijeva da se biosinteza siromašnih vodotopivih spojeva javlja u NADES-u u kojem su otopljeni supstrati i enzimi. Konačno, netoksični i ekološki prihvatljivi NADES čine ih prikladnima za brojne različite primjene u npr. prehrambenoj, kozmetičkoj, agrokemijskoj i farmaceutskoj industriji kao novi „Green Technology“ mediji (Dai i sur., 2013).



Slika 1 Prikaz eutektičkog dijagrama i eutektičke točke (Matković, 2009)

Posljednjih godina, novi medij DES - sa svojstvima sličnim IL, ali s dodatnim prednostima, dobivaju sve veću pozornost istraživača u mnogim područjima znanosti i tehnologije. Iako je uporaba DES-ova u analitičkoj kemiji još uvijek u povojima, broj članaka objavljenih na ovu temu se povećava. U posljednjih pet godina pojavilo se nekoliko radova koji se bave analitičkim postupcima baziranim na ekstrakciji tekuće-tekuće i kruto-tekuće pomoću DES-a (Shishov i sur., 2017). Razvoj novih zelenih otapala jedan je od ključnih predmeta u Zelenoj kemiji. IL i DES stoga, imaju veliku pozornost kao zamjena za sadašnja otrovna organska otapala i primjenjuju se u mnogim kemijskim procesima kao što su ekstrakcija i sinteza. Međutim, postojeći IL i DES još uvijek imaju ograničenja za primjenu u komercijalnoj kemijskoj industriji zbog toksičnosti za ljude i okoliš, kao i visoke cijene IL i krutog stanja većine DES na sobnoj temperaturi. Nedavno je otkriveno da su mnogi primarni metaboliti koji su bogati biljkama promijenili svoje stanje od krutog do tekućeg kada se miješaju u odgovarajućem omjeru. Ovo otkriće dovodi do pretpostavki da NADES igraju ulogu alternativnih medija za vodu u živim organizmima i stoga je testiran širok raspon prirodnih proizvoda, što je rezultiralo otkrićem preko 100 NADES od prirodnih sastojaka. Za karakterizaciju DES interakcija između molekula istražena je nuklearnom magnetskom rezonancijom. Sve ispitane NADES pokazuju jasno vezanje vodika između komponenti. Kao sljedeći korak izmjerena su fizikalna svojstva NADES kao što su aktivnost vode, gustoća, viskoznost, polaritet i toplinska svojstva, kao i utjecaj vode na fizikalna svojstva. U posljednjoj fazi novi NADES primijenjeni su na solubilizaciju širokog raspona biomolekula kao što su bioaktivni prirodni produkti koji nisu

topljivi u vodi, gluten, škrob i DNA (Dai i sur., 2013). Kako bi se povećao broj kandidata za IL i DES te proširile njihove primjene, osim sintetičkih spojeva, pozornost je usmjerena na prirodne proizvode kao što su organske kiseline (Abbott i sur., 2004; Gore i sur., 2011; Fukaya i sur., 2007), aminokiseline (Fukumoto i sur., 2005), šećeri (Poletti i sur., 2007; Imperato i sur., 2005), kolin (Abbott i sur., 2003; Gorke i sur., 2008), ili urea (Abbott i sur., 2003; Imperato i sur., 2005; Gore i sur., 2011). Prirodni proizvodi su doista bogat i idealan izvor IL i DES zbog njihove ogromne kemijske raznolikosti, biorazgradivih svojstava i farmaceutski prihvatljivog profila toksičnosti. Pojava ionske IL i DES u živim organizmima može objasniti mnoge od tih bioloških fenomena (Choi i sur., 2011). Ionske tekućine su soli, uglavnom sastavljene od slabo koordiniranih iona s delokaliziranim nabojem, koji imaju niže točke taljenja 100°C i karakterizirane su zanimljivim fizikalno-kemijskim svojstvima, uključujući visoku kemijsku i elektrokemijsku stabilnost, širok raspon viskoznosti i topljivosti u vodi i niži tlak pare na sobnoj temperaturi (Welton i sur., 1999). IL uspješno su primijenjene na mnogim poljima analitičke kemije kao što su kromatografija, kapilarna elektroforeza, masena spektrometrija i priprema uzoraka i (mikro) ekstrakcijske tehnike, kao alternativa tradicionalnim organskim otapalima (Zhang i sur., 2014; Abdelhamid i sur., 2016; Toledo Hijo i sur., 2016). DES, kao podklasa IL-a, pokazuju usporedive karakteristike; oni su jeftiniji i jednostavniji za proizvodnju zbog nižih troškova sirovina, manje toksičnih i često biorazgradivih, što ih čini vrijednim alternativnim otapalima za primjenu „Green Analytical Chemistry“ (Cui i sur., 2017; Kudlak i sur., 2015). Osim svih prednosti DES-a, NADES-ovi su još više ekološki prihvatljivi zbog svog prirodnog podrijetla (Choi i sur., 2011). DES i NADES obično pružaju mrežu akceptora vodikovih veza (HBA) i davatelja vodikove veze (HBD), čime se favorizira proces otapanja ciljnih analita (Li i sur., 2016). HBA je često kvaterna amonijeva sol, dok HBD sadrži amine, karboksilne kiseline, alkohole, polirole ili ugljikohidrate.

Brojni pregledni članci su posvećeni općim trendovima i razvoju DES-a, njihovom sastavu, pripremi i svojstvima, njihovom potencijalu u nanotehnologiji, nanoskalnim i funkcionalnim materijalima i sintezi biodizela, biokatalizi, elektrokemiji, ekstrakciji i odvajanju. Primjena DES u organskim reakcijama za sintezu polimera i srodnih materijala, za reakcije katalizirane lipazom, za organske reakcije metala katalizirane i posredovane metalom, za organokatalizu, biotransformacije i kombinacije višestupanjskih organokatalizatora / enzima, te kao održivi sustavi otapala / katalizatora u organskim transformacijama, također kataliza, organska sinteza, procesi otapanja i ekstrakcije, elektrokemija i kemijska tehnika.

2.3.1.1. DES u analitičkoj kemiji

Korištenje DES-ova u analitičkoj kemiji može se podijeliti u nekoliko grupa:

- primjena za (mikro)ekstrakcije ciljnih analita iz kompleksa matrice nakon kojih slijedi kvantifikacija pomoću analitičkih instrumenata;
- primjena za modifikaciju nanočestica (silicij-dioksid), sorbenata, itd. kako bi se poboljšala njihova učinkovitost;
- primjena za otapanje ili razgradnju krutih uzoraka;
- nanošenje kao eluens nakon disperzijske ekstrakcije čvrste faze (engl. Dispersive Solid Phase Extraction, DSPE) postupak;
- primjena u kromatografiji kao aditiv / modifikacija mobilne faze

Zbog činjenice da je većina DES-a na bazi kolin klorida topiva u vodi, odvajanje DES faze koja sadrži analite odvija se iz homogene vodene otopine uzorka pomoću dodatka aprotičnog organskog otapala. Fenomen samoagregacije može se objasniti jačim interakcijama između aprotičnog otapala i vode u usporedbi s interakcijama između vode i DES-a (Khezeli i sur., 2015; Aydin 2017). Postupak ekstrakcije analita iz organskih tekućih uzoraka (uglavnom biljna ulja) ili organskih otapala i krutih uzoraka (biljke, tlo i hrana) donekle se razlikuju. DES na bazi ChCl nisu topljivi u organskim tekućim uzorcima. DES-ovi su iskorišteni za određivanje hidroksicinaminskih kiselina, fenolnih spojeva i metala u biljnim uljima. Da bi se smanjila viskoznost DES, posebno za analizu uzoraka na krutoj fazi, u smjesu se dodaje voda ili se koristi i grijanje. Nakon ekstrakcije krutih uzoraka, obično se vrši filtracija suspenzija dobivenih centrifugiranjem prije instrumentalne analize.

2.3.1.2. Priprema eutektika

Za pripremu prirodnih dubokih eutektičkih otapala koriste se dvije metode: vakuumsko isparavanje i metoda zagrijavanja.

Metoda zagrijavanja koristi se za dobivanje NADES-a s poznatom količinom vode. Dvokomponentna mješavina s izračunatim količinama vode stavljena je u zatvorenu bocu i zagrijavaju se u vodenoj kupelji ispod $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz miješanje dok se ne stvori bistra tekućina (oko 30-90 min). Kolin klorid, na primjer, u kombinaciji s bilo kojom vrstom primarnog metabolita, može stvarati tekućine. Može se razlikovati pet glavnih skupina: ionske tekućine s kiselinom i baza, NADES na bazi šećera, sa samo neutralnim spojevima, NADES na bazi šećera s bazama,

na bazi šećera, NADES s kiselinama i NADES-om na bazi šećera s aminokiselinama. Iznenadjujuće, različite vrste šećera ili mješavina organskih kiselina mogu također tvoriti tekućine, kao što su fruktoza-glukoza-saharoza (Choi i sur., 2011) i jabučna kiselina-limunska kiselina. Druge kombinacije više od dvije komponente također mogu dovesti do bistrih tekućina, kao što su glukoza-sorbitol-jabučna kiselina ili kolin klorid-prolin-jabučna kiselina. Ove višekomponentne smjese mogu biti bliže NADES-u koji se nalaze u biljkama, budući da biljke, naravno, imaju bazen svih tih metabolita. DES su pripremljeni miješanjem kolin klorida (ChCl) s različitim HBD (npr. fenolom) na 80 °C da se dobije homogena tekućina. Komponente i kratice pripremljenih DES u ovom radu prikazane su u **tablici 1**.

Zbog njihove niske cijene, izvrsne topljivosti i sposobnosti ekstrakcije za polarne spojeve, DES na bazi poliola su primijenjeni u ekstrakciji različitih organskih ciljeva, kao što su fenolne kiseline, regulatori rasta biljaka.

Konkretno, jednostavna priprema, spremnost na upotrebu, biorazgradivost i visoka iskoristivost atoma čine DES obećavajućim razredom novih kemikalija. Kao rezultat njihovog polariteta, neki spojevi kao što su fenoli, flavonoidi, amini i kiseline su ekstrahirani i odvojeni pomoću DES-a iz složenih uzoraka.

Gu i sur. (2014) su koristili DES kao otapala za ekstrakciju u mikroekstrakciji u tekućoj fazi (engl. *Liquid-phase microextraction*, LPME) za ekstrakciju fenola, amina i kiselina iz uzoraka ulja. Tan i sur. (2015) pokazali su da se DES mogu koristiti kao učinkovit medij u LPME za analizu regulatora rasta biljaka u uzorcima jestivog biljnog ulja. Za ekstrakciju fenolnih spojeva iz djevičanskog maslinovog ulja korišteni su različiti DES-i koji se sastoje od ChCl u različitim omjerima miješanja s organskim kiselinama, alkoholima, šećerima i ureom.

Tang i sur. (2014) proširili su ChCl-etilen glikol kao ekstrakcijsko otapalo za mikroekstrakciju s jednim kapom, a primijenjeni su na analizu bioaktivnih terpenoida. Nedavno su DES pokazali dobro otapanje biopolimera, kao što su alfa-chitin celulozna biomasa i lignin gdje su celuloza i lignin biopolimeri, kao i glavne komponente stanične stijenke. Rastapanje ovih spojeva pomoću DES-a vjerojatno je formiralo nove vodikove veze između otapala i biopolimera teoretski, više spojeva trebalo bi se ispustiti u otapalo puknućem stanične stijenke.

2.4. OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE

Optimizacija općenito podrazumijeva poboljšanje svojstava nekog sustava ili procesa uz postizanje maksimalnog prinosa (odziva) uz što manje troškove (Pejić, 2010). Pojam

optimizacije je uobičajeno korišten u analitičkoj kemiji kao sredstvo otkrivanja uvjeta u kojima se primjenjuju postupci koji stvaraju najbolji mogući odziv. Tradicionalno se optimizacija u analitičkoj kemiji provodila zbog praćenja utjecaja jednog parametra u vremenu na neki eksperimentalni odziv. Kod ovakve optimizacije jedan faktor je bio podložan promjeni dok se drugi držao na konstantnoj razini (Bezerra, 2008). Budući da većina tehnoloških procesa ovisi o brojnim procesnim parametrima, praćenjem i mijenjanjem samo jednog parametra uz ostale konstantne parametre nije moguće dobiti stvarnu sliku utjecaja procesnih parametara na promatrani proces. Razlog tome je što takav pristup optimizaciji zahtjeva veliki utrošak vremena i veliki broj eksperimenata, a ne uzima u obzir interakciju promatranih parametara procesa. Međutim u novije vrijeme sve se više u optimizaciji procesa koriste multivarijantne statističke tehnike koje uzimaju u razmatranje i interakciju ispitivanih parametara procesa (Liyana-Pathirana, 2005).

Metoda odzivne površine (engl. *Response Surface Methodology* - RSM) spada u najčešće korištene postupke statistički planiranih eksperimenata. Ova metoda predstavlja skup empirijskih i statističkih tehnika kojima se modeliraju i analiziraju utjecaji nezavisnih varijabli (faktori, procesni parametri) na promatrani odziv regresijskom analizom s ciljem poboljšanja, razvoja i optimiranja procesa.

Metodu odzivnih površina prvi su uveli Box i Wilson sredinom 20. stoljeća, a kasnijoj popularizaciji ove tehnike pridonio je Montgomery (Myers i Montgomery, 1995.; Bezerra i sur., 2008.; Edwards i Jutan, 1997).

Osnovni koraci u primjeni metode odzivnih površina kao tehnike optimizacije procesnih uvjeta su:

- odabir nezavisnih varijabli (parametara) koje značajno utječu na promatrani proces s definiranim rasponom ispitivanih parametara;
- izbor dizajna eksperimenta i provođenje eksperimenta prema ponuđenoj shemi kombinacije parametara;
- aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom primjenom matematičko-statističkih metoda;
- evaluacija prikladnosti modela;
- određivanje optimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli (Bezerra, 2008).

