

**HESPERIDIINI EKSTRAKTSIOON JA ISOLEERIMINE
MANDARIINIMAHLA PRESSIJÄÄKIDEST**

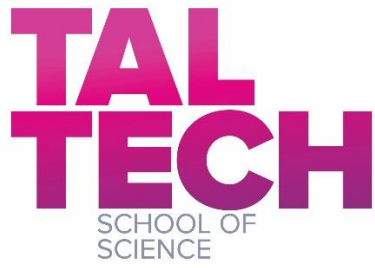
Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Annabel Taniel 206676 LAAB

Juhendaja: Maria Kuktinskaja, Keemia ja biotehnoloogia instituut, dotsent

Kaasjuhendaja: Marlen Leemet, Keemia ja biotehnoloogia instituut, magistrant

Õppekava: Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia



HESPERIDIN EXTRACTION AND ISOLATION FROM PROCESSED MANDARINS WASTE-STREAMS

Bachelor thesis

Student: Annabel Taniel 206676 LAAB

Supervisor: Maria Kuhtinskaja, Department of chemistry and biotechnology, docent

Co-supervisor: Marlen Leemet, Department of chemistry and biotechnology, MSc student

Study program: Applied Chemistry and Gene Technology

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Annabel Taniel
[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.
Juhendaja: Maria Kuhtinskaja
[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.
Kaasjuhendaja: Marlen Leemet
[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.
Kaitsmiskomisjoni esimees: Maksim Ošeka
[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Annotatsioon.....	6
Abstract	7
Kasutatud lühendid	8
Sissejuhatus.....	9
1. Kirjanduslik ülevaade	11
1.1. Hesperidiin	11
1.1.1. Hesperidiini ekstraktsiooni- ja määramismeetodid	11
1.2. Kõrgsurvevedelikkromatograafia	12
1.2.1. Pööratud faasi kromatograafia	13
1.2.2. Divoodrivi detektor	14
1.2.3. Määratavad kromatograafilised parameetrid.....	15
1.3. Metoodika osaline valideerimine.....	16
1.3.1. Korduvus ja korratavus.....	16
1.3.2. Instrumentaalne avastamis- ja määramispiir.....	17
1.3.3. Säilivus.....	17
1.3.4. Kalibratsioonikõver ja selle lineaarsus	18
1.4. Katsete planeerimine	18
1.4.1. Box-Behnken katseplaan.....	19
1.5. Kiirkolonnkromatograafia	20
2. Eksperimentaalne osa	21
2.1. Kasutatud materjalid ja töövahendid.....	21
2.1.1. Kasutatud materjalid, reaktiivid ja kemikaalid.....	21
2.1.2. Kasutatud töövahendid	21
2.2. Aparatuur	22
2.2.1. HPLC-DAD aparatuur ning metoodika tingimused ja optimeeritavad parameetrid	22
2.2.2. Kiirkolonnkromatograafia aparatuur ning metoodika tingimused, optimeeritavad parameetrid ja proovi ettevalmistus.....	22
2.3. Ultraheli ekstraktsioon	23
3. Tulemused ja arutelu.....	25

3.1.	HPLC metoodika optimeerimine	25
3.2.	Määratavad kromatograafilised parameetrid.....	26
3.3.	Osaline valideerimine.....	26
3.3.1.	Kalibratsioonigraafik ja selle lineaarsuse kontroll.....	27
3.3.2.	Korduvus ja korratavus.....	27
3.3.3.	Instrumentaalne avastamis- ja määramispiir.....	28
3.3.4.	Säilivus.....	29
3.4.	Ultraheli ekstraktsioon.....	29
3.4.1.	Hesperidiini ekstraktsiooni optimaalsed tingimused.....	29
3.5.	Kiirkolonnkromatograafia	30
	Kokkuvõte.....	32
	Tänuavaldused	33
	Kasutatud kirjandus.....	34
	Lisad.....	37
	Lisa 1 HPLC vana ja uue metoodika tingimused.....	37
	Lisa 2 HPLC metoodika optimeerimine	38
	Lisa 3 Kalibratsioonilahuste valmistamine	39
	Lisa 4 Analüütide kalibratsioonigraafikud	40
	Lisa 5 Katseplaani mudeli tulemused hesperidiini ekstraktsiooni tingimuste optimeerimiseks	41
	Lisa 6 Ultraheli ekstraktsiooni ekstrakti kromatogramm.....	42

Annotatsioon

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja töötada ekstraheerimis- ning isoleerimismetoodikaid hesperidiini eraldamiseks ja isoleerimiseks mandariinimahla pressijääkidest. Kasutusel olevaks biomaterjaliks olid poest ostetud mandariinid, millest pressiti mahl käsitsi välja.

Tööd alustati kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) varasemalt kasutusel olnud analüüsimetoodika optimeerimisega, mida rakendati hesperidiini kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks analüüsiks. Optimeeritavateks tingimusteks olid voolukiirus ja eluendi koostis. Lisaks hinnati metoodika kromatograafilisi parameetreid, nagu lahutusvõime, efektiivsus, selektiivsus, mahtuvusfaktor ja sümmeetrilisus. Samuti viidi läbi osaline valideerimine, kus metoodika eesmärgile vastavuse tõestamiseks omistati sellele proovi säilivus, korduvus ja korratavus, instrumentaalsed määramis- ja avastamispiirid (IDL ja IQL) ning kalibratsioonikõvera lineaarsus. Tulemusena kestis uue analüüsimetoodika katse 35 minuti asemel 17 minutit ning selle kromatograafilised parameetrid olid osaliselt parandatud. Samuti olid kõik valideeritud parameetrid aktsepteeritavates piirides.

Ultraheliekstraktsiooni eesmärgiks oli leida metoodika tingimused, mis võimaldaksid hesperidiini maksimaalses koguses biomassist eraldada. Ekstraktsioon viidi läbi muutes viit parameetrit, millest kaks (solventi protsentuaalne sisaldus proovis ning biomassi/solventi suhe) määrati eelnevate katsete käigus ning ülejäänud kolme (katse aeg, ultrahelivanni võimsus ja vee temperatuur) varieeriti Box-Behnken katseplaani põhjal. Katseplaani tulemusena saadi optimaalseteks katse tingimusteks 40 min, 50 °C ja 180 W. Lisaks osutus eelnevate katsete põhjal sobilikeks biomassi/solventi suhe 1:20 ning etanooli sisaldus proovis 60%.

Kiirkolonnkromatograafia eesmärgiks oli välja töötada metoodika hesperidiini isoleerimiseks ekstraktist. Põhiliseks probleemiks oli kahe ekstrakti põhiühendi, hesperidiini ja narirutini, lahutamine teineteisest. Selle saavutamiseks muudeti elueerimisrežiimi, eluendi koostist ning voolukiirust. Kõige sobivamaid tulemusi andis gradientne elueerimisrežiim, mis algas 15%-lise ja lõppes 35%-lise atsetonitrili (ACN) sisaldusega ning voolukiiruseks oli 12 ml/min. Optimeerimise tulemusena saadi fraktsioon, mis sisaldas suures osas ainult hesperidiini.

Abstract

The aim of the current bachelor's thesis was to develop extraction and isolation methods in order to extract and isolate hesperidin from mandarin waste-streams. The biomaterial used was store-bought mandarins from which juice was squeezed out by hand.

The research begun with the optimization of high-pressure liquid chromatography previously used analytical methodology, which was applied in qualitative and quantitative analysis of hesperidin. The optimized conditions were flow rate, eluent composition and experiment time. In addition, the chromatographic parameters, such as resolution, efficiency, selectivity, capacity factor and symmetry of the methodology were evaluated. Also, a partial validation was performed, in which sample stability, accuracy and precision, instrumental limit of detection and quantification (IDL and IQL) and calibration curve linearity were attributed to the methodology in order to prove its fitness of purpose. As a result, the new analytical methods experiment lasted for 17 minutes instead of 35 minutes, and its chromatographic parameters were partially improved. In addition, all validated parameters were within acceptable limits.

Ultrasound-assisted extraction aim was to find the conditions of the methodology that would allow the maximum amount of hesperidin to be separated from the biomass. The extraction was carried out by changing the five parameters, two of which (the percentage of solvent in the sample and biomass/solvent ratio) were determined during preliminary experiments, and the other three (experiment time, ultrasonic bath power and water temperature) were varied based on the Box-Behnken design. According to the design, the optimal extraction conditions were 40 min, 50 °C and 180 W. Additionally, based on preliminary experiments, biomass/solvent ratio of 1:20 and ethanol content in the sample, which was 60%, proved to be suitable.

The aim of FLASH chromatography was to develop a methodology for the isolation of hesperidin from the extract. The main problem was the separation of two extracts main compounds, hesperidin and narirutin. To achieve this, elution methods, eluent composition and flow rate were changed. A gradient elution starting from 15% and ending at 35% ACN with a flow rate of 12 mL/min gave the most suitable results. As an outcome of optimization, a fraction, that for the most part contained only hesperidin, was obtained.