Osnovna ideja metode je dobiti odnos utjecajnih faktora (nezavisnih varijabli) na zavisnu varijablu (odziv) preko odzivne funkcije, te razlučiti na koji način članovi modela (ulazni parametri) utječu na promatrani odziv. Prije primjene ove metode potrebno je odabrati odgovarajući dizajn eksperimenta kojim će se definirati eksperimenti koje je potrebno provesti iz ispitivanog eksperimentalnog područja. Provedbom pokusa u svim kombinacijama određenim dizajnom eksperimenta (matrica plana pokusa) dobiva se kontinuirana ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti, a naziva se odzivna ploha. Odzivna funkcija je funkcija koja opisuje odzivnu plohu i ona prikazuje ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama i njihovim interakcijama. Svakoј funkciji moguće je pridružiti odgovarajući polinom i proračunati koeficijente jednadžbe.

Odabir dizajna eksperimenta ovisi o tome kakvu odzivnu funkciju očekujemo. Dizajn eksperimenta za modele prvog reda koristi se samo u slučajevima kada eksperimentalni podaci ne tvore krivulje odnosno kada se mogu aproksimirati linearnom funkcijom. Tada je dobivena aproksimacijska funkcija modela prvog reda (1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \dots + \beta_i \cdot x_i + \varepsilon \quad (1)$$

Kod takvih modela na odzivnu funkciju utječu samo ispitivane nezavisne varijable bez njihove interakcije. Međutim za aproksimaciju eksperimentalnih podataka koji se ne mogu opisati linearnom funkcijom koristi se eksperimentalni dizajn za kvadratni odziv površine odnosno dizajn za modele drugog reda (kvadratni polinom):

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

Gdje su:

Y - modelom predviđena odzivna funkcija,

β_0 - konstanta jednadžbe odzivnog polinoma,

β_i - koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,

β_{ii} - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,

β_{ij} - koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma,

$X_{i,j}$ - ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti).

Takvi modeli daju funkcionalnu ovisnost zavisne varijable o ispitivanim varijablama te njihovoj interakciji, kao i informaciju o maksimumu ili minimumu funkcije (kvadratni član polinoma). Nekoliko najčešće korištenih planova pokusa su:

- Centralno kompozitni plan pokusa (*engl.* Central composite design, CCD);
- Plošno centrirani kompozitni plan (*engl.* Face centred composite design, CCF);
- Box-Behnken plan pokusa (*engl.* Box-Behnken design, BBD);
- Faktorijalni plan pokusa (*engl.* Full factorial design, FFD).

Navedeni planovi pokusa razlikuju se obzirom na broj potrebnih pokusa, odabir eksperimentalnih točaka te razinu ispitivanih varijabli (Bezzer, 2008). Koeficijenti odzivne funkcije (modela) određuju se metodom najmanjih kvadrata. Nakon određivanja koeficijenata odzivne funkcije radi se analiza i test adekvatnosti odzivne funkcije primjenom analize varijance (ANOVA) ili studentovog *t*-testa čime se ističu oni faktori ili njihove interakcije koji značajno utječu na promatrani proces.

2.4.1. Box-Behnkenov plan pokusa

Box-Behnkenov plan pokusa ima prednost nad ostalim u pogledu efikasnosti, odnosno odnosa između broja koeficijenata koji se javljaju u odabranom modelu i broja eksperimenata koje je potrebno izvesti. Ovaj plan pokusa razvili su Box i Behnken 1960 godine. Box-Behnkenov dizajn (**Slika 2**) predlaže kako odabrati točke eksperimenta kada je potrebno ispitati utjecaj više faktora na tri razine uz mogućnost efikasne procjene koeficijenta matematičkih modela prvog i drugog reda. Ovaj dizajn je učinkovit i efikasan zbog mogućnosti ispitivanja većeg broja varijabli i to od 3 do 10.

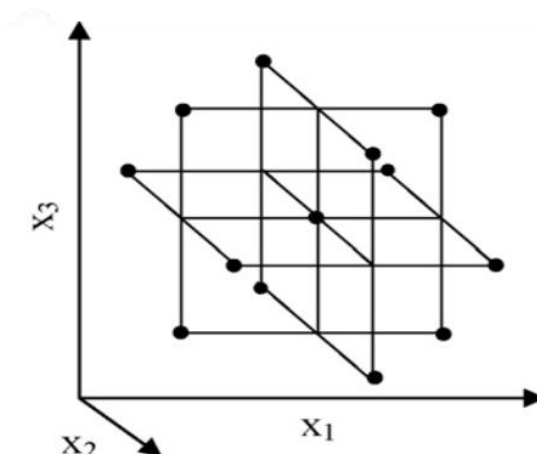
Osnovne karakteristike ovoga dizajna su sljedeće:

- zahtjeva broj eksperimenata prema sljedećem izrazu (3):

$$N = 2^k (k - 1) + c_p \quad (3)$$

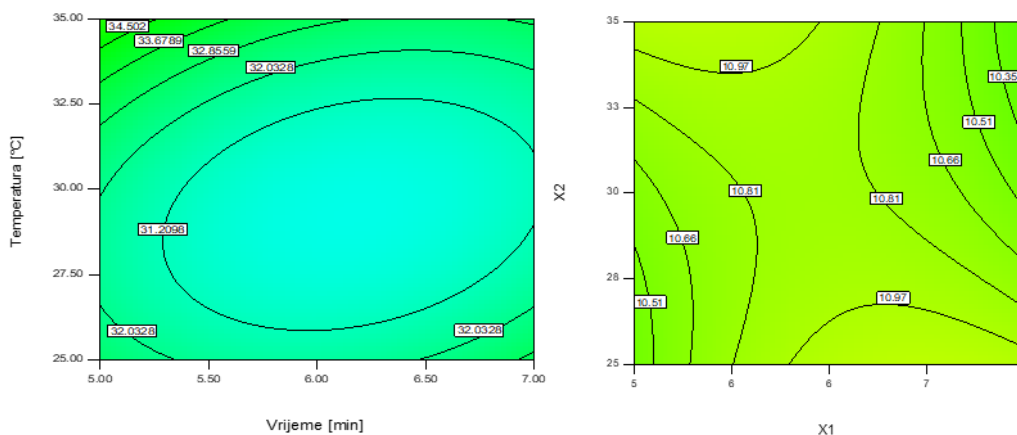
gdje je *k* broj faktora, a *c_p* je broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki

- sve razine faktora moraju se svesti na tri razine (-1, 0, 1) s jednakim intervalom između razina



Slika 2 Primjer Box-Behnkenovog dizajna za tri varijable sa 13 eksperimentalnih točaka (Bezerra, 2008)

Rezultat promatranog procesa (odziv), moguće je opisati i grafički, odzivnom površinom (plohom). Odzivne površine prikazuju se u cijelom eksperimentalnom području s dvije dimenzije, kao konturne površine (**Slika 3**) ili s tri dimenzije pomoću 3D dijagrama (**Slika 4**) (Cox i Reid, 2000; Montgomery i Runger, 2003).

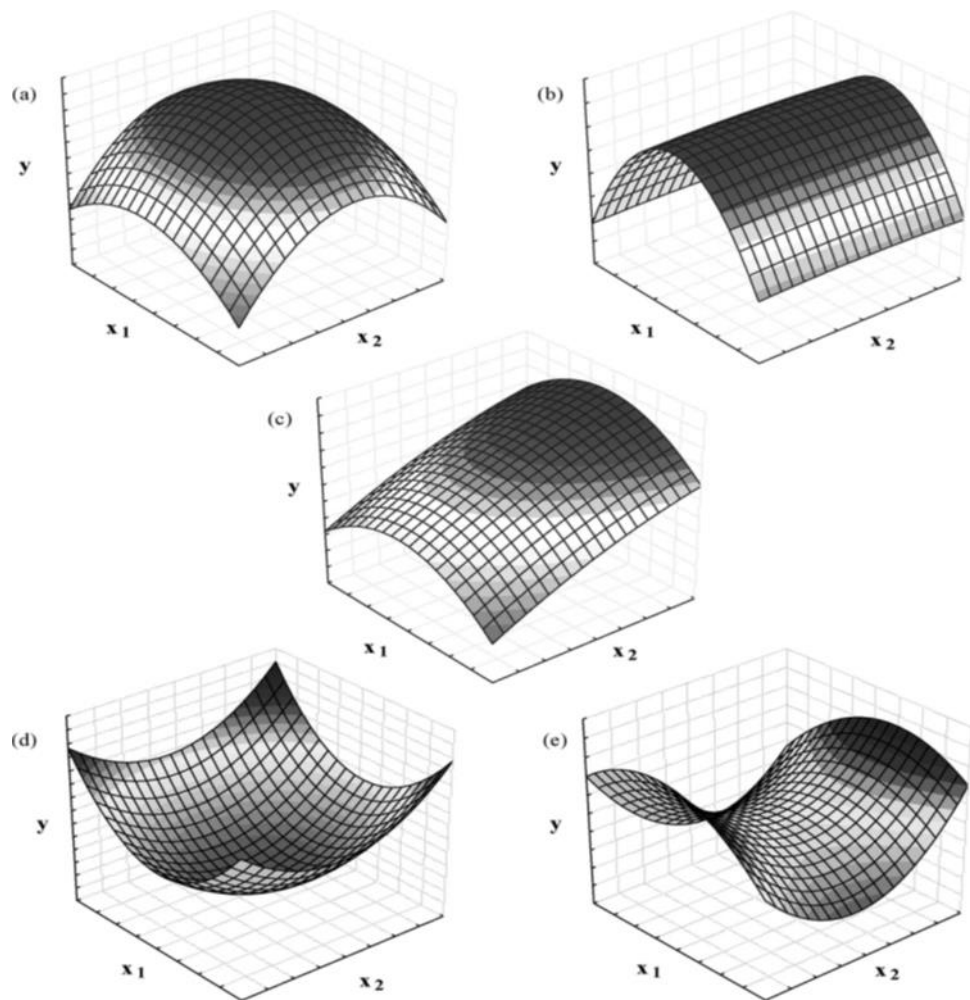


Slika 3 Primjer odzivne površine prikazane konturnim dijagramom (s dvije varijable) (Bezerra, 2008)

Konturni dijagram prikazuje konture odzivne površine, odnosno linije konstantnog odziva. Konture odziva nacrtane su u ravnini x_1x_2 i svaka kontura odgovara određenoj vrijednosti odziva.

Promjena razina nezavisnih varijabli (x_1 i x_2) rezultira promjenom oblika ili visine promatranog odziva pri čemu nastaju različiti mogući izgledi odzivne površine. Obzirom da je u većini RSM

problema oblik veze između odziva i nezavisnih varijabli nepoznat, **slika 4** prikazuje moguće oblike te veze. Dakle, veza između odziva (Y) i nezavisnih varijabli (x_1 i x_2) može biti opisana linearnom ili nelinearnom funkcijom različitog izgleda (sedlasta, u obliku visoravni, sa lokalnim maksimumom ili minimumom i sl.).



Slika 4 3D prikaz mogućeg izgleda odzivnih površina (Bezerra, 2008)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovoga rada realiziran je na Katedri za kemiju i ekologiju, Katedri za primijenjenu kemiju i instrumentalne metode, te na Katedri za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku, a u sklopu projekta “Primjena inovativnih tehnika ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz nusproizvoda biljnoga podrijetla” (HRZZ-UIP-2017-05-9909).

3.1. ZADATAK

- Provesti *screening* različitih eutektičkih otapala i različitih vrsta duhanskog otpada te po odabranom kriteriju udjela ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima odabrati najbolje otapalo i vrstu otpada koja će se koristiti za daljnju optimizaciju;
- Provesti ekstrakciju eutektičkim otapalima, prema Box-Behnkenovom planu pokusa, sa zagrijavanjem od 50 do 90° C, udjelu vode 10 – 30 % i trajanju miješanja od 30 do 90 min s otapalom koje se pokazalo najpovoljnijim u odnosu na *screening* otapala;
- Odrediti udio ukupnih fenola po Folin-Ciocalteu metodi te antioksidacijsku aktivnost dobivenih ekstrakata DPPH testom;
- Odrediti udio dominantnih komponenti u dobivenim ekstraktima primjenom HPLC metode;
- Odrediti utjecaj nezavisnih varijabli (temperatura, vrijeme miješanja i udio vode u otapalu) na zavisne varijable (udio ukupnih fenola, antioksidacijska aktivnost ekstrakata te udjeli rutina i klorogenske kiseline);
- Provesti optimizaciju procesa ekstrakcije uz primjenu programa *Design Expert*[®], metodom odzivnih površina na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnken-ovom planu pokusa.

3.2. MATERIJALI

Duhanski otpad korišten u ovom radu ustupila je tvornica za preradu duhana „Fabrika duhana Sarajevo“ (Sarajevo, Bosna i Hercegovina). Uzorci su prikupljeni u prosincu 2018. godine i čuvani na tamnom i hladnom do analiza.

- duhanska prašina (**slika 5a**);
- rebro (**slika 5b**);

- refabrikat (**slika 5c**);



Slika 5 Duhanska prašina (**a**), rebro (**b**), refabrikat (**c**) (Izvor: autor)

3.2.1. Kemikalije

- Kemijski spojevi navedeni u **tablici 1** za pripremu eutektika - Acros Organics i Gram Mol;
- Metanol - J.T.Baker (New Jersey, PA, SAD);
- Folin – Ciocalteuov reagens - Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Njemačka);
- NaCO₃ - Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Njemačka);
- Fosforna kiselina - J.T.Baker (New Jersey, PA, SAD);
- Standard klorogenske kiseline (čistoće 96,63%) - Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Njemačka);
- Standard rutina (čistoće 94,56%) - Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Njemačka).

3.2.2. Uredaji

- Analitička vaga (AdventurerPro, Ohaus),
- Tehnička vaga (Kern, Njemačka),
- Magnetska miješalica (Unistirer 7 LLG Labware)
- Miješalica – vorteks (MS2 Minishaker IKA)
- Centrifuga (IKA mini G)
- Inkubator (Memmert)
- Spektrofotometar (Shimadzu UV-1280 i Thermospectronic Helios γ)

- HPLC uređaj (Agilent Technologies)

3.3. METODE

3.3.1. Priprava eutektičkih otapala

Eutektici su pripremani prema **tablici 1** na bazi kolin klorida (**slika 6**) u različitim omjerima. Tijekom provođenja preliminarnih istraživanja tzv. screeninga, udio vode, vrijeme miješanja i temperatura su bili konstanti, dok su mijenjane različite vrste otapala. Potrebne mase vagane su u tikvicama sa okruglim dnom na analitičkoj vagi (**slika 7**). Nakon odvage, uzorci su miješani (300 rpm) uz zagrijavanje (50° C), postupak je trajao sve dok otapalo nije poprimilo oblik bezbojne tekućine, što je ovisilo o viskoznosti sastojaka. Nakon pretvorbe smjese u bezbojnu tekućinu, otpipetiran je maksimalni volumen otapala u čašu, nakon čega je dodano 20% vode miliQ (18.2 MΩ/cm).



Slika 6 Kolin klorid - ChCl (Izvor: autor)



Slika 7 Analitička vaga i sastojci za pripravu eutektika (Izvor: autor)

Tablica 1 Popis pripremljenih eutektičkih otapala

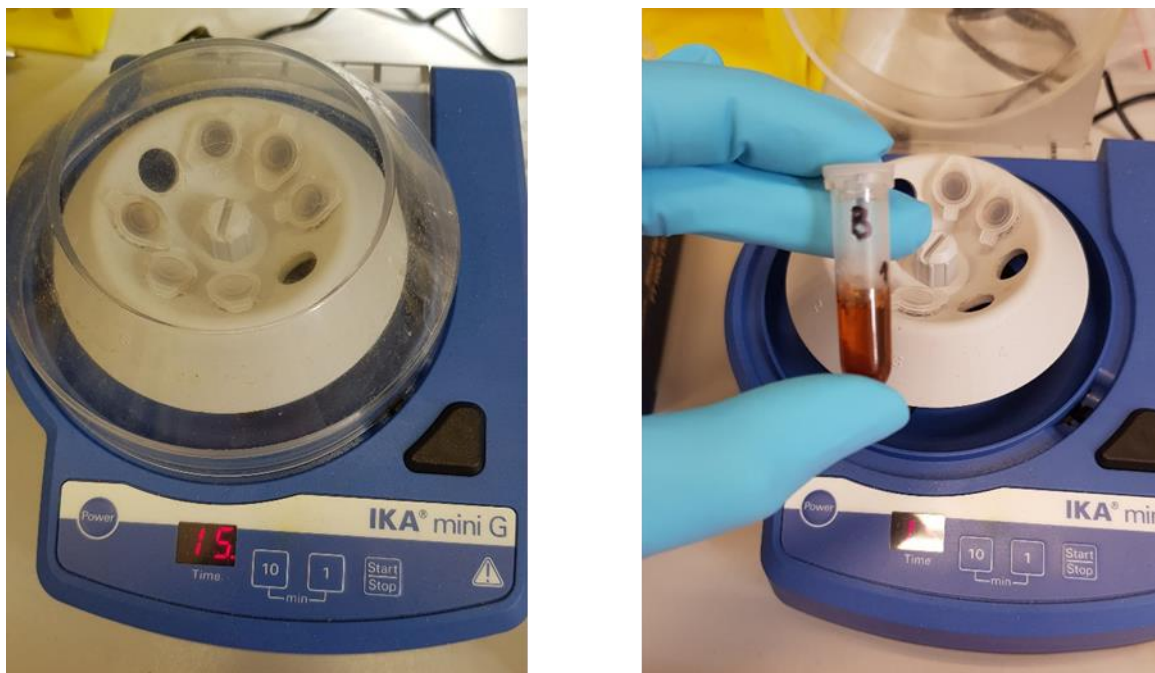
Redni broj eutektika	Spoj 1.	Spoj 2.	Omjer	Mase za odvagu
1.	ChCl	Urea	1:2	5g:4,2g
2.	ChCl	N-metilurea	1:3	5g:7,42g
3.	ChCl	Glukoza	1:1	5g:6,45g
4.	ChCl	Ksilitol	1:1	5g:5,45g
5.	ChCl	Sorbitol	1:1	5g:6,52g
6.	ChCl	Butan-1,4-diol	1:2	5g:6,35ml
7.	ChCl	Etan-1,2-diol	1:2	5g:4ml
8.	ChCl	Glicerol	1:2	5,6g:5,24ml
9.	ChCl	Acetamid	1:2	5g:4,23g
10.	ChCl	Jabučna kis.	1:1	5g:4,8g
11.	ChCl	Limunska kis.	1:2	3g:8,26g
12.	ChCl	Malonska kis.	1:1	5g:3,75g
13.	ChCl	Oksalna kis.	1:1	5,6g:3,6g
14.	ChCl	Mliječna kis.	1:1	5g:2,67ml
15.	ChCl	Levulinska kis.	1:1	5g:3,65ml

3.3.2. *Screening* eutektičkih otapala i tri vrste duhanskog otpada

Tri vrste duhanskog otpada su odvagane su u eppendorf epruvete (1,5 ml) (**slika 9 desno**) u količini od 50 mg na analitičkoj vagi. Svi su uzorci pripremani u dvije paralele na tri vrste duhanskog otpada, duhanska prašina, rebro i refabrikat. Za potrebe *screeninga*, odnosno odabira najboljeg otapala za ekstrakciju provedene su ekstrakcije na 3 vrste otpada sa 17 različitih otapala. Eutektička otapala su pripremljena, kako je prethodno navedeno u **tablici 1**. Na 50 mg uzorka dodano je 1 ml odgovarajućeg eutektičkog otapala. Uzorci se miješaju (**slika 8**) uz zagrijavanje na 50°C kroz 30 minuta. Nakon završetka ekstrakcije, ekstrakt je centrifugiran (**slika 9**) u trajanju od 15 min. Uzorci su razrijeđeni na 10 mg/ml metanolom. Svi uzorci pripremljeni su u dvije paralele. Kao kriterij za odabir najboljeg otapala, kao i otpada na kojem će se provoditi daljnje analize odabran je sadržaj ukupnih fenola određen metodom po Folin-Ciocalteu metodi.



Slika 8 Magnetska miješalica (Izvor: autor)



Slika 9 Centrifuga (Izvor: Autor)

3.3.3. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli određivani su metodom po Folin-Ciocalteu. Metoda je spektrofotometrijska i temelji se na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa i nastajanju obojenog produkta, fenolne grupe oksidiraju se do kinona dodatkom smjese molibdofosfatnih i volframfosfatnih aniona koji se reduciraju i daju plavo obojenje. Nereducirani Folin-Ciocalteu reagens je žute boje dok reducirani ima stabilnu plavu boju. Intenzitet obojenja mjeren je određivanjem apsorbancije kod 765 nm u odnosu na slijepu probu.

REAGENSI:

-Folin-Ciocalteu reagens (Folin-Ciocalteu reagens je kupljen kao gotova već pripravljena kemikalija). Folin-Ciocalteuov reagens je smjesa fosfovolframske i fosfomolibdenske kiseline

-20% -tna otopina natrijeva karbonata – Otopljeno 200 g bezvodnog natrijeva karbonata u 1 litri vode kuhanjem.

POSTUPAK:

U Eppendorf epruvete je dodano 20 μL uzroka razrijeđenog na 10 mg/ml te se doda 100 μL Folinovog reagensa, 300 μL 20%-tnog natrijeva karbonata (Na_2CO_3), zatim 1580 μL mQ vode. Slijepa proba pripravljena je kako slijedi 100 μL Folinovog reagensa, 300 μL natrijeva karbonata (Na_2CO_3), te 1600 μL mQ vode, prikazano na **slici 10**.

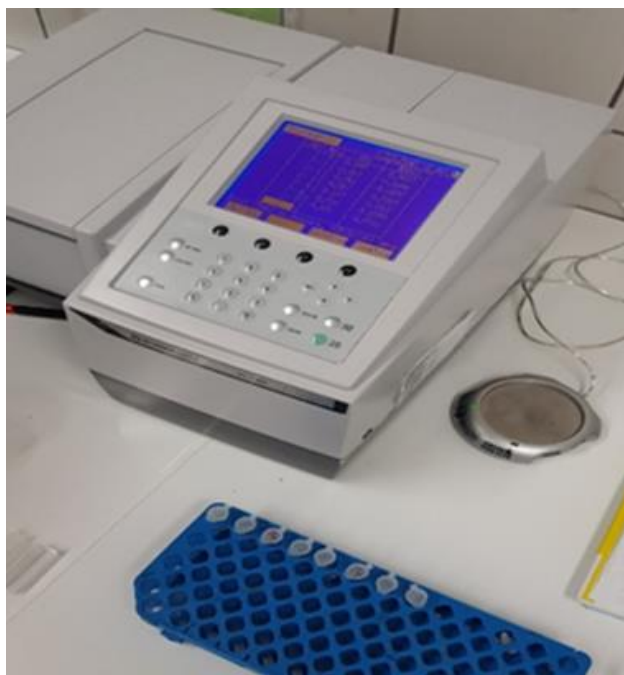


Slika 10 Prikaz postupka pripreme (Izvor: autor)

Uzorci su termostimirani 30 min na 40°C u prethodno zagrijanom uređaju za inkubaciju/termostatiranje (**slika 11**), nakon čega je mjerena apsorbancija spektrofotometrom (**slika 12**) na 765 nm u tri paralele. Rezultati su izračunati prema kalibracijskim krivuljama masenog udjela galne kiseline i ukupnih fenola, te izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po litri ekstrakta.



Slika 11 Uređaj za inkubaciju/termostatiranje (Izvor: autor)

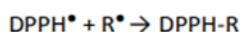


Slika 12 Spektrofotometar (Izvor: autor)

3.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Kod DPPH testa, uklanjanje DPPH· radikala je praćeno smanjenjem apsorbancije na 517 nm, do koje dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa ili reakcije sa slobodnim radikalima. Određivanje postotka aktivnosti DPPH uklanjanja radikala provedeno je tako da je 1,2 mL uzorka koncentracije 250 µg/mL pomiješano je s 0,5 ml svježe otopine DPPH (0,2 mM). Nakon 30 minuta, apsorbancija je određena na 517 nm. Određivanje je provedeno u tri ponavljanja i izraženo kao % aktivnosti vezanja (% DPPH). Sva mjerenja provedena su u tri ponavljanja.

Reakcije su prikazane kao:



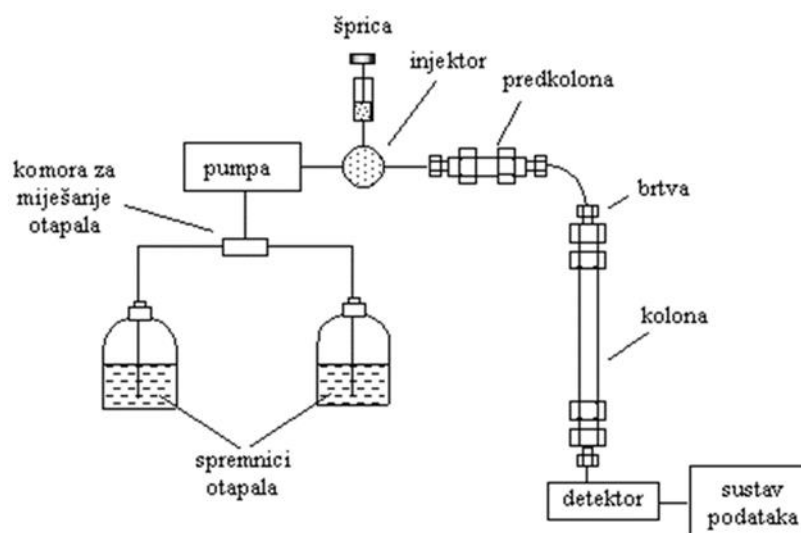
Moć hvatanja slobodnih radikala (*engl.* Radical scavenging activity, RSA) izračunata je kao omjer smanjenja apsorbancije otopine DPPH-a nakon dodatka otopine uzorka i apsorbancije otopine DPPH-a kojoj nije dodana otopina uzorka, prema jednadžbi (4):

$$\% \text{ DPPH activity} = \frac{(ADPPH + AB) - AS}{ADPPH} \times 100 \quad (4)$$

3.3.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

HPLC je visoko efikasna razdjelna kromatografija koja se u 75% primjena danas koristi kao kromatografija obrnutih faza. Osnovni konstrukcijski dijelovi u HPLC kromatografu su rezervoar za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, po mogućnosti predkolona, kolona za odjeljivanje i detektor (**slika 13**). Sadržaj polifenola određen je pomoću HPLC (Agilent technology 1260 Infinity II) (**slika 14**). Instrument je opremljen kvaternom pumpom, autosamplernom, termostatiranom kolonom te detektorom niza dioda (DAD). Korištena kolona je Zorbax Eclipse Plus C18 (veličina čestica 10 mm x 4.6 mm, 5 μ m) i kromatografija je provedena na sobnoj temperaturi (22 ° C). Sadržaj polifenola određen je modificiranom metodom opisanom u Wang i sur. 2010., pod slijedećim uvjetima: mobilna faza: 0,1% fosforna kiselina / metanol (55:45, v / v), injektirani volumen 20 μ l i brzina protoka 0,5 mL/min, dok je vrijeme analize bilo 10 min. Analiza je praćena na 210 nm na DAD detektoru.

Standardne temeljne otopine za klorogensku kiselinu i rutin pripremljene su u vodi u osam koncentracija (raspon koncentracija 20.0, 30.00, 50.0, 75.0, 100.0, 150.00, 200.0, mg/L). Linearnost kalibracijske krivulje potvrđena je s $R^2 = 0.99940$ za klorogensku kiselinu i $R^2 = 0.99890$ za rutin. Granica detekcije klorogenske kiseline (LOD) bila je 0,00036 mg/L, granica kvantifikacije (LOQ) bila je 0,0012 mg/L, a retencijsko vrijeme spoja 2,564 min. Granica detekcije rutina (LOD) bila je 0,0020 mg/L, granica kvantifikacije (LOQ) bila je 0,0068 mg/L, a retencijsko vrijeme spoja 6,704 min.