Kasutatud lühendid

Tähis	Inglise keeles	Eesti keeles
ACN	<i>Acetonitrile</i>	Atsetonitril
COST	<i>Change one single variable at a time</i>	Korraga ühe muutuja muutmine
CV	<i>Column volume</i>	Kolonne maht
DAD	<i>Diode array detector</i>	Diodrivi detektor
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>	Dimetüülsulfoksiid
DOE	<i>Design of Experiment</i>	Katseplaan
EtOH	<i>Ethanol</i>	Etanool
gDW	<i>Gram per dryweight</i>	Grammi kuivmassi kohta
HPLC	<i>High-pressure liquid chromatography</i>	Kõrgsurvevedelikkromatograafia
IDL	<i>Instrument detection limit</i>	Instrumendi avastamiskiir
IQL	<i>Instrument quantification limit</i>	Instrumendi määramiskiir
MeOH	<i>Methanol</i>	Metanool
MQ	<i>MilliQ water</i>	MilliQ vesi
pm	<i>Revolutions per minute</i>	Pööret minutis
RI	<i>Refractive index</i>	Refraktsiooniindeks
RP	<i>Reverse phase</i>	Pöördfaas
RSM	<i>Response surface methodology</i>	Vastavuspinna meetodika
SH		Standardhälve
SSH		Suhteline standardhälve
UV-Vis	<i>Ultraviolet-Visible</i>	Ultraviolet-nähtav

Sissejuhatus

Antud töö on osa mandariinimahla pressijääkide väärimise tehnoloogiate väljaarendamise projektist, mille peamiseks eesmärgiks on leevendada Gruusia mandariinimahla tööstuste poolt tekitatavat keskkondlikku jalajälge, tuginedes ringmajanduslikele põhimõtetele. Projekt viidi täide koostöös Gruusia Põllumajandusülikooli, Tallinna Tehnikaülikooli ja ettevõtte GIAM grupi esindaja vahel ning tegevus oli finantseeritud Keskkonna Investeeringute Keskuse (KIK) poolt.

Gruusias toimub mandariinide koristus novembrist detsembrini², 2021.aastal koguti viljapuuadadest kokku 57 200 tonni mandariini³, millest 22 800 tonni eksporditi riigist välja⁴ ning märkimisväärne osa allesjäänust töödeldi tööstuses kontsentreeritud mahlaks¹. Tootmisprotsessis tekkiva biomassi jäätmete hulk on suur, arvestades, et pea poole toormest moodustavad pressijäägid, millele edasist lisandväärtust ei anta, vaid kogutakse kokku prügilatesse, mis võib kujutada endast ohtu keskkonnale, ökosüsteemile ning tuua majanduslikku kahju.

Ebasobilik biomassi jääkide käitlemine võib viia negatiivsete keskkonna mõjudeni, suurendades bioloogilise ja keemilise hapniku tarvet, mis omakorda koos mandariinis esinevate biolagunevate orgaaniliste ühenditega kutsuvad esile ebavajalikku fermentatsiooni ning ökoloogilist reostust. Vilja kõrge niiskusesisalduse tõttu ilmneb mikroobne lagunemine⁵. Ära visatud jäägid võtavad enda alla üha rohkem maad, omades saastavat mõju pinnasele ja põhjaveele, häirides ökosüsteemi tasakaalu ning avaldades tõsist terviseohtu inimeste ja veekogude elanikkonnale^{6,7}. Ebasoodne efekt ilmneb kasvuhoone gaaside, nagu CO₂ ja CH₄, emissiooni kasvu näol⁷. Pressijääkide läbimõtlemtu raikamine toob tähelepanuväärseid majanduslikke kaotusi, kuna mandariini biomass sisaldab endas hulgaliselt mitmete omadustega ühendeid, nagu eeterlikke õlisid, pektiini, suhkruid, vitamiine ja flavonoide, mida oleks võimalik rakendada erinevates toidu ning mittetoidulistes kasutuslades, näiteks meditsiini valdkonnas, toidu- ja joogi-, kosmeetika-, parfümeeria- ja kodukemikaalitööstustes, pakkudes võimalust luua suuremat kasumit toorme kohta ning tekitada vähem jäätmeid^{5,6,8,9}.

Ringmajandusel baseeruva väärimise eesmärgiks on leida võimalikult palju rakendusi toormaterjali maksimaalseks kasutamiseks, tekitades seejuures minimaalses koguses jääke ja kadusid. Ringmajandus kujutab endast süsteemi, mis tegeleb olemasolevate materjalide ja toodete tarbimise ning tootmisega läbi taaskasutuse, ümbertöötuse, uuendamise ning parandamise, kuniks see pole enam võimalik¹⁰. Vastupidiselt kirjeldab lineaarne süsteem protsessi, kus toormest luuakse toode, mis kaotab kasutuse peale oma elua lõppu. Seda tüüpi majandus põhineb ressursside intensiivsel tarbimisel, tekitades samal ajal suuri kahjusid keskkonnale¹¹. Seega teostades pressijääkide väärimist ringmajanduslikel põhimõtetel, saab täiel määral kasutada mandariini biomassis olevaid ühendeid, mida on võimalik sellest eraldada ning seejärel luua nendest erinevate tehnoloogiate abil teadaolevaid või uudseid saadusi, tekitades jääke olematutes või väikestes kogustes.

Käesolev töö jaotub kolme peatükki: kirjanduslik ülevaade, eksperimentaalne osa ning tulemused ja arutelu. Esimeses peatükis antakse ülevaade hesperidiinist ja selle analüüsimeetoditest, kahest põhiliselt töös kasutusel olnud instrumendist, kõrgsurvedelik- ja kiirkolonnkromatograafiast, HPLC

kromatograafilistest parameetritest ja metoodika valideerimisest ning Box-Behnken katseplaanist. Eksperimentaalse osa peatükis tuuakse välja kõik töös kasutusel olnud materjalid, kemikaalid, reagentid ja töövahendid ning antakse detailsem ülevaade peamiste aparatuuride kohta, kirjeldatakse proovide ettevalmistust ja katsete läbiviimist. Tulemuste ja arutelu peatükis kirjeldatakse kiirkolonnkromatograafia ning HPLC metoodikate optimeerimist, kromatograafiliste parameetrite määramist ja valideerimiskatsete läbiviimist ning nende tulemusi ja esitatakse ekstraktsiooni optimaalsed tingimused.

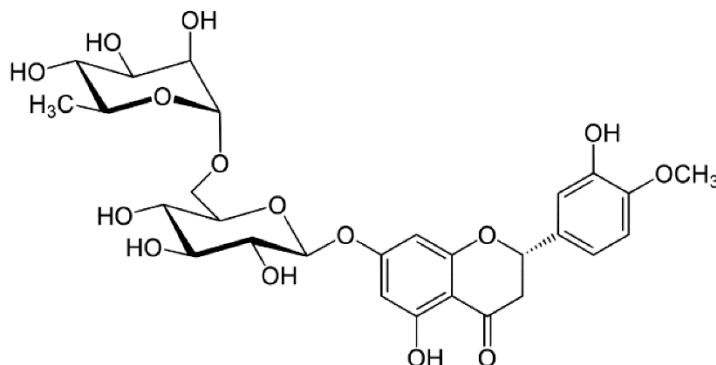
Antud töö põhieesmärgiks oli välja töötada hesperidiini ekstraktsiooni ja isoleerimise metoodikaid. Selle saavutamiseks püstitati järgmiseid alameesmärke:

- Optimeerida HPLC metoodika hesperidiini kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks analüüsiks.
- Välja töötada ja optimeerida ekstraktsiooni metoodika hesperidiini eraldamiseks mandariini pressijääkidest.
- Töötada välja ning optimeerida kiirkolonnkromatograafia metoodika hesperidiini isoleerimiseks ekstraktist.

1. Kirjanduslik ülevaade

1.1. Hesperidiin

Hesperidiin kui bioflavonoidne ühend, mis kuulub flavonoidide alamklassi flavonoonide hulka¹³, koosneb aglükoonist, hesperetiinist, ning selle külge seotud disahhariidist, rutinoosist¹². Ühend esineb suurel hulgal enamasti tsitruseviljades, mahlas on selle sisaldus väiksem, kui vilja flaveedos, koore välimises värvilises kihis, ning albeedos, keskmise kihi valges ja pehmes osas¹³.



Joonis 1. Hesperidiini molekulstruktuur¹³.