Slika 13 Shematski prikaz HPLC kromatografa (izvor: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm)



Slika 14 HPLC uređaj (Izvor: autor)

3.3.6. Optimiranje procesa ekstrakcije duhanskog otpada s eutektičkim otapalima primjenom metode odzivnih površina

U ovom radu korišten je Box-Behnken-ov plan pokusa za procjenu utjecaja procesnih parametara (vremena, temperature i udjela vode u otapalu) na iskorištenje i kvalitetu ekstrakcije; odnosno na udio ukupnih fenola, antioksidacijsku aktivnost, udio klorogenske kiseline i rutina, u duhanskom otpadu. Za potrebe ovog istraživanja odabrane su tri različite nezavisne varijable: vrijeme miješanja (X_1), temperatura zagrijavanja (X_2), udio vode u otapalu (X_3). Nezavisne varijable u kodiranom i nekodiranom obliku prikazane su u **Tablici 2**.

Tablica 2 Nekodirane i kodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu

Nezavisne varijable	Oznaka	Razina		
		Donja (-1)	Centralna (0)	Gornja (1)
Vrijeme miješanja (min)	X_1	30	60	90
Temperatura (°C)	X_2	30	50	70
Udio vode u otapalu (%)	X_3	10	20	30

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provedeno je sedamnaest eksperimenata ekstrakcije. Dobiveni eksperimentalni podaci su aproksimirani sa matematičkim modelom (2) odzivnih površina tj. polinomom drugog reda.

Na osnovi dobivenog matematičkog modela (polinoma) konstruirana je odzivna površina koja omogućava vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane procese. Odzivna površina može se prikazati kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina.

Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane procese te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara provedena je primjenom softverskog paketa *Design-Expert*®, v.7 (Stat Ease, Minneapolis, USA). Prednost ovog programa je što može raditi s kodiranim i nekodiranim varijablama.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 3 Vrijednosti ukupnih polifenola u uzorcima duhanske prašine, rebra i refabrikata
(c=1 mg/ml)

Vrsta otapala	Broj ponavljanja	Vrsta duhanskog otpada					
		Duhanska prašina	Srednja vrijednost	Rebro	Srednja vrijednost	Refabrikat	Srednja vrijednost
ChCl - urea	1	74,69	76,10	60,33	67,00	88,28	89,95
	1'	77,51		73,67		91,62	
ChCl – N - metilurea	2	44,44	42,64	37,51	36,23	60,59	53,92
	2'	40,85		34,95		47,26	
ChCl - Glukoza	3	19,31	21,10	26,23	30,33	22,89	22,51
	3'	22,89		34,44		22,13	
ChCl - Ksilitol	4	27,51	31,62	15,46	29,56	43,67	34,31
	4'	35,72		43,67		24,95	
ChCl - Sorbitol	5	27,51	42,38	46,49	46,36	59,82	50,59
	5'	57,26		46,23		41,36	
ChCl - Butan - 1,4-diol	6	22,64	28,79	49,82	48,03	74,95	80,59
	6'	34,95		46,23		86,23	
ChCl – Etan - 1,2 – diol	7	75,46	67,26	87,51	88,54	108,28	110,08
	7'	59,05		89,56		111,87	
ChCl - Glicerol	8	51,36	50,85	37,51	43,79	30,08	25,97
	8'	50,33		50,08		21,87	
ChCl -Acetamid	9	90,33	87,00	94,18	92,39	86,49	97,77
	9'	83,67		90,59		109,05	
ChCl -Jabučna kis.	10	24,69	48,67	46,23	49,95	99,05	85,97
	10'	72,64		53,67		72,89	
ChCl - Limunska kis.	11	46,23	34,44	23,67	18,92	81,62	60,21
	11'	22,64		14,18		38,79	
ChCl -Malonska k.	12	93,15	85,46	33,15	40,72	82,13	92,13
	12'	77,77		48,28		102,13	
ChCl -Oksalna kis.	13	46,23	35,21	39,31	31,49	25,72	49,31
	13'	24,18		23,67		72,89	
ChCl -Mliječna kis.	14	107,51	80,97	71,36	79,69	64,44	70,21
	14'	54,44		88,03		75,97	
ChCl - Levulinska kis.	15	73,41	85,59	93,41	87,51	89,56	90,85
	15'	97,77		81,63		92,13	

Svaki uzorak označen kao npr. 1',2',...,15', odnosno „ertano“, oznaka je za drugo ponavljanje istog uzorka

Obavljen je screening 15 različitih otapala i 3 vrste otpada (duhanska prašina, rebro i refabrikat) u dva ponavljanja. Kao kriterij za odabir najboljeg otapala i otpada korišten je udio ukupnih fenola prema Folin-Ciocalteu metodi. Određivanje ukupnih fenola odrađeno je u tri paralele.

S obzirom na rezultate dobivenih ukupnih fenola, uspoređene s kalibracijskim pravcem za galnu kiselinu, usporedivši 3 otpada, rezultati su pokazali da je najveći udio ukupnih fenola u duhanskom otpadu – refabrikatu. Zatim je prema istom kriteriju odabrano otapalo u kojem je otopljen refabrikat, koji je dao najveće vrijednosti ukupnih fenola. Iz rezultata u **tablici 3**, vidljiva je visoka vrijednost ukupnih polifenola u uzorku refabrikata (u prvom mjerenju 108,28 mg GAE/L, u drugom ponavljanju 111,87 mg GAE/L, odnosno srednja vrijednost 110,08 mg GAE/L), otopljenog u eutektiku ChCl - Etan -1,2 – diolu odnosno ChCl - etilen glikolu, te je isti odabran za daljnje analize i optimizaciju.

Nakon toga su na odabranom uzorku refabrikata s odabranim otapalom ChCl– etilen glikolom, na temelju Box-Behnkenovog plana pokusa (**tablica 4**) provedene ekstrakcije, tijekom kojih se mijenjani parametri ekstrakcije: vrijeme miješanja (u rasponu 30 do 90 minuta), temperatura miješanja (30 - 70°C) te udio vode u otapalu (u rasponu od 10 do 30%). Nakon pripreme ekstrakata, ekstrakti su čuvani na tamnom i hladnom (4°C) do daljnjih analiza.

Tablica 4 Eksperimentalna matrica pokusa

Broj uzorka po redu za optimizaciju	Vrijeme miješanja i zagrijavanja (min)	Temperatura miješanja (°C)	Udio vode u otapalu (%)
1.	60	30	30
2.	60	50	20
3.	30	70	20
4.	90	50	30
5.	30	50	10
6.	60	30	10
7.	90	50	10
8.	90	30	20
9.	90	70	20
10.	60	70	30
11.	60	70	10
12.	30	30	20
13.	60	50	20
14.	60	50	20

15.	60	50	20
16.	60	50	20
17.	30	50	30

Odvagano je 17 uzoraka refabrikata u masi od 50 mg, u dvije paralele, odnosno sveukupno 34 ependorff epruvete sa uzorkom refabrikata. Pripremljeni ekstrakti su razrijeđeni na koncentraciju 10 mg/ml te im je izmjeren udio ukupnih fenola metodom po Folin-Ciocalteu.

Tablica 5 Vrijednosti ukupnih polifenola, antioksidacijske aktivnosti te udjela klorogenske kiseline i rutina uzorka refabrikata i etilen-glikola pripremljenih prema tablici 4

Broj uzorka (premaBBD)	Ukupni fenoli (mg GAE/L)	% DPPH	Klorogenska kiselina ($\mu\text{g/ml}$)	Rutin ($\mu\text{g/ml}$)
1.	90,21	36,97	6,56	17,85
2.	67,52	29,45	5,27	14,85
3.	86,10	30,03	8,07	14,04
4.	113,41	44,68	-	17,85
5.	63,54	29,32	6,86	9,27
6.	52,89	31,42	8,78	10,42
7.	80,08	22,56	7,84	13,67
8.	69,95	31,83	6,92	14,16
9.	125,08	44,34	-	15,82
10.	147,26	41,60	-	17,67
11.	105,97	44,24	4,66	12,06
12.	67,51	30,18	6,66	12,24
13.	67,51	26,98	4,29	14,81
14.	67,51	26,73	6,70	14,79
15.	67,51	25,44	5,69	14,92
16.	67,51	24,05	5,71	14,86
17.	102,77	39,40	8,26	14,31

Vrijednosti ukupnih fenola su se kretale od 52,89 mg GAE/L za uzorak broj 6 (vrijeme miješanja i zagrijavanja 60 min, temperatura miješanja 30°C i udio vode u otapalu 10%) do najviše vrijednosti 147,26 mg GAE/L za uzorak broj 10 (vrijeme miješanja i zagrijavanja 60

min, temperatura miješanja 70°C i udio vode u otapalu 30%). Kao što je vidljivo iz **tablice 4** najveća vrijednost ukupnih fenola bila je pri uvjetima vremena miješanja i zagrijavanja u trajanju od 60 min, temperature 70 °C i udjela vode 30 %. Najmanje vrijednosti ukupnih polifenola zabilježene su kod uzorka dobivenog pri uvjetima vremena miješanja i zagrijavanja u trajanju od 60 min, temperature 30 °C, i udjelu vode 10 %. Prema tome moglo bi se zaključiti da udio vode, odnosno razrjeđenje znatno utječe na svojstva uspješnosti apsorbancije, kao i povišena temperatura pri kojoj je uzorak zagrijavan u zadanom vremenskom razdoblju. Dobivene vrijednosti apsorbancija na spektrofotometru za uzorke, preračunati su pomoću jednadžbe (5) i dobiven je postotak (%) aktivnosti vezanja, odnosno uklanjanje DPPH· radikala.

$$\% \text{ DPPH activity} = \frac{(ADPPH + AB) - AS}{ADPPH} \times 100 \quad (5)$$

Iz **tablice 5** možemo uočiti visoku antioksidacijsku aktivnost uzorka 4 (vrijeme miješanja i zagrijavanja 90 min, temperatura miješanja 50°C i udio vode u otapalu 30%), u iznosu od 44,68 % i niske vrijednosti kod uzorka 7 (vrijeme miješanja i zagrijavanja 90 min, temperatura miješanja 50°C i udio vode u otapalu 10%), u iznosu od 22,56 %. Ekstrakt refabrikata dobiven eutektičkim otapalom etilenglikolom pod uvjetima 50°C, vremenom miješanja 90 minuta s 30 % vode, vezao je 44,68 % slobodnih radikala iz otopine DPPH, što znači da ima određenu antioksidacijsku aktivnost. Suprotno tome, ekstrakt refabrikata, ekstrahiran eutektičkim otapalom etilenglikolom pod uvjetima 50°C, vremenom miješanja 90 minuta s 10 % vode vezao je tek 22,56 % slobodnih radikala iz otopine DPPH, što znači da ovaj uzorak i dalje ima određenu antioksidacijsku aktivnost, ali nisku, s obzirom na prethodno spomenuti uzorak. Iako je sa stajališta energetske uštede poželjno da proces traje kraće, može se primijetiti da se i najviša i najniža aktivnost pokazala kod uzoraka koji su zagrijavani 90 min, odnosno u najdužem vremenskom razdoblju u odnosu na uzorke koji su zagrijavani i 30 min, odnosno sat vremena. Druga najviša antioksidacijska aktivnost u iznosu od 44,34 % izmjerena je kod uzorka koji je također zagrijavan 90 min, dok je treća po redu aktivnost 44,24 %, koja je neznatno niža od prve, dobivena kod uzorka koji je zagrijavan 60 min. Tako da, ukoliko se želi ostvariti energetska ušteda, a pritom dobiti zadovoljavajući rezultat antioksidacijske aktivnosti, potrebno je pravilno podesiti vrijeme ekstrakcije. Npr. u vremenu od 60 min dobivaju se zadovoljavajuće vrijednosti (uzorak br. 11), no s druge strane taj uzorak je potrebno zagrijavati na temperaturi od 70°C, što se nastoji izbjeći upravo zbog termolabilnih komponenti ekstrakta. Upravo zbog

toga potrebno je provesti optimizaciju procesa, kako bi se uz što veće energetske uštede i na što nižim temperaturama dobili ekstrakti odgovarajuće kvalitete.

Prethodna istraživanja pokazala su kako su klorogenska kiselina i rutin, dominantni fenolni spojevi u duhanskom otpadu. Wang i sur. (2010), u svom istraživanju su razvili HPLC metodu koja je primijenjena za kvalitativno određivanje polifenola u duhanskom otpadu i određivanje sadržaja klorogenih kiselina i rutina u duhanskom otpadu. Njihova studija pokazala se kao ispravna klasifikacija raznolikosti duhanskog otpada u kontroli kvalitete duhanskog otpada. U njihovoj studiji razvijene su metode hibridnog staničnog automata (engl. *Hybrid Cellular Automaton*, HCA) i analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) kako bi se duhanski otpad procijenio kao resurs visoke dodane vrijednosti. Ipak zabilježene su određene razlike među sortama duhana prema izračunima HCA metodom i PCA uzorka. Razlozi za varijacije u sadržaju polifenola u duhanskom otpadu mogu biti u podrijetlu duhana, smještaju samog postrojenja, učinku okoliša i / ili drugim čimbenicima, kao što su sezona prikupljanja, korišteni procesi sušenja, uvjeti skladištenja itd.

Na temelju tih istraživanja, HPLC metodom detektirana je prisutnost klorogenske kiseline i rutina, kao dominantnih komponenti u ekstraktima duhanskog otpada te su rezultati izraženi kao $\mu\text{g/ml}$ u tablici 4. Najveće koncentracije klorogenske kiseline u iznosu od $8,78 \mu\text{g/ml}$ uočene su u uzorku br. 6 (vrijeme miješanja i zagrijavanja 60 min, temperatura miješanja 30°C i udio vode u otapalu 10%), a najniže koncentracije klorogenske kiseline u uzorku br. 13 (vrijeme miješanja i zagrijavanja 60 min, temperatura miješanja 50°C i udio vode u otapalu 20%).

Najviše klorogenske kiseline detektirano je u uzorku koji je pripremljen pri uvjetima miješanja na 30°C u trajanju od 60 min, razrijeđenim s 10 % vode, a najmanje u uzorku koji je pripremljen pri uvjetima miješanja na 50°C u trajanju od 60 min, razrijeđenim s 20 % vode, što je povezano s polarnošću. Naime, dodatak vode može prilagoditi DES svojstva na način da smanji viskoznost i površinsku napetost te poveća polarnost otopine. Prilagođena koncentracija DES smjese i vode može tako značajno poboljšati ekstrakcijske prinose. Također prevelika koncentracija vode može pokidati vodikove veze u DES smjesi te tako smanjiti interakcije između DES-a i ciljane komponente te posljedično smanjiti prinose.

Najveće koncentracije rutina, zabilježene su kod uzorka br. 1 (vrijeme miješanja i zagrijavanja 60 min, temperatura miješanja 30°C i udio vode u otapalu 30%), a najniže kod uzorka br. 5 (vrijeme miješanja i zagrijavanja 30 min, temperatura miješanja 50°C i udio vode u otapalu

10%). Najviše rutina ekstrahirano je u uzorku koji je pripremljen pri uvjetima miješanja na 30°C u trajanju od 60 min, razrijeđenim s 30% vode, a najmanje u uzorku koji je pripremljen pri uvjetima miješanja na 50°C u trajanju od 30 min, razrijeđenim s 10 % vode, što ukazuje na to da se rutin bolje otopio u većem volumenu vode, i pri nižoj temperaturi, što ukazuje i na moguću termolabilnost, iako Ledesma-Escobar i sur. (2016), u svojem istraživanju ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka (UAE), ekstrakcije pomoću mikrovalova (engl. *Microwave Assisted Extraction*, MAE) i pregrijane tekuće ekstrakcije (engl. *Superheated Liquid Extraction*, SHLE), zaključuju kako su dobiveni produkti, među kojima su i polifenoli, izrazito termostabilni.

4.1. OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE EUTEKTIČKIM OTAPALIMA IZ DUHANSKOG OTPADA PRIMJENOM METODE ODZIVNIH POVRŠINA

Metoda odzivnih površina kao skup matematičkih i statističkih tehnika pokazala se kao koristan alat u razvoju, poboljšanju i optimizaciji procesa uz smanjen broj potrebnih eksperimenata. Ova metoda omogućava planiranje pokusa tako da se provode samo neki eksperimenti s određenim kombinacijama procesnih parametara na osnovu kojih je moguće odrediti optimalne parametre procesa uz ekonomsku i energetska uštedu (Carley i sur., 2004). U ovom radu planiranje pokusa kao i statistička obrada dobivenih podataka i određivanje optimalnih uvjeta provedeni su pomoću programskog paketa *Design Expert 7.1.6.*, a korištena je Box-Behnken metoda odzivnih površina. Da bi se ispitao utjecaj nezavisnih varijabli ekstrakcije (vremena, temperature i udjela vode u otapalu) na zavisne varijable te provjerila prikladnost primijenjenog Box-Behnken plana pokusa u modeliranju i optimiranju procesa ekstrakcije, provedena je aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom tj. polinomom drugog reda prema izrazu (2).

Model i njegovi koeficijenti dobiveni su statističkom metodom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka, a model daje funkcionalnu ovisnost između zavisni i nezavisnih varijabli, pa prema tome model može biti linearan, kvadratni ili srednja vrijednost ukoliko nema značajnog utjecaja istraživanih faktora. U daljnjem tekstu, model za svaku zavisnu varijablu biti će napisan posebno.

Tablica 6 Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za ukupne fenole

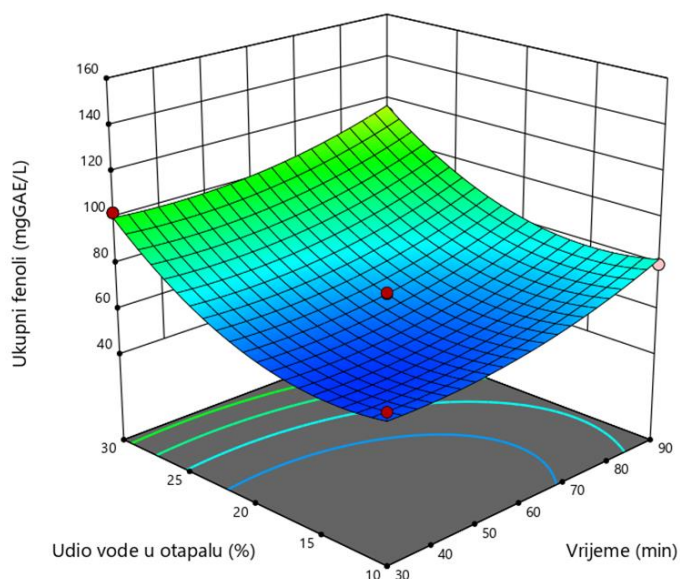
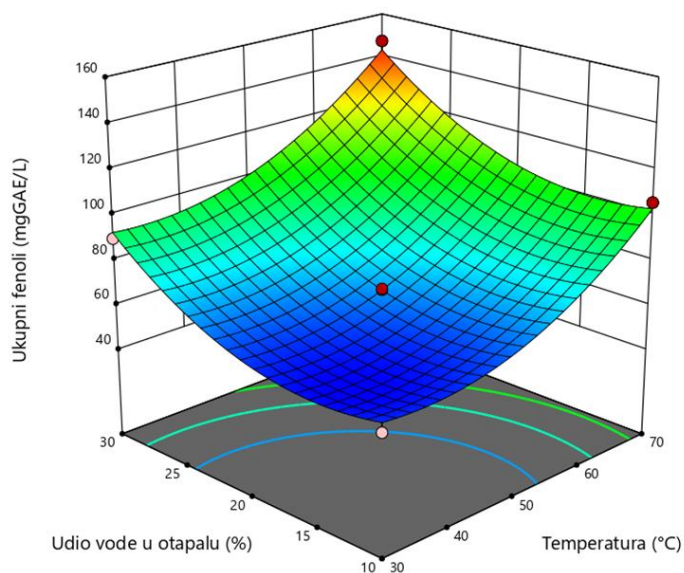
Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode Df	Varijanca MS	f-vrijednost	p-vrijednost
Model	11404,09	9	1267,12	52,73	< 0.0001
X_1 – Vrijeme	754,66	1	754,66	31,40	0,0008
X_2 - Temperatura	4663,37	1	4663,37	194,06	< 0.0001
X_3 - Udio vode u otapalu	2848,24	1	2848,24	118,53	< 0.0001
X_1X_2	520,75	1	520,75	21,67	0,0023
X_1X_3	8,70	1	8,70	0,3621	0,5663
X_2X_3	4,39	1	4,39	0,1826	0,6819
X_1^2	190,83	1	190,83	7,94	0,0258
X_2^2	1053,08	1	1053,08	43,82	0,0003
X_3^2	1122,78	1	1122,78	46,72	0,0002
OSTATAK	168,21	7	24,03		
NEDOSTATAK MODELA	166,94	3	55,65	175,17	0,0001
POGREŠKA	1,27	4	0,3177		
UKUPNO	11572,31	16			
R^2	0,9855				

Tablica 6 pokazuje regresijske koeficijente dobivene odgovarajućim eksperimentalnim podacima polinomom drugog reda za ispitivane odzive. Koeficijenti se odnose na kodirane varijable. Vjerojatnost (p -vrijednost) ovog regresijskih modela je bila ispod 0,05, što ukazuje na to da je statistički značajna veza između nezavisnih varijabli i odzivnih varijabli. Analiza varijance (ANOVA), na osnovu koje se može preciznije utvrditi opravdanost primjenjivosti odabranog modela, prikazana je u **Tablici 6**. Stupanj i smjer slaganja varijabli procjenjuje se pomoću koeficijenta korelacije. Koeficijent korelacije R^2 je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka i u idealnom slučaju iznosi 1 (Knezović, 2014; Pejić, 2010). Joglekar i May (1987) naveli su da za dobar model vrijednost koeficijenta korelacije treba biti najmanje 0,80. U našem istraživanju, vrijednost R^2 za promatrane odzive je bila veća od 0,80, iznosila je 0,9855 što nam govori da je primijenjeni regresijski model odgovarao eksperimentalno predviđenim podacima. Prema **tablici 6** vidljivo je da vrijeme miješanja (X_1), temperatura (X_2), udio vode u otapalu (X_3) imaju značajan utjecaj ($p < 0,05$) na ukupan udio fenola. Kombinacija parametara X_1X_2 također imaju značajan utjecaj na udio fenola, kao i kvadratne vrijednosti triju parametara, X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 , dok kombinacija parametra X_1X_3 (p -vrijednost = 0,5663) i X_2X_3 (p -vrijednost = 0,6819) nije statistički značajna.

Model u kodiranim vrijednostima, za ukupne fenole:

$$\text{Ukupni fenoli} = 66,89 + 9,71X_1 + 24,14X_2 + 18,87X_3 + 6,73X_1^2 + 15,81X_2^2 + 16,33X_3^2 + 11,41X_1X_2 - 1,48X_1X_3 + 1,05X_2X_3 \quad (6)$$

Najbolji način da se prikaže utjecaj parametara (temperature, vremena miješanja i udjela vode u otapalu) na zavisne varijable (udio fenola, antioksidacijsku aktivnost, udio klorogenske kiseline i rutin) unutar ispitivanog područja je korištenjem odzivnih površina odnosno 3D dijagramima (slike 15-18).



Slika 15 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na ukupne fenole (Izvor: Autor)

Na **slici 15** vidljivo je kako povišenjem temperature miješanja, kao i povećanjem postotka vode u otapalu, raste vrijednost ukupnih fenola. Vrijeme nema značajan utjecaj na povećanje ukupnih fenola.

Tablica 7 Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za antioksidacijsku aktivnost

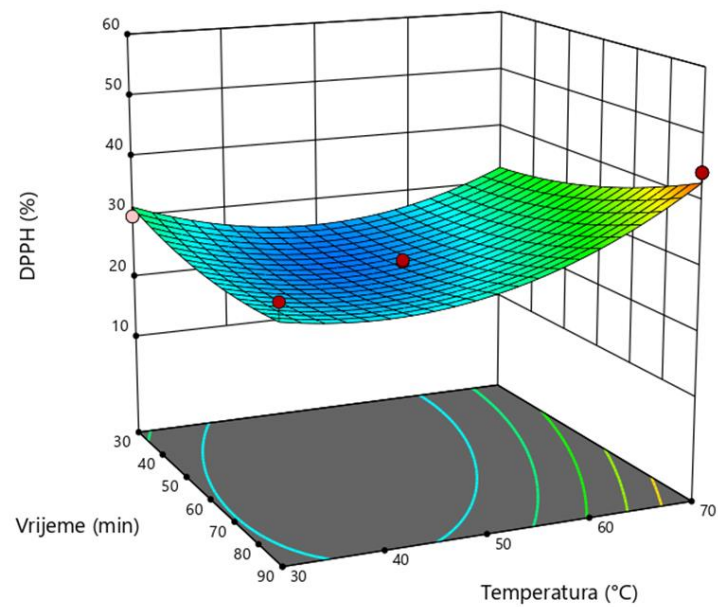
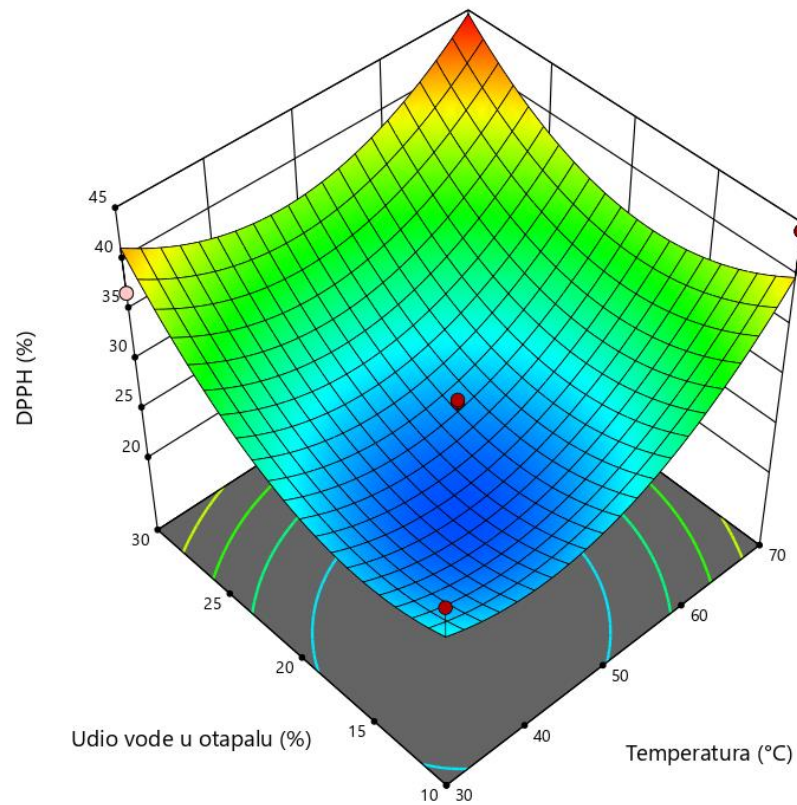
Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode Df	Varijanca MS	f-vrijednost	p-vrijednost
Model	779,01	9	86,56	3,93	0,0423
X_1 - Vrijeme	26,21	1	26,21	1,19	0,3113
X_2 - Temperatura	111,08	1	111,08	5,05	0,0595
X_3 - Udio vode u otapalu	154,09	1	154,09	7,00	0,0331
X_1X_2	40,07	1	40,07	1,82	0,2192
X_1X_3	36,24	1	36,24	1,65	0,2402
X_2X_3	16,77	1	16,77	0,7620	0,4116
X_1^2	15,18	1	15,18	0,6898	0,4336
X_2^2	176,05	1	176,05	8,00	0,0255
X_3^2	170,38	1	170,38	7,74	0,0272
OSTATAK	154,04	7	22,01		
NEDOSTATAK MODELA	148,50	3	49,50	35,69	0,0024
POGREŠKA	5,55	4	1,39		
UKUPNO	933,06	16			
R^2	0,8349				

Iz **tablice 7** možemo vidjeti da je model za DPPH značajan ($p < 0,05$). Vrijeme miješanja (X_1) i temperatura (X_2) nemaju značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ($p > 0,05$), dok udio vode u otapalu ima značajan utjecaj, kao i kvadrati vrijednosti X_2^2 i X_3^2 ($p < 0,05$). Ostali parametri nemaju značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost ($p > 0,05$).