Hesperidiin on vesikeskkonnas madala lahustuvusega ning pH tundlik ühend, omades kõrgemat lahustuvust aluselises keskkonnas, mida seletavad ühendi pKa väärtused 10, fenoolsetel hüdrosüülrühmadel, ning 11,5, alkoholsetel hüdrosüülrühmadel¹². Hesperidiini degradeerimist mõjutab keskkonna pH, happelises keskkonnas sadeneb kergelt, kõrgendatud temperatuurid ning kokkupuude elektromagnetkiirguse või õhuga¹³.

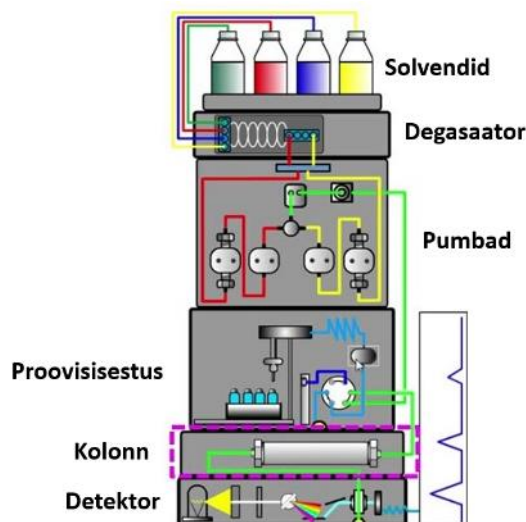
Hesperidiinile on omistatud mitemed kasulikke omadusi, nagu antioksidatiivsus, antibakteriaalsus, antimikroobsus ja põletikuvastatus. Tänu erinevatele omadustele saab hesperidiini kasutada mitmetes valdkondades, näiteks meditsiinis, toidu- ja kosmeetikatööstustes^{12,14}.

1.1.1. Hesperidiini ekstraktsiooni- ja määramismeetodid

Hesperidiini põhilisteks analüüsimeetoditeks on vedelikkromatograafia erinevad liitsüsteemid, lisaks on kasutusel elektrokeemilised, kapillaarelektroforeesi ja spektrofotomeetrilised meetodid. Bioflavonoidse ühendi eraldamiseks biomassist on võimalik rakendada mitmeid ekstraktsioonimeetodeid, peamiselt rakendatakse ultraheli-, mikrolaine-, solvendi- ning superkriitilise fluidumi ekstraktsiooni^{13,14}. Kohati kasutatakse ka mittekaasaegseid meetodeid, näiteks Soxhlet ekstraktsiooni ja matsereerimist¹³. Hesperidiini isoleerimisel kasutatakse tihti sadestamis-¹⁵ ja kristalliseerimismeetodeid¹⁶, kuid puhastatakse ka kiirkolonnkromatograafia teel¹⁷.

1.2. Kõrgsurvevedelikkromatograafia

Kõrgsurvevedelikkromatograafia on lahutusprotsess, mis suudab efektiivselt lahutada mitmekomponentseid segusid¹⁹. HPLC süsteemi põhilisteks osadeks on solventide reservuaarid, kõrgsurvepump, proovisisestus seade, lahutuskolonn, detektor ning arvuti andmekogumis- ja töötlus tarkvaraga (Joonis 2). Protsess algab proovi sisestusega ning seejärel pumbatakse eluent läbi proovisisesti kolonni koos uuritava prooviseguga. Kolonnis toimub proovi komponentide jaotumine kahe faasi, statsionaarse ja mobiilse, vahel. Kolonn koosneb nii öelda “taldrikust” ning igas taldrikus interakteerub osa analüüdist liikumatu faasiga ning ülejäänud liigub edasi järgmisse taldrikusse, samal ajal katkevad järk-järgult varasemad interaktsioonid liikumatu faasiga ning analüüdid liiguvad mobiilse faasiga kolonni lõpu poole. Kolonnis liikudes moodustab iga analüüt kitsa aine tsooni, mida detektor tuvastab, andes tulemuseks kromatogrammi arvutis^{19,20}.



Joonis 2. HPLC seadme ehitus²⁵.

HPLC-s kasutusel olevad pumbad peavad olema vastupidavad, tekitades väga kõrgeid, tavaliselt kuni 600 bar, rõhkusid. Samuti on tähtis nende lihtne opereeritavus, kiire ettevalmistusprotsess ning kerge ja vähem kulukas hooldus ning remont¹⁹. Pumba ülesandeks on imeda solventid segamiskambris, kust edasi pumbatakse kokkusegatud ja survestatud eluent kolonni^{19,20}.

Elueerimisel on võimalik rakendada isokraatset, kus mobiilse faasi koostis on kogu katse vältel ühesugune, või gradient elueerimist, mille puhul eluendi koostis muutub aja jooksul, alustades nõrgast ja lõpetades tugeva liikuva faasiga^{20,24}. Isokraatset elueerimist kasutatakse vähe, kuna see on piiratud vaid lihtsate segude või homologide eraldamisega. Samuti võib huvipakkuvate ühendite välja elueerimine võtta väga kaua aega²⁰. Seevastu gradientelueerimisel on võimalik lahutada komplekssemaid proovisegusid ja seda lühema analüüsiajaga, kuid tähelepanu tuleb pöörata faaside tasakaalustamisele, mille vajadus isokraatses elueerimises tavaliselt puudub^{20,24}.

Proovisestina on kasutusel mitmeid konfiguratsioone, milles enim levinud on aas-klapp sisesti. Aas-klapp sisesti põhineb kahel režiimil, esimesel laetakse proov aasa, üleliigne proovi hulk läheb jääkidesse, ning samal ajal pumbast tulev eluent liigub aasa läbimata otse kolonni. Teises režiimis läbib ka eluent aasa, liikudes nüüd koos prooviga kolonni^{20,24}. Automaatse proovivõtmisüsteemi korral on proovisestisüsteemiga seotud instrumendi poolt automaatselt opereeritav proovivõtu süstal, mida peale igat proovisestist pestakse²⁴.

Olenevalt kasutatavast lahutusmeetodist esineb mitmeid erinevaid kromatograafia liike, nagu normaal- ja pöördfaasi, ionvahetus-, eksklusioon- ning afiinsuskromatograafia^{18,19,22,24}. Normaal- ja pöördfaasi puhul põhineb lahutusmehhanism analüüdi polaarsusel (või hüdrofoobsusel). Normaalfaasis on statsionaarne faas polaarsem ja mobiilne faas mittepolaarsem, seega mittepolaarsemad ühendid elueeruvad esimesena ja polaarsed viimasena. Pöördfaasi puhul on statsionaarne faas mittepolaarsem ja mobiilne faas polaarsem, seega polaarsemad ühendid elueeruvad esimesena ja mittepolaarsed viimasena^{19,20}.

Detektori ülesandeks on tuvastada kolonnist elueeruv komponent, jälgides väljuva mobiilse faasi füüsikalise-keemiliste omaduste muutust, mis konverteeritakse elektriliseks signaaliks ning seejärel muundatakse signaaliks kromatogrammiks¹⁹. Peamisteks HPLC süsteemides kasutusel olevateks detektoriteks on ultraviolet-nähtav (UV-VIS), fluorestsents (FLU), murdumisnäitaja (RI), elektrokeemiline (EC) ja juhtivusdetektorid või nende modifikatsioonid^{18,19,20,21,22,23,24}.

1.2.1. Pööratud faasi kromatograafia

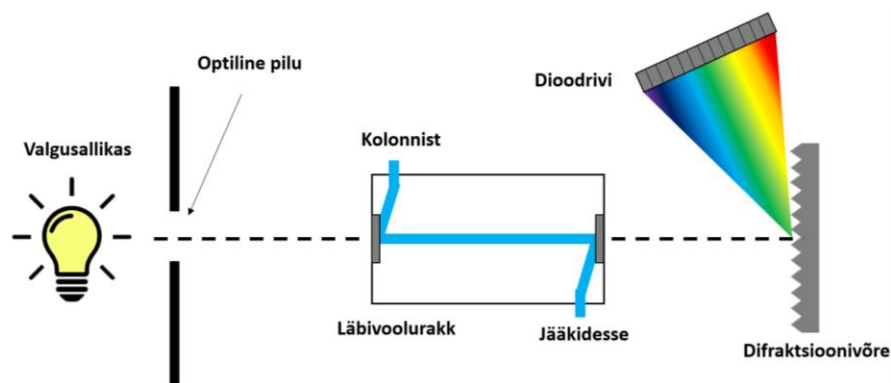
Pöördfaasi (RP) kromatograafias on mobiilne faas polaarsem ning statsionaarne faas mittepolaarsem^{19,20,24}. Sõltuvalt proovis sisalduvate analüütide interaktsioonist mobiilse või statsionaarse faasiga, elueeruvad ühendid erinevate retentsiooniaegadega²⁰. Väga polaarsed ühendid interakteeruvad tugevamalt polaarse liikuva faasiga, jäädes vähem kinni statsionaarsesse faasi ning lahkudes esimesena kolonnist. Vähempolaarsed ühendid eelistavad aga mittepolaarset statsionaarset faasi ja interakteeruvad sellega tugevamini, väljudes kolonnist hiljem. Tänu liikumatu ja liikuva faasi vahelise kiire tasakaalu saavutamise võimekusele saab RP kromatograafias kasutada gradientelueerimist^{18,20,24}. Katse algab "nõrga" ehk rohkem polaarse liikuva faasiga, millega mittepolaarsete ühendite interaktsioonid on nõrgad, ning muutub järk-järgult mittepolaarsemaks ehk "tugevamaks" mobiilseks faasiks, kus analüüdi retentsioon statsionaarse faasiga nõrgeneb ja katkeb, elueerudes kolonnist välja²⁴. Mobiilses faasis on enamasti kaks solventi, solvent A, mis on tavaliselt polaarsem, ning solvent B, mis on mittepolaarsem. Solvent A on tavaliselt vesi või vett sisaldav puhver ning solvent B on orgaaniline veega segunev solvent, nagu atsetonitriil või metanool (MeOH)^{19,24}. Tihtipeale on kasutusel olev solvent B vähem tuleohtlik ja toksiline ning sobivam detekteerimiseks lainepikkustel, mis jäävad alla 230 nm. Solvent B valikul pööratakse tähelepanu ka selle viskoossusele, stabiilsusele antud katsetingimustes, läbipaistvusele madalaima UV detektoriga tuvastataval lainepikkusel ning hinnale ja kättesaadavusele²⁴. Happeid või aluseid sisaldavate proovide korral