Vrijednost R^2 za promatrane odzive iznosila je 0,8349 što nam govori da je primijenjeni regresijski model odgovarao eksperimentalno predviđenim podacima.

Model u kodiranim vrijednostima za DPPH:

$$\text{DPPH} = 25,73 + 1,81X_1 + 3,73X_2 + 4,39X_3 + 1,9X_1^2 + 6,47X_2^2 + 6,36X_3^2 + 3,16X_1X_2 + 3,01X_1X_3 - 2,05X_2X_3 \quad (7)$$



Slika 16 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na antioksidacijsku aktivnost (Izvor: Autor)

Slika 16 prikazuje 3D dijagrame, iz kojih možemo jasno vidjeti značajan utjecaj udjela vode u otapalu (%) na vrijednost DPPH (%), a donji dijagram jasno prikazuje da vrijeme miješanja (min) i temperatura (°C) nemaju statistički značajan utjecaj na DPPH (%).

Tablica 8 Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za klorogensku kiselinu

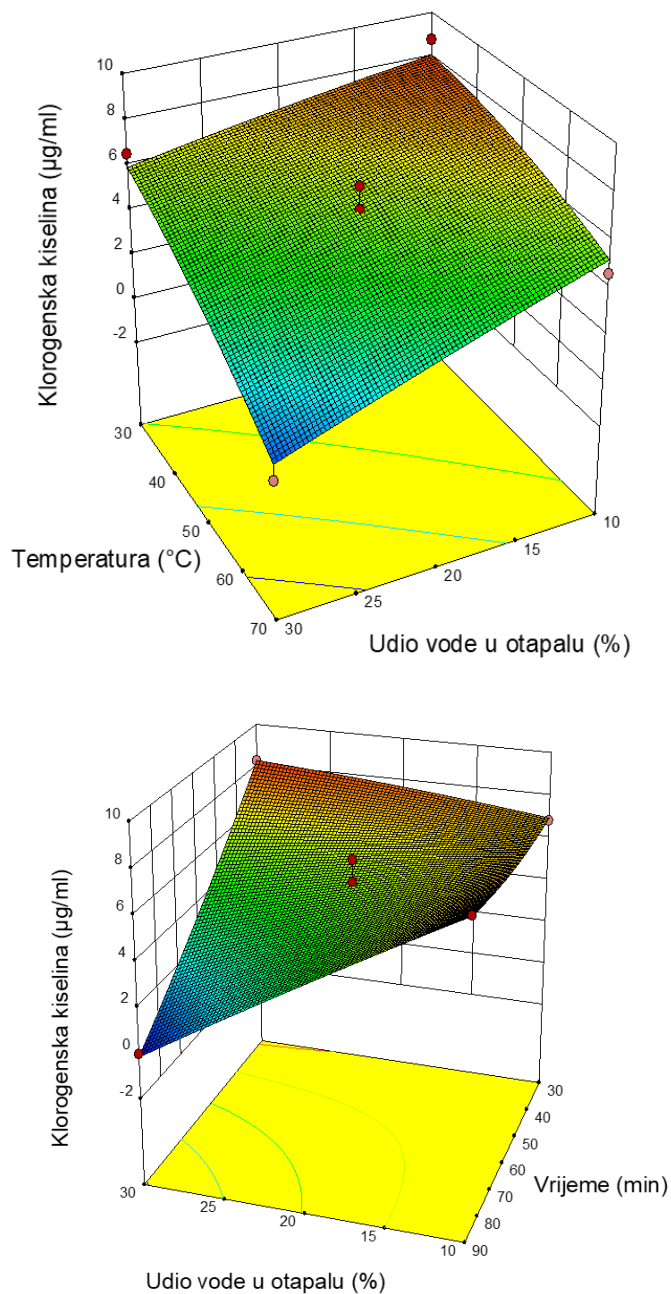
Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode df	Varijanca MS	f-vrijednost	p-vrijednost
Model	124,76	9	13,86	15,09	0,0008
X_1 - Vrijeme	28,46	1	28,46	30,97	0,0008
X_2 - Temperatura	32,76	1	32,76	35,66	0,0006
X_3 - Udio vode u otapalu	22,18	1	22,18	24,13	0,0017
X_1X_2	17,35	1	17,35	18,88	0,0034
X_1X_3	21,34	1	21,34	23,23	0,0019
X_2X_3	1,49	1	1,49	1,62	0,2438
X_1^2	0,4053	1	0,4053	0,4410	0,5279
X_2^2	0,7776	1	0,7776	0,8462	0,3882
X_3^2	0,0440	1	0,0440	0,0479	0,8330
OSTATAK	6,43	7	0,9189		
NEDOSTATAK MODELA	3,40	3	1,13	1,50	0,3439
POGREŠKA	3,03	4	0,7580		
UKUPNO	131,20	16			
R^2	0,9510				

Analizom promatranih odziva za klorogensku kiselinu, možemo primijetiti da parametri X_1 , X_2 i X_3 pojedinačno imaju značajan utjecaj na klorogensku kiselinu ($p < 0,05$), kao i kombinacija parametara X_1X_2 i X_1X_3 , dok ostali parametri nemaju statistički značaj ($p > 0,05$).

R^2 vrijednost govori da je primijenjeni regresijski model odgovarao eksperimentalno predviđenim podacima, a iznosi 0,9510.

Model u kodiranim vrijednostima, za klorogensku kiselinu:

$$\text{Klorogenska kiselina} = 5,53 - 1,89X_1 - 2,02X_2 - 1,67X_3 + 0,31X_1^2 - 0,43X_2^2 - 0,1X_3^2 - 2,08X_1X_2 - 2,31X_1X_3 - 0,61X_2X_3 \quad (8)$$



Slika 17 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na udio klorogenske kiseline (Izvor: Autor)

3D prikazi na **slici 17** pokazuju obrnutu proporcionalnost povišenja temperature i vrijednosti udjela klorogenske kiseline, odnosno povišenjem temperature smanjuje se udio klorogenske kiseline. Povećanje udjela vode u otapalu, također djeluje na smanjenje udjela klorogenske kiseline.

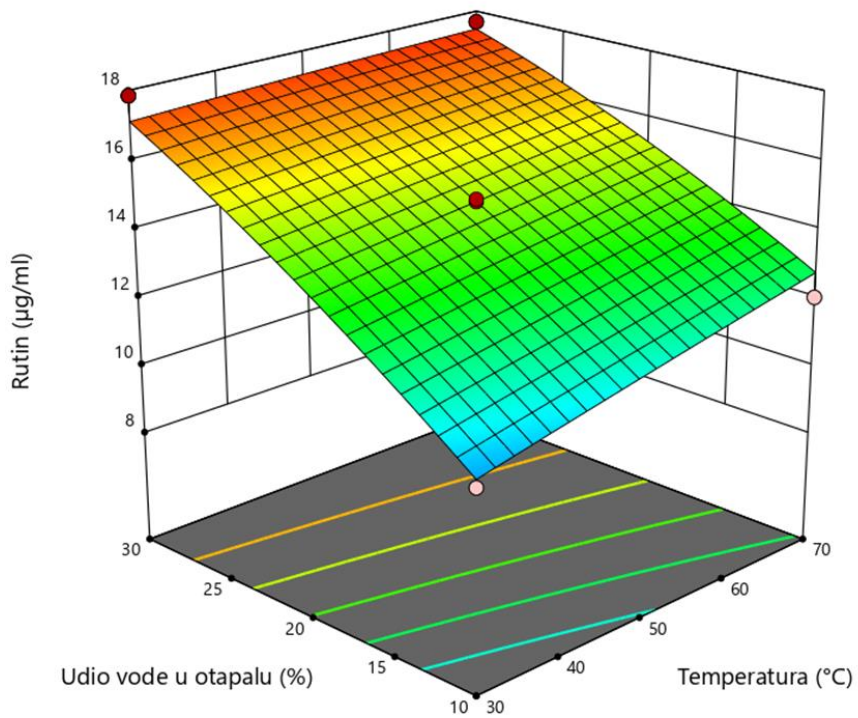
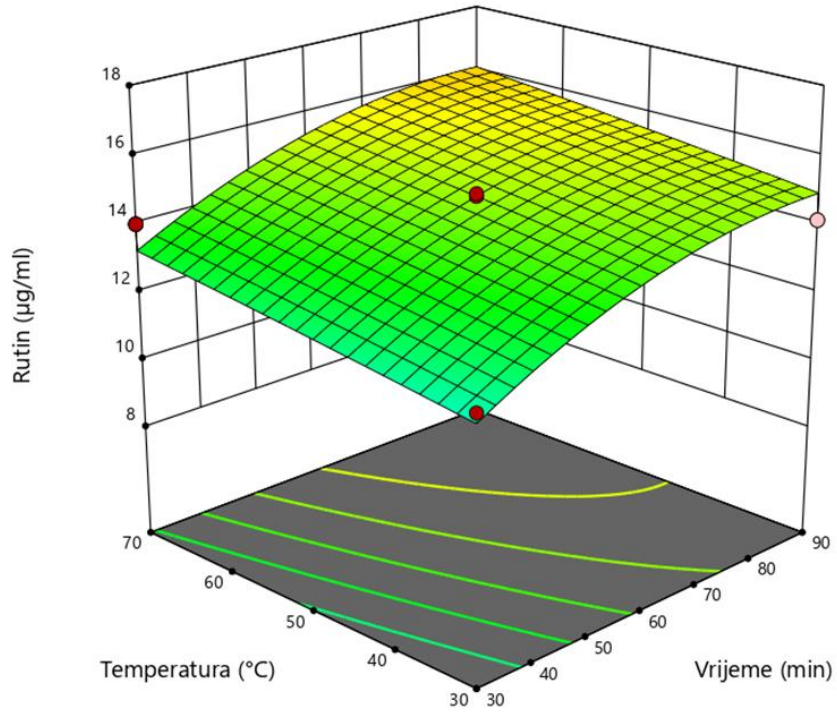
Tablica 9 Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za rutin

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode df	Varijanca MS	f-vrijednost	p-vrijednost
Model	85,88	9	9,54	14,58	0,0009
X_1 - Vrijeme	16,94	1	16,94	25,88	0,0014
X_2 - Temperatura	3,03	1	3,03	4,62	0,0686
X_3 - Udio vode u otapalu	61,94	1	61,94	94,64	< 0.0001
X_1X_2	0,0049	1	0,0049	0,0075	0,9335
X_1X_3	0,1849	1	0,1849	0,2825	0,6115
X_2X_3	0,8281	1	0,8281	1,27	0,2977
X_1^2	2,39	1	2,39	3,65	0,0978
X_2^2	0,0033	1	0,0033	0,0050	0,9454
X_3^2	0,4258	1	0,4258	0,6506	0,4464
OSTATAK	4,58	7	0,6545		
NEDOSTATAK MODELA	4,57	3	1,52	602,27	< 0.0001
POGREŠKA	0,0101	4	0,0025		
UKUPNO	90,46	16			
R²	0,9494				

Tablica 9 prikazuje statistički značaj parametara X_1 (vrijeme miješanja) i X_3 (udio vode u otapalu), na udio rutina, dobivenog ekstrakcijom, dok svi ostali parametri, odnosno njihove kombinacije, nemaju statistički značaj ($p > 0,05$).

Model u kodiranim vrijednostima, za rutin:

$$\text{Rutin} = 14,85 + 1,46X_1 + 0,62X_2 + 2,78X_3 - 0,75X_1^2 - 0,028X_2^2 - 0,32X_3^2 - 0,0035X_1X_2 - 0,21X_1X_3 - 0,46X_2X_3 \quad (9)$$



Slika 18 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na rutin (Izvor: Autor)

Slika 18 prikazuje kako povišenje udjela vode u otapalu utječe na povišenje udjela rutina, kao i povećanje vremenskog perioda zagrijavanja. Na 3D prikazima uočavamo linearnost varijabli temperature i udjela rutina, odnosno dokaz da temperatura nema statistički značajan utjecaj na udio rutina.

Konačni cilj metode odzivnih površina je optimizacija procesa. Tako razvijeni modeli, mogu se koristiti za simulaciju i optimizaciju. Optimizacija se u prehrambenom inženjerstvu koristi kao osnovni alat za unaprjeđenje različitih procesa radi dobivanja kvalitetnijeg proizvoda. Za optimiranje procesa najčešće se primjenjuje metoda temeljena na konceptu željene funkcije (*engl.* Desirability function, D). Optimiranje se provodi tako da se promatrani odzivi (y) prevode u individualne željene funkcije čije se vrijednosti kreću od 0 do 1. Vrijednost individualne željene funkcije 0 predstavlja najlošiju, dok 1 predstavlja najbolju vrijednost za promatrani odziv. Ukupna željena funkcija (D) jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija. Cilj ovog istraživanja bio je pronaći optimalne parametre ekstrakcije za vrijednosti udjela ukupnih fenola, antioksidacijske aktivnosti, udjela klorogenske kiseline i rutina. Za izračun su predloženi sljedeći uvjeti optimizacije:

- Maksimalan udio ukupnih fenola i maksimalna antioksidacijska aktivnost,
- Maksimalan udio klorogenske kiseline,
- Maksimalan udio rutina,
- Maksimalan udio ukupnih fenola i maksimalna antioksidacijska aktivnost, te maksimalan udio klorogenske kiseline i rutina.