kasutatakse puhvreid, mis aitavad hoida mobiilse faasi pH-d ning seeläbi vältida analüütide ioniseerumist^{20,24}.

1.2.2. Diiodrivi detektor

Diiodrivi detektorites (DAD), mis kuuluvad enamasti HPLC süsteemi, kasutatakse 512- või 1024 diodi, mis võimaldavad detekteerida kõiki lainepikkusi 190-800 nm vahemikus, juhul kui rakendatakse nii deuterium kui ka volfram lampe²⁷. Detektorit saab kasutada mitmekomponentsete proovide analüüsimisel ning lisaks kromatogrammile on võimalik saada iga komponendi neeldumisspekter^{19,26}. DAD-ga saab määrata ka piigi puhtust, viies läbi detektsioon samaaegselt kahel lainepikkusel, arvutades saadud tulemuste põhjal neeldumissuhte. Kogu piigi ulatuses konstantse neeldumissuhte korral on tegemist puhta piigiga, välja arvatud juhul, kui lisandil on identse kujuga piik. DAD puhul esinevat baasjoone triivi ja müra on võimalik vähendada kahe lainepikkuse lahutamisel, millest võrdluslainepikkus valitakse piirkonnast, kus huvipakkuvad ühendid ei neeldu¹⁹.

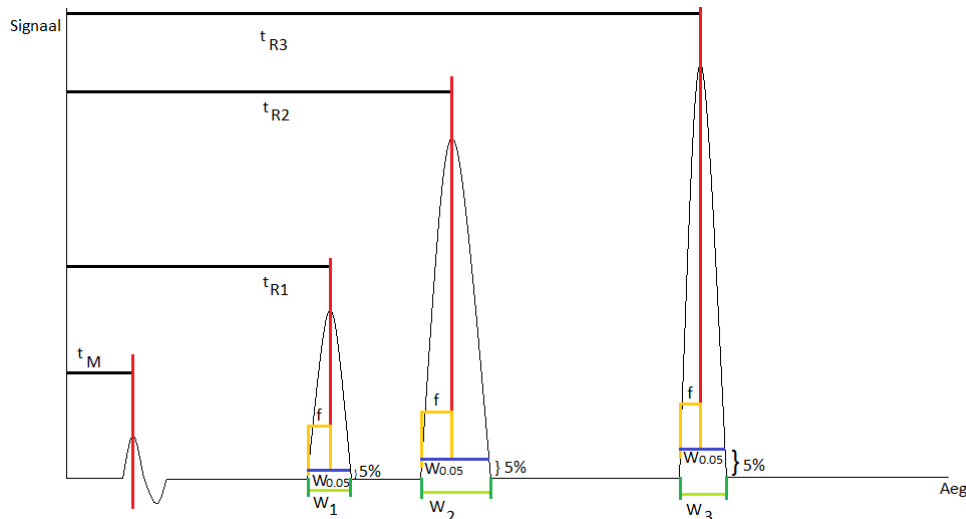
DAD ülesehitus koosneb valgusallikast, deuterium- ja/või volframlambist, optilisest pilust, läbivoolurakust, difraktsioonivõrest ja 512 või 1024 diodiga diiodrivist (Joonis 3). Valgusallika elektromagnetkiirgus suunatakse läbi läbivooluraku, kuhu siseneb proov kolonnist²⁷. Järgmisena tabab elektromagnetkiirgus difraktsioonivõre, kus polükromaatiline elektromagnetkiirgus hajutatakse selles esinevate osade lainepikkusteks, läbi iga lainepikkuse peegeldumisel erineva nurga alt²⁸. Viimaks jõuavad kiired diiodrivile, kus olenevalt detektori lainepikkuse vahemikust ja diiodrivi suurusest kogutakse iga diodi poolt andmeid tavaliselt 0,5-1 nm vahemikus. Sõltuvalt eesmärgist annab detektor informatsiooni neeldumise kohta kas ühel lainepikkusel, lainepikkuste vahemikus või kogu spektri kohta²⁷.



Joonis 3. HPLC detektsiooni skeem diiodrividetektoriga (kohandatud)²⁷.

1.2.3. Määratavad kromatograafilised parameetrid

Hindamaks kromatograafilise meetodika lahutusvõimet, määratakse mitmeid parameetreid. Antud töös hinnati HPLC-DAD optimeeritud meetodikat selektiivsuse, lahutuvuse, efektiivsuse, sümmeetrilisuse ja mahtuvusfaktori leidmisel.



Joonis 4. Illustreeriv kromatogramm määratavate kromatograafiliste parameetrite kirjeldamiseks.

Selektiivsus (α) hindab millisel määral suudab statsionaarne faas keemiliselt eristada väga sarnaseid ühendeid. Kui selle väärtus on 1, siis piigid elueeruvad koos, seega aktsepteeritav tulemus on suurem ühest. Selektiivsust määrati Valem.1 põhjal^{29,30}.

$$\alpha = \frac{(t_{R2} - t_M)}{(t_{R1} - t_M)} \quad [1]$$

$t_{R1, 2, 3}$ – huvipakkuva piigi retentsiooni aeg

t_M – surnud aeg

Lahutusvus (R) kirjeldab kolonni võimet huvipakkuvate analüütide piike lahutada ning mida antud töös arvutati Valem.2 abil^{29,30}. Head piikide lahutusvust väljendab väärtust 1,5 ületav tulemus³¹.

$$R = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{\frac{(W_1 + W_2)}{2}} \quad [2]$$

$W_{1, 2, 3}$ – huvipakkuva piigi laius

Efektiivsust (N) on ainetsooni hajumise mõõt ning seda väljendatakse teoreetiliste taldrükute arvuna. Mida suurem see väärtus on, seda efektiivsem on lahutusprotsess ja kitsamad on piigid. Antud töös kasutati efektiivsuse määramiseks valemit 3^{29,30}.

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad [3]$$

Kromatograafilise piigi kuju iseloomustamise parameeter (T) väljendab piigi asümmeetriat ees või taga. Mida lähemal on tulemus ühele, seda sümmeetrilisem on piik ja väiksem on asümmeetria nähtus^{29,30}. Sümmeetrilisust saab määrata Valem.4 põhjal, mille oodatav väärtus peab jääma vahemikku 0,8-1,2³¹.

$$T = \frac{W_{0.05}}{(2 \times f)} \quad [4]$$

$W_{0.05}$ – piigi laius poole piigi 5%-lise kõrguse juures ja

f – on kaugus piigi esiosast piigi tipust tõmmatud piiki poolitava jooneni piigi 5%-lise kõrguse juures

Mahtuvusfaktor (k') määrab analüüdi interaktsiooni tugevust statsionaarse faasiga ning oodatav tulemus langeb vahemikku 1-10³¹. Väärtus arvutati valemiga 5^{29,30}.

$$k' = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad [5]$$

1.3. Metoodika osaline valideerimine

Valideerimise kaudu kinnitatakse metoodika vastavust eesmärgile, läbi erinevate parameetrite omistamise. Olenevalt metoodikast tuleb viia läbi kas täielik või osaline valideerimine, uue metoodika väljatöötamisel täielik ning näiteks vana metoodika optimeerimisel osaline. Antud töös valideeritakse kordustäpsust, proovi säilivust, instrumentaalseid avastamis- ja määramispiire ning ehitatakse kalibratsioonikõver, mille lineaarsust kontrollitakse³².

1.3.1. Korduvus ja korratavus

Kordustäpsuse katsed peavad hõlmama kogu analüütilist protsessi, alustades proovi ettevalmistusest kuni tulemuste analüüsimiseni, ning proovid peavad olema üksteisest sõltumatud³⁴. Proovid tuleks valmistada vähemalt neljal erineval kontsentratsiooni tasemel, mis langevad kalibratsiooni tööala vahemikku. Erandina ei pea osalise valideerimise puhul tasemeid olema nii palju³².

Korduvus kujutab endast lühikeses ajavahemikus ning samades tingimustes läbiviidud mõõteseeria tulemuste hajuvust, mida väljendab kvantitatiivselt standardhälve s_r (Valem.6)³⁴. Katsete arv korduvuse mõõteseerias peab olema igal kontsentratsiooni tasemel vähemalt 5³².

Korratavuse puhul viiakse mõõteseeriade katsed läbi pikema aja jooksul erinevates tingimustes (uus emalahus, uued standardlahused, teine analüütik) ning seda iseloomustab samuti standardhälve s_{rw} (Valem.6)³⁴. Mitme kontsentratsiooni tasemel tuleb viia läbi vähemalt kolm mõõteseeriat minimaalselt kahe päeva jooksul.

Madalaima kontsentratsiooni taseme juures ei tohi suhtelise standardhälbe (Valem.7) väärtus ületada 20% ja teistel tasemeltel 15%. Lisaks, kõikide mõõteseeriade katsete tulemustest peab vähemalt 2/3 ja igal kontsentratsiooni tasemel üle 50% väärtustest jääma 15% piirist alla poole³².

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad [6]$$

s – korduvuse/korratavuse standardhälve

x_i – i -nda mõõtmise väärtus

\bar{x} – mõõtetulemuste aritmeetiline keskmine

n – mõõtmiste arv

$$ss\% = \frac{s \times 100\%}{\bar{x}} \quad [7]$$

ss% - korduvuse/korratavuse suhteline standardhälve

1.3.2. Instrumentaalne avastamis- ja määramispiir

Instrumentaalsete avastamis- ja määramispiiride määramiseks on erinevaid hindamisviise, nagu visuaalne hinnang, null-proovi korduvmõõtmiste standardhälve või signaal/müra suhe, millest viimase järgi käesolevas töös instrumentaalseid avastamis- ja määramispiire hinnati. Antud meetodi puhul võib müra taset hinnata null-proovi signaali standardhälbe kaudu ning vajalike mõõtmiste arv jääb vahemikku 6-15.

Instrumentaalne avastamispiir (IDL) kirjeldab analüüdi vähimat kontsentratsiooni, mida on võimalik antud analüüsiseadmega usaldusväärselt tuvastada. Arvutamiseks kasutati valemit 8.

Instrumentaalne määramispiir (IQL) on proovis analüüdi väikseim sisaldus, mida antud analüüsiseade suudab usaldusväärselt kvantitatiivselt määrata. Arvutamiseks kasutati valemit 9³⁴.

$$IDL = 3 + \frac{S}{N} \quad [8]$$

$$IQL = 10 + \frac{S}{N} \quad [9]$$

1.3.3. Säilivus

Säilivuse määramise eesmärgiks on näidata, et kasutusel olevad proovi säilitustingimused ei oma mõju analüüdi sisaldusele proovis. Põhilised säilivust mõjutavad tingimused on säilitusaeg, temperatuur ning

kokkupuude valguse ehk elektromagnetkiirgusega, mis peavad kajastama tingimusi, milles reaalseid proove säilitatakse.

Säilivuskatseid võib viia läbi mitmel kontsentratsiooni tasemel, olenevalt valideerimise ulatusest, tihti kasutatakse kalibratsiooni tööala madalaima ja kõrgeima kontsentratsiooniga proove ning ebasobivate tulemuste saamisel kogu tööala kontsentratsioonide tasemetel katvaid proove³².

1.3.4. Kalibratsiooniköver ja selle lineaarsus

Kalibratsiooniköver kujutab endast seost analüüdile omistatud nominaalse kontsentratsiooni ja intrumendi signaali vahel, mis omistatakse igale analüüdile eraldi. Kövera leidmiseks tuleb esmalt valida sobiv tööala ehk kontsentratsioonide vahemik, kuhu reaalsed mõõdetavad proovid jäävad, vältides ekstrapoleerimise kaudu tulemuste leidmist. Valitud tööala vahemikku peab mahtuma võimalikult ühtlase sammuga vähemalt kuus erineva kontsentratsiooniga kalibreerimisstandardit. Kõik tühi- ehk nullproovid peavad sisaldama sisestandardit ning nende maatriks peab võimaluse korral sarnanema reaalsega. Kalibratsioon viiakse läbi vaid värskelt valminud kalibreerimisstandarditega³².

Kövera lineaarsuse kontrollimiseks on võimalik läbi viia jääkliikmete või variatsiooni analüüsi, samuti saab lineaarsust hinnata tõusu ja vabaliikme standardhälbe, mudeli lähenduse, determinatsiooni koefitsendi R^2 ning jääkliikmete standardhälve põhjal. Jääkliikmete analüüsi puhul jälgitakse jääkliikmete jaotust, mille juhuslikkus viitab kövera lineaarsusele³³.

1.4. Katsete planeerimine

Traditsiooniliselt on olnud näiteks analüütilise protsessi optimaalsete parameetrite (optimumi) leidmise katsetel kasutusel korraga ühe muutuja muutmise (COST) lähenemisviis, mille puhul muudetakse korraga vaid ühte faktorit kuni punktini, kus tulemused jäävad püsima. COST näol on tegu ebaefektiivse lähenemisviisiga, mille rakendamisel kaotab eksperimendite läbiviija palju olulist informatsiooni, eriti faktorite omavahelise koostoime mõjude, kuid ka tõelise optimumi kohta. Samuti suurenevad kulutused optimumi leidmiseks, kuna läbi viiakse ebavajalikul hulgal katseid. Võttes kasutusele eksperimendi katseplaan (DOE), on võimalik lahendada mitmeid probleeme väiksema katsete arvuga, tavaliselt 10-20 katsega, muutes korraga mitut faktorit. Eksperimendi läbiviija ülesandeks on määratleda muudetavad parameetrid, nende ulatused ja oodatavad väljundid, seejärel viiakse läbi katseplaani poolt koostatud katsed. DOE tulemusena saadakse optimaalsed tingimused ja selguvad tulemusele suurimat mõju avaldavad faktorid, mille põhjal on kerge otsustada edasine katseplaan. DOE-d kasutatakse paljudes valdkondades, nagu keemia-, farmaatsia-, toidu-, terase- ja värvitööstustes, ning selle abil on võimalik lahendada erinevaid probleeme, alates toote parendamisest või väljatöötamisest kuni tootmisprotseduuri optimeerimise või väljatöötamiseni³⁵.

Vastavuspinna meetod (RSM), mis on üks mitmest DOE lähenemisviisist, põhineb erinevatel matemaatilistel ja statistilistel võtetel ning seda kasutatakse probleemide korral, kus väljundit mõjutavad mitmed faktorid, leidmaks seost tulemi(te) ja muudetavate parameetrite vahel. Esmalt luuakse mudel, mis kehtib väiksemas piirkonnas ning sellega saab vastavuspinna sobitamise kaudu otsida optimaalseid tingimusi. Juhul kui valitud alas optimaalset punkti ei leidu, liigutakse pinnalaotusel edasi piirkonnani, kus see eksisteerib, ning seejärel kohandatakse sellele vastav mudel, mida analüüsitakse sobiliku katseplaani abil ja määratakse optimumi asukoht pinnal. RSM-i põhilisteks katseplaanideks on tsentreeritud kompositsiooni, Box-Behnkeni ning ruut piirkonna disainid³⁶.

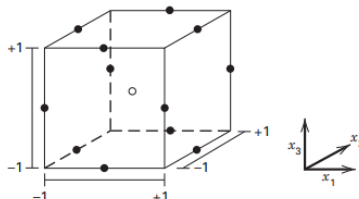
1.4.1. Box-Behnken katseplaan

Box-Behnken katseplaani puhul on tegemist teist järku disainiga, mis moodustatakse kombineerides faktorite jaoks koostatud mittetäieliku plokkide kujundus $2k$ faktoriaalse kujundusega, mille faktorite tasemed on kodeeritud $+1$ ja -1 ^{36,38}. Eksperimentide arv (E) leitakse valemiga $E = 2 * k * (k - 1) + C_0$, kus k on muudetavate parameetrite arv ja C_0 on keskpunktide arv. Katseplaani koostamisel fikseeritakse ühe teguri tase kesktasandil ning samal ajal kombineeritakse teiste tegurite kõiki tasemeid, seejärel fikseeritakse järgmine, kuni kõik tegurid on fikseeritud olnud (Joonis 5)³⁹. Hindamiseks mudeli parameetreid, tuleb lisaks kompositsiooni poolt genereeritud punktidele lisada katseplaani keskpunktid³⁷.