Primjenom funkcionalne metode (*engl.* *desirability function method*) (Cojoracu i sur., 2009), optimalni uvjeti ekstrakcije pri kojima je dobivena najveća vrijednost željenih parametara prikazani su u **tablicama 10-13**. Ukupna željena funkcija, u **tablicama 10, 11 i 12** u vrijednosti 1 nam govori da dobivene vrijednosti parametara (vrijeme miješanja, temperatura, udio vode) predstavljaju najbolje moguće rješenje željene funkcije pojedinih praćenih odziva (maksimalan udio ukupnih fenola i maksimalna antioksidacijska aktivnost, maksimalan udio klorogenske kiseline, maksimalan udio rutina).

Ukupna željena funkcija u vrijednosti 0,767 i dalje predstavlja dobro rješenje za praćene odzive u **tablici 13**, ali je i logično manja od prethodnih D-vrijednosti jer jr više različitih odziva uključeno u samo optimizaciju.

Tablica 10 Kriterij: Maksimalan udio ukupnih fenola i maksimalna antioksidacijska aktivnost

Vrijeme	77,43 min
Temperatura miješanja	68,98°C
Udio vode u otapalu	29,56 %
Predviđeni udio uk.polifenola	151,37 mg GAE/L
Predviđena vrijednost DPPH	48,30 %
Ukupna željena funkcija (desirability)	1,000

Tablica 11 Kriterij: Maksimalan udio klorogenske kiseline

Vrijeme	89,76 min
Temperatura miješanja	30,29°C
Udio vode u otapalu	16,34 %
Predviđena vrijednost klorogenske kiseline	8,79 µg/ml
Ukupna željena funkcija (desirability)	1,000

Tablica 12 Kriterij: Maksimalan udio rutina

Vrijeme	82,44 min
Temperatura miješanja	69,83°C
Udio vode u otapalu	29,58 %
Predviđena vrijednost rutina	17,86 µg/ml
Ukupna željena funkcija (desirability)	1,000

Tablica 13 Kombinirano: Maksimalan udio ukupnih fenola i maksimalna antioksidacijska aktivnost, te maksimalan udio klorogenske kiseline i rutina.

Vrijeme	30 min
Temperatura miješanja	70°C
Udio vode u otapalu	29,99 %
Predviđeni udio uk.polifenola	130,177 mg GAE/L
Predviđena vrijednost DPPH	38,13 %

Predviđena vrijednost klorogenske kiseline	7,29 µg/ml
Predviđena vrijednost rutina	15,48 µg/ml
Ukupna željena funkcija (desirability)	0,767

5. ZAKLJUČCI

- Duhanski otpad se može promatrati kao vrijedna polazna sirovina za izolaciju različitih bioaktivnih komponenti;
- Provedenom metodom prema Folin-Ciocalteu, rezultati su pokazali da je najveći udio ukupnih fenola u duhanskom otpadu – refabrikatu, otopljenom u eutektiku $\text{ChCl} - \text{Etan} - 1,2$ – diolu odnosno $\text{ChCl} - \text{etilen glikolu}$. Prema tome je refabrikat bolji polazni materijal za daljnje istraživanje od druga dva duhanska otpada – duhanske prašine i rebra, a $\text{ChCl} - \text{etilen glikol}$, najbolje eutektičko otapalo od 15 korištenih;
- Zbrinjavanje duhanskog otpada predstavlja velik financijski trošak, te njegovo iskorištavanje ima višestruke pozitivne utjecaje, kako na okoliš tako i na ukupnu cijenu proizvodnje duhana;
- Komponente duhanskog otpada, kao što su polifenoli, klorogenska kiselina i rutin, su visokovrijedne komponente koje se mogu koristiti u daljnjim postupcima prerade ili izolirati kao individualne komponente;
- Ekstrakcija eutektičkim otapalima pokazala se pogodnom za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz duhanskog otpada;
- Metoda odzivnih površina pokazala se vrlo učinkovitom u modeliranju i optimiranju procesa ekstrakcije;
- Procesni parametri (temperatura miješanja, vrijeme miješanja i udio vode u otapalu) utječu na iskorištenje ekstrakcije, odnosno na udio fenola, antioksidacijsku aktivnost, udio klorogenske kiseline i rutina, u duhanskom otpadu;
- Optimalni uvjeti ekstrakcije, pri kojima bi se dobili maksimalni udjeli fenola, klorogenske kiseline i rutina, te maksimalna antioksidacijska aktivnost u ekstraktu refabrikata su: vrijeme miješanja u trajanju od 30 min, temperatura miješanja 70°C i udio vode u otapalu 29,99 %;
- Značenje predloženog istraživanja ogleda se u ekstrakciji visokovrijednih komponenti iz duhanskog otpada, odnosno njegovom maksimalnom iskorištenju, čime je proces proizvodnje duhana zaokružen i ne stvara se velika količina organskog otpada koji danas predstavlja ogromni ekološki i financijski teret, u duhanskoj industriji.

6. LITERATURA

Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V: Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures, *Chemical Communications* 7: 70. 2003.

Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK: Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society* 126: 9142, 2004.

Abdelhamid HN: Ionic liquids for mass spectrometry: matrices, separation and microextraction, *TrAC - Trends Analytical Chemistry* 77: 122–138, 2016.

Agnieszka PC, Anna O, Paweł C, Jacek D, Zbigniew C: The kinetics of nicotine degradation, enzyme activities and genotoxic potential in the characterization of tobacco waste composting. *Bioresource Technology* 100: 5037–5044, 2009.

Arias B, Pevida C, Rubiera F, Pis JJ: Effect of biomass blending on coal ignition and burnout during oxy-fuel combustion. *Fuel* 87: 2753–2759, 2008.

Aydin F, Yilmaz E, Soylak M: A simple and novel deep eutectic solvent based ultrasound-assisted emulsification liquid phase microextraction method for malachite green in farmed and ornamental aquarium fish water samples, *Microchemical Journal* 132: 280–285, 2017.

Banožić M, Šubarić D, Jokić S: Tobacco waste in Bosnia and Herzegovina—problem or high-value material? *Glasnik zaštite bilja*, 4: 24-33, 2018.

Barrena R, Vazquez F, Sanchez A: Dehydrogenase activity as a method for monitoring the composting process. *Bioresource Technology* 99: 905-908, 2008.

Benitez E, Nogales R, Elvira C, Masciandaro G, Ceccanti B: Enzyme activities as indicators of the stabilization of sewage sludge composting with *Eisenia foetida*. *Bioresource Technologies* 67: 297–303, 1999.

Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaliera LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76: 965-977, 2008.

Bi W, Tian M and Row KH: Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *Journal of Chromatography A* 1285: 22–30, 2013.

- Butorac J:** *Duhan*. Kugler d.o.o. Zagreb, 2009.
- Carley KM, Kamneva NY, Reminga J:** Response surface methodology. *U CASOS Technical Report*, Carnegie Mellon University, 2004.
- Chaturvedi S, Upreti DK, Tandon DK, Sharma A, Dixit A:** Bio-waste from tobacco industry as tailored organic fertilizer for improving yields and nutritional values of tomato crop. *Journal of Environmental Biology* 29: 759–763. 2008.
- Chemat F, Vian MA, Cravotto G:** Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 8615–8627, 2012.
- Chen HP, Li B, Yang HP, Yang GL, Zhang SH:** Experimental investigation of biomass gasification in a fluidized bed reactor. *Energy Fuels* 22: 3493–3498, 2008.
- Chen J, Liu J, Lee FSC, Wang X:** Simultaneous determination of non-volatile, semi-volatile, and volatile organic acids in tobacco by SIM–Scan mode GC–MS *Journal of Separation Science*, 31, 137, 2008.
- Chen Y, Yu QY, Li X, Luo Y, Liu H:** Extraction and HPLC Characterization of Chlorogenic Acid from Tobacco Residuals. *Separation Science and Technology*, 42: 3481–3492, 2007.
- Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IW, Witkamp GJ, Verpoorte R:** Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology* 156, 1701. 2011,
- Civilini M, Domenis C, Sebastianutto N, Bertoldi M:** Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by microorganisms. *Waste Management & Research*, 15: 349–358, 1997.
- Cojocar C, Khayet M, Zakrzewska-Trznadel G, Jaworska A:** Modeling and multi-response optimization of pervaporation of organic aqueous solutions using desirability function approach. *Journal of Hazardous Materials*, 167: 52–63, 2009.
- Cox DR, Reid N:** The theory of the design of experiments. Boca Raton, FL: *Chapman & Hall/CRC*, 2000.

Cravotto G, Boffa L, Mantegna S, Perego P, Avogadro M, Cintas P: Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasound Sonochemistry* 5: 898–902, 2008.

Cui Y, Li C, Yin J, Li S, Jia Y, Bao M: Design, synthesis and properties of acidic deep eutectic solvents based on choline chloride, *Journal of Molecular Liquids* 236: 338–343, 2017.

Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S: New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and bioproducts processing*, 109: 52-73, 2018.

Čagalj M, Gugić J, Strikić F: Povijesni pregled uzgoja duhana u Dalmaciji. *Zbornik radova: Duhan u Bosni i Hercegovini – jučer, danas i sutra*, 02-03.10.2017., Federalni agromediteranski zavod, 48-60, Mostar, 2017.

Čagalj M, Ivanković M: Temeljne značajke duhanske industrije u EU - s posebnim osvrtom na Republiku Hrvatsku. *Zbornik radova: Duhan u Bosni i Hercegovini – jučer, danas i sutra*, 02-03.10.2017., Federalni agromediteranski zavod, 153-166. Mostar, 2017.

Dai Y, Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH: Natural Deep Eutectic Solvents as new potential media for green technology, *Analytica Chimica Acta* 766: Pages 61-68, 2013.

Dai Y, Verpoorte R, Choi YH, Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chem* 159: 116-121, 2014.

Duan S, Du Y, Hou X, Yan N, Dong W, Mao X, Zhang Z: Chemical Basis of the Fungicidal Activity of Tobacco Extracts against *Valsa mali*. *Molecules* 21: 3481-3492, 2016.

Edwards IM, Jutan A: Optimization and control using response surface methods. *Computers and Chemical Engineering*, 21: 441–453, 1997.

Fathiazad F, Delazar A, Amiria R, Sarker SD: Extraction of Flavonoids and Quantification of Rutin from waste Tobacco Leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 3: 222-227, 2006.

Foo KY, Hameed BH: An overview of landfill leachate treatment via activated carbon adsorption process, *Journal of Hazardous Materials* 171: 54, 2009.

Gao T, Ci Y, Jian H, An C: FTIR investigation of the interaction of tumor cells treated with caffeic acid and chlorogenic acid. *Vibrational Spectroscopy*, 24: 225-231, 2000.

Gobbo-Neto L, Lopes NP: Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian Arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(4):1193-1204, 2008.

Goodspeed TH: The genus *Nicotiana*. *Chronica Botanica*: Waltham, Mass. 1954.

Gore S, Baskaran S, Koenig B: Efficient synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-ones in low melting tartaric acid–urea mixtures, *Green Chemistry* 13: 1009, 2011.

Grodowska K, Parczewski A: Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 67: 3–12, 2010.

Gu TN, Zhang ML, Tan T, Chen J, Li Z, Zhang QH, Qiu HD: Deep eutectic solvents as novel extraction media for phenolic compounds from model oil, *Chemical Communications* 50: 11749–11752, 2014.

Gülçin I: Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217: 213-220, 2006.

Hodgson JM, Watts GF, Playford DA, Burke V, Croft KD: Coenzyme Q10 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56: 1137-1142, 2002.

Hrgović S: Agrotehnika proizvodnje duhana. *Glasnik zaštite bilja*, 5: 27-42, 2005.

Hu RS, Wang J, Li H, Ni H, Chen YF, Zhang YW, Xiang SP, Li HH: Simultaneous extraction of nicotine and solanesol from waste tobacco materials by the column chromatographic extraction method and their separation and purification. *Separation and Purification Technology*, 146: 1–7, 2015.

Imperato G, Eibler E, Niedermaier J, König B: Low-melting sugar–urea–salt mixtures as solvents for Diels–Alder reactions, *Chemical Communications* 9: 1170, 2005.

Jianqiang S, Ray AK: Performance Improvement of Activated Sludge Wastewater Treatment by Nonlinear Natural Oscillations, *Chemical Engineering & Technology* 23, 1115, 2000.

Joglekar AM, May AT: Product excellence through design of experiments. *Cereal Foods World*, 32: 857–868, 1987.

Karačonji BI: Facts about nicotine toxicity. *Institute for Medical Research and Occupational Health*, 56: 363-371, 2005.

Keča M, Gross S, Malnar I, Kalodera Z, Malojčić R: Izolacija solanesola iz duhana (*Nicotiana tabacum* L.) klasičnom ekstrakcijom i ultrazvučnom ekstrakcijom. *Farmaceutski glasnik*, 53: 173-182, 1997.

Khezeli T, Daneshfar A: Dispersive micro-solid-phase extraction of dopamine, epinephrine and norepinephrine from biological samples based on green deep eutectic solvents and Fe₃O₄@MIL-100 (Fe) core-shell nanoparticles grafted with pyrocatechol, *RSC Adv.* 5: 65264–65273, 2015.

Khezeli T, Daneshfar A, Sahraei R: Emulsification liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent: an extraction method for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and seven polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples, *Journal of Chromatography A* 1425: 25–33, 2015.

Knezović Z: Biometrika. *Sveučilišni udžbenik*, Mostar, str. 113, 2014.

Kopčić N: Studij procesa aerobnog kompostiranja čvrstog otpada. Doktorski rad: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2011.