A	B	C	A	B	C	A	B	C
x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3
-1	-1	0	-1	0	-1	0	-1	-1
-1	1	0	-1	0	1	0	-1	1
1	-1	0	1	0	-1	0	1	-1
1	1	0	1	0	1	0	1	1

Joonis 5. Katseplaani punktide koostamise mudel³⁷.

Box-Behnken katseplaan omab sfäärilist kujundust, kus ükski katsepunkt ei asetse muudetavate minimaalsete ja maksimaalsete piiride poolt moodustunud kuubipiirkonna tippudes^{36,37} (Joonis 6).



Joonis 6. Katseplaani punktide ruumiline jaotus³⁶.

1.5. Kiirkolonnkromatograafia

Traditsiooniline kolonnkromatograafia kujutab endast pakitud, enamasti silikageeliga, klaaskoloni, milles osakeste vaheline vaba ruum täidetakse solvendiga ning seejärel asetatakse täitematerjali kohale puhastatav proov. Eluent, mida tuleb pidevalt juurde lisada, läbib koloni raskusjõu toimel ning proovi komponendid liiguvad läbi koloni eri kiirustel, mille lahutunud fraktsioone kogub katse läbiviija¹⁷. Kiirkolonnkromatograafias kasutatakse positiivset õhurõhku ning suuremaid voolukiirusi solvendi läbi surumiseks pöörd- või normaalfaasi kolonnist, mis väljendub puhastatud ühendi kättesaamisega lühema aja jooksul^{40,42}. Kiirkolonnkromatograafias on kolonnid pakitud tunduvalt väiksemate osakestega, kui tavapärasel kolonnkromatograafias, kuna surve rakendamisel on võimalik eluent läbi voolutada ka pisemate osakeste korral. Olenevalt kasutatavast rõhust jaotatakse automatiseeritud kiirkolonnkromatograafia süsteemid kaheks, madal- ja kesksurve vedelikkromatograafiateks^{17,42}. Automatiseeritud süsteemides on põhikomponentideks gradientpump, proovi süstimise port, kolonn ja mingisugune detekteerimissüsteem (tavaliselt UV või RI detektor) ning fraktsioonikoguja^{17,41}. Süsteemides kasutusel oleva tarkvara abil on võimalik katse jooksul reguleerida, millist fraktsiooni soovitakse koguda ning millist mitte¹⁷. Automatiseeritud kiirkolonnkromatograafia võimaldab kasutada erisuurusega lahutuskolonne, mille abil saab huvipakkuvaid ühendeid eraldada mg kogustest kuni g või sellest suuremate, tööstuslike kogusteni^{17,40,41}. Põhiliselt on kiirkolonnkromatograafia olnud kasutusel orgaanilises keemias, sünteetud ühendite puhastamiseks, kuid üha enam kasutatakse neid farmaatsiatööstuses, ravimi avastamisel ja puhastamisel, looduslike ühendite puhastamisel, näiteks bioaktiivsed ühendid ja flavonoidid, ning süsivesikute ja lipiidide isoleerimisel ning puhastamisel^{40,41,42}.

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Kasutatud materjalid ja töövahendid

2.1.1. Kasutatud materjalid, reaktiivid ja kemikaalid

Töös kasutatavateks kemikaalideks olid:

MilliQ (MQ) vesi, valmistatud laborisiseselt Milli-Q süsteemiga (Millipore, Ameerika Ühendriigid).

Metanool ($\geq 99,9\%$, Honeywell, Prantsusmaa).

Etanool (EtOH) ($\geq 96,6\%$, Estonian Spirit, Eesti).

Atsetonitril ($\geq 99,8\%$, Fisher Scientific, Ameerika Ühendriigid).

Dimetüülsulfoksiid ($\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Ameerika Ühendriigid).

Kasutusel olevaks materjaliks oli:

Mandariinid (sort Satsuma, Rimi, Hispaania).

Reaktiivideks antud töös olid:

Hesperidiin (93,7%, ChromaDex, Inc, Ameerika Ühendriigid)

Narirutiin (PhytoLab, Saksamaa)

Sisestandard - Bikalutamiid (99,9%, LGC, Saksamaa)

2.1.2. Kasutatud töövahendid

Töös kasutati proovide ettevalmistamiseks 20, 200, 1000, 5000 ja 10000 μl mahtudega kalibreeritud Transferpette S[®] (BrandTech[®] Scientific, inc, Ameerika Ühendriigid) automaatpipette, ekstraktsiooni proovide puhul süstalfiltreid (Sartorius, Minisart[®] RC 4, 0,45 μm , Ameerika Ühendriigid), mensuure (25-1000 ml) ning tuube 50 ja 14 ml, katsuteid 1,5 ja 2 ml, autosampleri viaale 1,5 ml ja süstlaid 1 ml mahuga.

2.2. Aparatuur

Ekstraktsiooniproovide ettevalmistusel kasutati materjali niiskusesisalduse määramiseks niiskusemõõtjat (Ohaus, MB90, Ameerika Ühendriigid) ning homogeniseerimiseks blenderit (Nutribullet, Magic Bullet, Ameerika Ühendriigid) ja biomassi segamiseks solvendis vortex (VWR, VV3, Läti) seadet. Ekstraktsiooni katsed viidi läbi kasutades (VWR, USC 1200 THD 142-0096, Ameerika Ühendriigid) instrumendi ning katse järel ekstrakti eraldamiseks tsentrifuuge (SPW Industrial, Beckman Coulter J6-HC, Ameerika Ühendriigid) koos 1 l, (Eppendorf, 5804 R, Saksamaa) 50 ml mahuliste tuubidega ja/või (Biosan, Microspin 12, Läti) 2 ml mahuga katsutitega.

Kolonnkromatograafia proovilahuse valmistamisel kasutati ekstrakti kokkuaurutamiseks vaakumpöördaurustit (Heidolphin, Laborota 4000 efficient, Saksamaa), mis oli varustatud 1000 ml ümarkolviga.

2.2.1. HPLC-DAD aparatuur ning meetoodika tingimused ja optimeeritavad parameetrid

Käesolevas töös oli põhiliseks kasutusel olevaks kõrgsurvevedelikkromatograafia aparatuuriks Agilent Technology-lt (Ameerika Ühendriigid) soetatud Agilent 1260 Infinity II süsteem, mida kasutati analüütide kvantifitseerimise eesmärgil. HPLC süsteem oli varustatud degasaatori, kvaternaarse pumba, automaatproovivõtja, lahutuskoloni, reguleeritava termostaadi ning diodrividetektoriga. Kasutusel oli Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 kolonn, mille pikkuseks oli 150 mm ja sisediameetriks 4,6 mm ning täitematerjali osakeste diameetriks 2,7 µm. Huvipakkuvate ühendite detekteerimisel oli kasutusel Agilent Technology 1024 diodiga varustatud 1260 DAD WR diodrividetektor.

Meetoodika modifitseerimiseks ja tulemuste andmetöötluseks kasutati OpenLab CDS ChemStation tarkvara ning instrumendi kaugjuhtimiseks AnyDesk programmi. Kõikide katsete kromatogramme analüüsiti manuaalselt töö autori poolt.

HPLC-DAD meetoodika optimeeritavateks parameetriteks olid eluendi koostis, voolukiirus ning paralleelselt katse aeg. Katsed viidi läbi toatemperatuuril ning sisestava proovi mahuks oli 5 µl. Lahutatud ainetsoonide detekteerimise lainepikkuseks oli 283 nm.

2.2.2. Kiirkolonnkromatograafia aparatuur ning meetoodika tingimused, optimeeritavad parameetrid ja proovi ettevalmistus

Käesolevas töös oli kasutusel Biotage Isolera kiirkolonnkromatograafia aparatuur, mis oli soetatud Biotage-lt (Rootsi). Instrument oli varustatud pumba, koloni, detektori ja fraktsioneerimissüsteemiga. Kasutusel olevaks kolonniks oli Biotage® Sfär C18 D Duo 100 Å 30 µm sorbendi massiga 12 g. Lahutusprotsessi seireks oli UV detektor.

Metoodika väljatöötamisel katsetati nii isokraatset kui ka gradientset elueerimist ning optimeeriti voolukiirust, vahemikus 12-35 ml/min, ja eluendi koostist, ACN sisaldus vahemikus 10-80%. Sisestatava proovi ruumalaks oli 1 ml, mida süstalaga manuaalselt sisestati. Detekteeritavateks lainepikkusteks olid 210 ja 283 nm, millest esimene oli kogutavaks ja teine seire lainepikkuseks.

Optimeerimisel kasutati lahust, kus hesperidiini sisaldus oli suurem narirutiini omast, selleks valmistati lahus ekstraktsiooni ekstraktist. Ekstrakti valmistamise protsessi erinevus seisnes eelneva destilatsiooni protsessi vahelejätamisega ning ekstraktsiooni proovi koguses, milleks oli 200 g jagu biomassi fooliumiga kaetud 2 l keeduklaasis, mis pandi otse ultrahelivanni. Saadud proovid tsentrifugeeriti mõlemal korral kahes ühe liitris plastikanumas 7 minutit, 4000 pööret minutis (pm) ning tsentrifugaadid filtreeriti paberfiltriga. Paarisajast milliliitrist ekstraktist aurutati välja etanool ja osa vett ning tekkinud ekstrakt lahustati osaliselt üles 20 milliliitris dimetüülsulfoksiidis (DMSO-s) ja sisestati kiirkolonnkromatograafiasse.

2.3. Ultraheli ekstraktsioon

Ekstraktsiooni etapi eesmärgiks oli leida optimaalsed tingimused suurima hesperidiini sisalduse eraldamiseks mandariini biomassist. Määratavate tingimuste sekka kuulusid viis erinevat parameetrit, millest kolm olid hesperidiini ekstraheerimiseks kasutatava ultrahelivanni võimsus ja vee temperatuur ning ekstraktsiooni aeg, mida muudeti vastavalt vastavuspinna meetodikale põhineva Box-Behnken katseplaanile. Teisteks tingimusteks olid etanooli kontsentratsioon, mis pandi paika eelkatsetega, ning biomassi ja solvendi suhe proovis, mille määramisel põhineti biomassi niiskusesisaldusest (vähemalt 1:20 (gDW:v)).

Katseplaani tabel koostati JMP[®] programmi põhjal, kus kõiki faktoreid varieeriti kolmel erineval tasemel, konstantse sammu vahega (Tabel 1). Kirjanduses^{43,44,45,46} kõrgemaid bioflavonoidide sisaldusi andvate katsetingimuste põhjal valiti temperatuuri ja katseaja vahemikud ning võimsuse vahemik pandi paika vastavalt ultrahelivanni maksimaalsele võimsusele. Vastuse väärtuseks (*response value*) valiti analüüdi ja sisestandardi piigi pindalade suhe.

Tabel 1. Katseplaani mudel hesperidiini ekstraktsiooni tingimuste optimeerimiseks.

Katse nr.	Varjatud muutujad			Dekodeeritud muutujad		
	X1	X2	X3	Temperatuur (°C)	Aeg (min)	Võimsus (Watt)
1	0	+1	+1	40	40	180
2	-1	-1	0	30	20	140
3	-1	0	+1	30	30	180
4	0	0	0	40	30	140
5	-1	0	-1	30	30	120
6	+1	+1	0	50	40	140
7	+1	0	-1	50	30	120
8	0	-1	+1	40	20	180

9	0	+1	-1	40	40	120
10	+1	0	+1	50	30	180
11	-1	+1	0	30	40	140
12	+1	-1	0	50	20	140
13	0	-1	-1	40	20	120
14	0	0	0	40	30	140
15	0	0	0	40	30	140

Katsetes kasutatud biomassi genereerimise protsess algas 6 tunnise hüdrodestilatsioon läbiviimisega Marlen Leemeti poolt. Saadud biomass peenestati Nutribulletiga homogeeneks seguks ning mõõdeti selle niiskusesisaldus. Tuubi kaaluti tehnilisel kaalul ühe grammi kuiva biomassi kohta vastav kogus märga biomassi (Valem.10) ning lisati eelnevatel katsetel selgunud solvendi sisalduse saavutamiseks vajaliku mahu etanooli (Valem.11) ja MQ vett (Valem.12). Nendes katsetes arvestati biomassis sisalduva vee hulka ning järgiti solvendi ja biomassi suhet.

$$m_{m\ddot{a}rg} = \frac{1 \text{ g} \times 100\%}{(100\% - \text{Niiskusesisaldus}\%)} \quad [10]$$

$$V_{EtOH} = \frac{20 \text{ ml} \times 60\%}{96,6\%} \quad [11]$$

$$V_{MQ} = 20 \text{ ml} - V_{EtOH} - \frac{m_{m\ddot{a}rg} \times 60\%}{96,6\%} \quad [12]$$

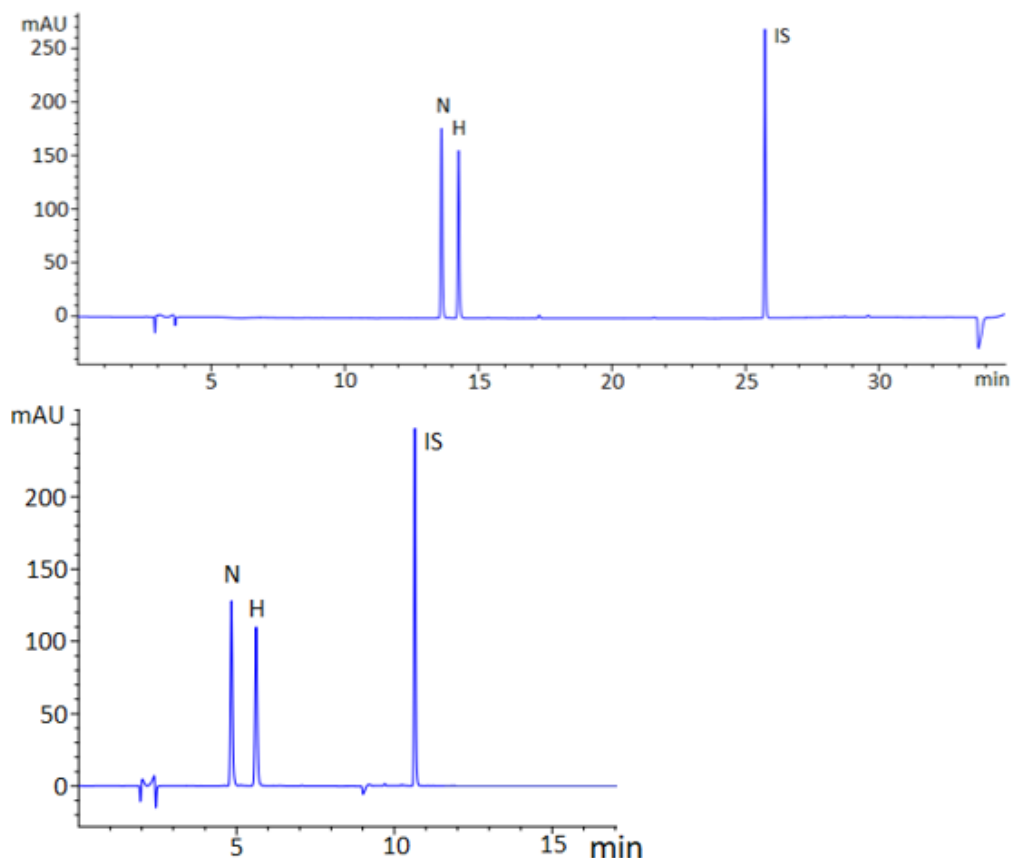
Peale proovide ettevalmistamist olid proovi tuubid asetatud ultrahelivanni, kuhu oli asetatud kaks destilleeritud veega täidetud eri suurusega keeduklaasi nii, et väiksem oli suurema sees, kuid väiksema keeduklaasi vee nivoo ei ületanud suurema keeduklaasi vee nivood. Proovid pandi väiksemasse keeduklaasi, milles vee nivoo oli kõrgemal kui tuubides oleva segu nivoo. Katsed viidi läbi katseplaani tabeli järgi (Tabel 1). Ekstraktsiooni läbiviimisel hoiti ultrahelivanni temperatuuri ± 2 °C jää pideval lisamisel. Katsete järel tsentrifugeeriti proove 5 minutit 4500 pm, määrati tsentrifugaadi maht ning sellest võeti 1 ml lahust ja filtreeriti süstalfiltriga. Ekstraktist tehti 5-kordne lahjendus, lisati sisestandard, analüüsiti HPLC-ga ning määrati hesperidiini kogus proovis.

3. Tulemused ja arutelu

3.1. HPLC metoodika optimeerimine

Analüüsimetoodika optimeerimise peamiseks eesmärgiks oli lühendada katseaega, säilitades analüüdi usaldusväärse kvantifitseerimise võimekus. Muudetavateks parameetriteks olid eluendi koostis ning voolukiirus. Optimeerimise katsetes kasutati hesperidiini ja narirutiini standardlahust kontsentratsiooniga 50 µg/ml. Narirutiini analüüsi samuti kõikides proovides, kuna tegemist on ühe põhi komponendiga ekstraktis, mis elueerub hesperidiiniga sarnaselt.