Kozumplik V, Boić M: Duhan. U: V. Kozumplik i I. Pejić (ured.), Oplemenjivanje poljoprivrednog bilja u Hrvatskoj. *Monografija*: 80 – 84, Zagreb, 2012.

Kudlak B, Owczarek K, Namieśnik J: Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents. A review, *Environmental Science and Pollution Research* 22: 11975–11992, 2015.

Laitinen, N., Luonsi, A., Vilen, J: International Congress on Membranes and Membrane Processes, *Desalination* 191 86, 2006.

Ledesma-Escobar CA, Priego-Capote F, Luque de Castro MD: Comparative study of the effect of sample pretreatment and extraction on the determination of flavonoids from lemon (*Citrus Limon*) *PLoS ONE* 11(1), 2016.

- Levin ED, Wilson W, Rose J, McEvoy J:** Nicotine-haloperidol interactions and cognitive performance in schizophrenics. *Neuropsychopharmacology*, 15: 429-436. (1996)
- Li Z, Huang D, Tang Z, Deng C, Zhang X:** Fast determination of chlorogenic acid in tobacco residues using microwave-assisted extraction and capillary zone electrophoresis technique, *Talanta* 82: 1181–1185, 2010.
- Li SQ, Ding YL, Wen DS, He YR:** CFD modelling of cocurrent gas-solid flow through a packed bed using kinetic theory approach. *Chemical Engineering Science* 61, 1922–1931, 2006.
- Li XG, Lv Y, Ma BG:** Thermogravimetric investigation on co-combustion characteristics of tobacco residue and high-ash bituminous coal. *Bioresource Technologies* 102: 9783–9787, 2011.
- Li XG, Ma BG, Xu L, Hu ZW, Wang XG:** Thermogravimetric analysis of the co-combustion of the blends with high ash coal and waste tyres. *Thermochimica Acta* 441: 79–83, 2006.
- Li X, Row KH:** Development of deep eutectic solvents applied in extraction and separation, *Journal of Separation Science* 39: 3505–3520, 2016.
- Li G, Tang W, Cao W, Wang Q, Zhu T:** Molecularly imprinted polymers combination with deep eutectic solvents for solid-phase extraction of caffeic acid from hawthorn, *Se Pu*. 33: 792–798, 2015.
- Li W, Zhang L, Peng J, Li N, Zhang S:** Effects of microwave irradiation on the basic properties of woodceramics made from carbonized tobacco stems impregnated with phenolic resin, *Industrial Crops and Products* 28: 143–154, 2008.
- Lipshutz BH, Lower A, Berl V, Schein K, Wetterich F:** An improved synthesis of the “miracle nutrient” coenzyme Q10. *Organic Letters*, 7: 4095–4097, 2005.
- Liu Y, Dong J, Liu G, Yang H, Liu W, Wang L, Kong C, Zheng D, Yang J, Deng L, Wang S:** Co-digestion of tobacco waste with different agricultural biomass feedstocks and the inhibition of tobacco viruses by anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 189, 210–216. 2015.
- Maggio R, Riva M, Vaglini F, Fornai F, Molteni R, Armogida M, Racagni G, Corsini GU:** Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *Journal Neurochem*, 71: 2439–2446, 1998.

Maran JP, Manikandan S, Thirugnanasambandham K, Nivetha CV, Dinesh R: Box–Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide. *Carbohydrate Polymers* 92: 604-611, 2013.

Matković T, Matković P: Fizikalna metalurgija 1, Metalurški fakultet Zagreb, Sisak, 2009.

Matthews R, Yang L, Browne S, Baik MH, Beal B: Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95: 8892-8897, 1998.

Mumba PP, Phiri R: Environmental Impact Assessment of Tobacco Waste Disposal, *International Journal of Environmental Research* 2: 225-230, 2008.

Myers RH, Montgomery DC: Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. *John Wiley & Sons*, New York, NY, 1995.

Müller T, Büttner T, Gholipour AF, Kuhn W: Coenzyme Q10 supplementation provides mild symptomatic benefit in patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*. 341: 201-204, 2003.

Newhouse P, Kellar K, Aisen P, White H, Wesnes K, Coderre E, Pfaff A, Wilkins H, Howard D, Levin ED: Nicotine treatment of mild cognitive impairment: a 6-month double-blind pilot clinical trial. *Neurology*, 78: 91–101, 2012.

Nardini M, Leonardi F, Scaccini C, Virgili F: Modulation of ceramide-induced NF-[kappa]B binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(7): 722-733, 2001.

Nie J, Yu G, Song Z, Wang X, Li Z, Shea Y, Lee M: Microwave-assisted deep eutectic solvent extraction coupled with headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS for the analysis of volatile compounds from tobacco. *Analytical methods*, 5: 856-863, 2017.

Nurkić H: Duhan u Posavini u prošlosti i sadašnjosti. *Zbornik radova: Duhan u Bosni i Hercegovini – jučer, danas i sutra, 02-03.10.2017.*, Mostar, Federalni agromediterranski zavod, 131-144, 2017.

Okunola AA, Babatunde EE, Chinwe D, Pelumi O, Ramatu SG: Mutagenicity of automobile workshop soil leachate and tobacco industry wastewater using the Ames Salmonella fluctuation and the SOS chromotests, *Toxicology and Industrial Health* 32: 1086–1096, 2016.

Ozimec R, Karoglan Kontić J, Maletić E, Matotan Z, Frane S: Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije: Duhan. Program Ujedinjenih naroda za razvoj, *Monografija*: 398-400, Zagreb, 2015.

Pejić M: Utjecaj uvjeta sušenja i ekstrakcije na sadržaj fenolnih tvari u ekstraktima ploda divlje ruže (*Rosa canina* L.). *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.

Piotrowska-Cyplik A, Olejnik A, Cyplik P, Dach J, Czarnecki Z: The kinetics of nicotine degradation enzyme activities and genotoxic potential in the characterization of tobacco waste composting. *Bioresource Technology*, 100, 5037–5044, 2009.

Pisklov VP, Kochetkova SK, Duruncha NA, Kokorina LV, Medvedeva SA, Anushyan SG, Vniitti K: The characteristics of a chemical composition of the tobacco raw materials used for manufacture of tobacco products in Russia. *Tobacco-Review International*, 2004

Popova V, Gochev V, Girova T, Iliev I, Ivanova T, Stoyanova A: Extraction Products from Tobacco – Aroma and Bioactive Compounds and Activities. *Current Bioactive Compounds*, 11, 31-37, 2015.

Qi BC, Aldrich C: Biosorption of heavy metals from aqueous solutions with tobacco dust, *Bioresource Technology* 99: 5595–5601, 2008.

Renou S, Thomas JS, Aoustin E, Pons MN: Influence of impact assessment methods in wastewater treatment LCA, *Journal of Cleaner Production* 16: 1098-1105, 2008.

Rincón J, Lucas A, García MA, García A, Alvarez A, Carnicer A: Preliminary Study on the Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Nicotine from Tobacco Wastes. *Separation Science and Technology*, 33, 411-423, 1998.

Sándor PS, Di Clemente L, Coppola G, Saenger U, Fumal A, Magis D, Seidel L, Agosti RM, Schoenen J: Efficacy of coenzyme Q10 in migraine prophylaxis: a randomized controlled trial. *Neurology*, 64, 713-715, 2005.

Shishov A, Bulatov A, Locatelli M, Carradori S, Andruch V: Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review, *Microchemical Journal* 135: 33–38, 2017.

Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, Beal MF, Haas R, Plumb S, Juncos JL, Nutt J, Shoulson I, Carter J, Kompoliti K, Perlmutter JS, Reich S, Stern M, Watts RL, Kurlan R, Molho

E, Harrison M, Lew M: Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Archives of neurology*, 59: 1541-1550, 2002.

Stepić H, Budimir A, Zdeličan J, Pleša Z, Kozumplik V: Proizvodnja i skladištenje sjemena duhana, Hrvatski duhani d.d., *Agronomski glasnik : Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, Vol. 77 No. 4-6, 2015. Virovitica, 2015

Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T: Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 449, 261-267, 2002.

Tan T, Qiao X, Wan Y, Qiu H: Deep eutectic solvent: a new kind of mobile phase modifier for hydrophilic interaction liquid chromatography, *Se Pu*. 33: 934–937, 2015.

Tang B, Park HE, Row KH: Preparation of chlorocholine chloride/urea deep eutectic solvent-modified silica and an examination of the ion exchange properties of modified silica as a Lewis adduct, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406: 4309–4313, 2014.

Toledo Hijo AAC, Maximo GJ, Costa MC, Batista EAC, Meirelles AJA: Applications of ionic liquids in the food and bioproducts industries, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 4: 5347–5369, 2016.

Valverde JL, Curbelo C, Mayo O, Molina CB: Pyrolysis kinetics of tobacco dust, *Chemical Engineering – Reddit* 78: 921-924, 2000.

Vuković M, Ćosić I, Kolačko K, Briški F: Kinetika biorazgradnje organskih tvari u procjednoj vodi iz duhanskog otpada. *Kemija u industriji*. 61, 417–425, 2012.

Wang JH, He HZ, Wang MZ, Wang S, Zhang J, Wei W, Xu HX, Lv ZM, Shen DS: Bioaugmentation of activated sludge with *Acinetobacter* sp. TW enhances nicotine degradation in a synthetic tobacco wastewater treatment system, *Bioresource Technology* 142: 445–453. 2013.

Wang J, Lu D, Zhao H, Ling X, Jiang B, Ouyang P: Application of response surface methodology optimization for the production of caffeic acid from tobacco waste. *African Journal of Biotechnology*, 8: 1416–1424, 2009.

Wang J, Lu D, Zhao H, Jiang B, Wang J, Ling X, Chai H, Ouyang P: Discrimination and classification of tobacco wastes by identification and quantification of polyphenols with LC–MS/MS. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75, 875–891, 2010.

Wang, W, Xu P, Tang H: Sustainable production of valuable compound 3-succinoyl-pyridine by genetically engineering *Pseudomonas putida* using the tobacco waste. *Scientific Reports* 5: 16411, 2015.

Wei Y, Ji M, Li R, Qin F: Organic and nitrogen removal from landfill leachate in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. *Waste Manage* 32:we 448, 2012.

Welton T: Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis, *Chemical Reviews* 99, 2071-2083, 1999.

White HK, Levin ED: Four-week nicotine skin patch treatment effects on cognitive performance in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology*, 143, 158–165, 1999.

Wiszniowski J, Robert D, Surmacz-Gorska J, Miksch K, Weber JV: Landfill leachate treatment methods: A review *Environmental Chemistry Letters* 4: 51–61, 2006.

Xu C, Yang C, Mao D: Fraction and chemical analysis of antioxidant active polysaccharide isolated from flue-cured tobacco leaves, *Pharmacognosy Magazine* 10: 66-69, 2014.

Yan N, Liu Y, Gong D, Du Y, Zhang H, Zhang Z: Solanesol: a review of its resources, derivatives, bioactivities, medicinal applications, and biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 14, 403–417, 2015.

Yang ZX, Zhang SH, Liu L, Li XP, Chen HP, Yang HP, Wang XH: Combustion behaviors of tobacco stem in a thermogravimetric analyser and a pilot-scale fluidized bed reactor. *Bioresour. Technol.* 110: 595–602, 2012.

Zhang C, Ho TD, Hantao LW, Anderson JL: Ionic liquids in analytical chemistry: fundamentals, advances, and perspectives, *Analytical Chemistry* 86: 262–285, 2014.

Zhang K, Yu BT, Chang J, Wu GY, Wang TD, Wen DS: Hydrodynamics of a fluidized bed co-combustor for tobacco waste and coal. *Bioresource Technology* 119: 339–348, 2012.

Zhang XZ, Gao HJ, Zhang LF, Liu DH and Ye XQ: Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam distillation, and identification of its chemical composition, *Industrial Crops and Products* 39: 162–169, 2012.

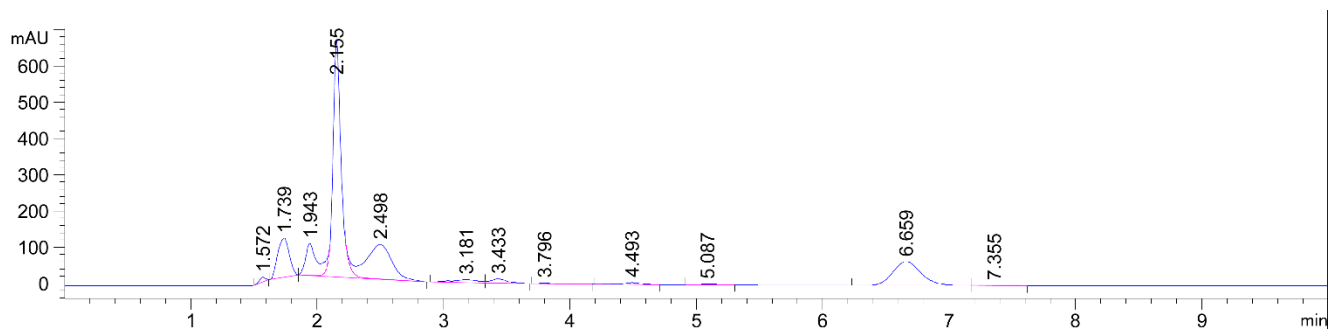
Zhong W, Zhu C, Shu M, Sun K, Zhao L, Wang C, Ye Z, Chen J: Degradation of nicotine in tobacco waste extract by newly isolated *Pseudomonas* sp. ZUTSKD. *Bioresource Technology* 101: 6935–6941, 2010.

Zielke D, Liebe R: The Removal of Stems from Cut Tobacco, *The Journal of BTFI GmbH* 17: 49-55, 1997.

Web izvori:

http://free-zg.t-com.hr/Syjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm, slika 13, pristupano 18.lipnja 2019.

7. PRILOZI



Prilog 1 Odabrani kromatogram, run 17 (uvjeti temperature 50°C, vrijeme zagrijavanja 30 min, udio vode u otapalu 30%)