Alguses uuriti välja, kasutades olemasolevat analüüsimetoodikat, millise eluendi koostise juures ning millal elueeruvad narirutiini ja hesperidiini piigid. Seejärel suurendati gradiendi alguses atsetonitrili osakaalu eluendis 5%-lt 20%-le, mis ühtlasi lühendas katse aega 5 minuti võrra (Lisa 2, I Modifikatsioon). Järgnevalt alandati gradiendi tõusu, lühendades sellega katseaega (Lisa 2, II-IV Modifikatsioon). Viimaks suurendati voolukiirust, mis lõpuks rakendati kogu gradiendi ulatuses (Lisa 2, V-VIII Modifikatsioon). Optimeeritud metoodikaga saadud kromatogramm on välja toodud joonisel 7.



Joonis 7 Vana (üleval) ja uue (all) lahutusmetoodikate abil saadud kromatogrammid. N – narirutiin, H – hesperidiin, IS – sisestandard.

3.2. Määratavad kromatograafilised parameetrid

Optimeeritud analüüsimetoodika iseloomustamiseks määrati tähtsaimad kromatograafilised parameetrid, nagu sümmeetrilisus, lahutuvus, mahtuvusfaktor, efektiivsus ja selektiivsus. Nende omistamiseks analüüsiti standardlahust, mis sisaldas nii narirutiini kui ka hesperidiini kontsentratsiooniga 50 µg/ml. Saadud kromatogrammilt võeti narirutiini ja hesperidiini retentsiooniajad ja piigi laiused ning kromatogrammi t_M väärtused (Joonis 7).

Tabel 2. Kromatograafilised parameetrid.

	Narirutiin	Hesperidiin
Piigi laius, W (min)	0,220	0,240
Retentsiooni aeg, t_R (min)	4,846	5,622
Sümmeetria, T	0,897	0,909
Efektiivsus, N	7764	8780
Mahtuvusfaktor, k'	1,4	1,8
t_M (min)		2,0
Selektiivsus, α		1,3
Lahutuvus, R		3,4

Joonisel 7 ja tabelis 2 välja toodud tulemuste põhjal on näha, et optimeeritud meetodika puhul on analüüsi aeg palju lühem, narirutiini ja hesperidiini mahtuvusfaktorid on vastavalt 1,4 ja 1,9. Aine piigid on suhteliselt sümmeetrilised, aga esineb mittemärkimisväärset "sabatamise" efekti. Teoreetiliste taldrikute arv, ehk efektiivsus oli üle 7000, mis näitab minimaalset ainetsooni hajumist. Nii selektiivsuse kui ka lahutuvuse väärtuste puhul on optimeeritud meetodika tulemused ootuspärasemad. Seega kokkuvõtvalt võib antud meetodika hinnata kromatograafiliste parameetrite põhjal heaks lahutusmeetodikaks narirutiini ja hesperidiini määramiseks.

3.3. Osaline valideerimine

Valideerimise kaudu kinnitatakse meetodika eesmärgile vastavust ehk sobivus analüütilise ülesande täitmiseks. Osalise valideerimise parameetritest määratakse antud töös analüütidele korduvust ja korratavust, instrumentaalseid avastamis- ja määramispiire ning proovi säilivust.

Tulemuste kvantitatiivse analüüsi eesmärgil ehitati kalibratsioonikõver ning hinnati selle kõvera lineaarsust regressioonianalüüsil MS Excel-i tööriista abil.

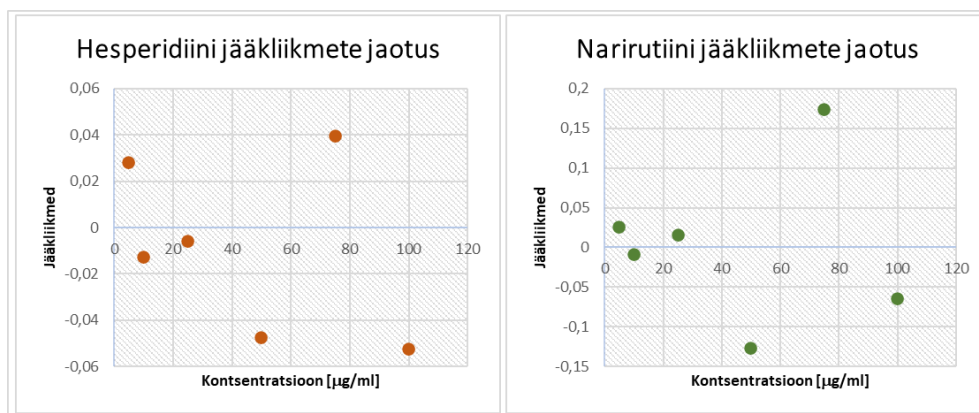
Valideerimis- ja kalibratsioonilahuste valmistamiseks kasutati narirutiini ja hesperidiini emalahuseid, mille jaoks kaaluti analüütilisel kaalul standardaine pruuni 1,5 ml-sesse klaasviaali ning aine lahustati metanooli lisamisega. Narirutiini emalahus oli kontsentratsiooniga 1,93 ja hesperidiini emalahus kontsentratsiooniga 0,68 mg/ml.

3.3.1. Kalibratsioonigraafik ja selle lineaarsuse kontroll

Kõige pealt ehitati kalibratsioonigraafik, mille tööala vahemikuks valiti 5-100 µg/ml, Kalibratsiooni punkte oli kokku kuus, kontsentratsioonidel 5, 10, 25, 50, 75 ja 100 µg/ml. Kalibratsiooni standardlahused tehti valmis vastavalt tabelile (Lisa 3). Pärast standardlahuste analüüsimist moodustati kalibratsioonigraafikud – analüüdi ja sisestandardi pindalade suhe vs. kontsentratsioon.

Narirutiinil saadi kalibratsioonisirge võrrandiks $y = 0,0187x - 0,0551$ ning selle R^2 väärtuseks 0,9798, mis väljendab, et 97,98% sõltuvate muutujate variatsioonist on kirjeldatav antud kalibratsioonisirge võrrandiga. Hesperidiini kalibratsioonisirge võrrandiks oli $y = 0,017x - 0,05$ ja R^2 väärtuseks 0,9964 (Lisa 4).

Kalibratsiooni graafiku koostamise järel kontrolliti selle tööala lineaarsust, uurides jääkliikmete juhuslikku jaotumist. Joonisel 8 on näha jääkliikmete jaotus, nii hesperidiini kui ka narirutiini puhul on see juhuslik, mis kinnitab analüütide kalibreerimiskõverate lineaarsust.



Joonis 8 Hesperidiini ja narirutiini kalibratsiooni graafikute jääkliikmete jaotus.

3.3.2. Korduvus ja korratavus

Kordustäpsus väljendati SSH kaudu ja arvutati analüüdi piikide retensiooniaegade, pindalade ning analüüdi/sisestandardi piigi pindalade suhete jaoks nii narirutiini kui ka hesperidiini puhul. Korduvuse ja korratavuse tulemustes peaks jääma madalaima kontsentratsiooni kordustäpsuse suhteliseks standardhälbeks (SSH%) $\pm 20\%$ ning kõrgematel kontsentratsioonidel $\pm 15\%$, mis vastavalt tabelitele 3 ja 4 paika peavad³². Samuti peab korratavuse standardhälve olema suurem korduvuse omast³⁴.

Päevasise korduvuse leidmiseks valmistati kalibratsiooni tööala madalaima, keskmise ja kõrgeima kontsentratsiooniga narirutiini ja hesperidiini lahused, vastavalt 5, 50 ja 100 µg/ml, järgides tabelis esitatud koguseid (Lisa 3). Igat standardlahust mõõdeti 10 korda järjest ühe päeva jooksul.

Päevadevahelist korratavust määrati samadel kontsentratsiooni tasemetel. Lahused valmistati kolmel erineval päeval ning esimese proovina võeti arvesse korduvuse tulemused ning kaks järgnevat proovi valmistati ja analüüsi kahel päeval, igat proovi kolm korda järjest. Madalaima kontsentratsiooniga standardlahuse puhul oli proove kokku neli. Kõik lahused olid valmistatud ja analüüsitud töö autori poolt.

Vastavalt tabelitele 3 ja 4 jäävad analüütide retensioonaja korduvus kõikidel kontsentratsiooni tasemetel alla 1% ja korratavus alla 2,2%. Piikide pindalade korratavus madalaima kontsentratsiooni puhul oli oodatult suurem (10,9 ja 4,7%), aga siiski ei ületa kriitilist väärtust. Lisaks tehti selgeks, et korduvuse ja korratavuse hindamine arvestades analüüdi ja sisestandardi piigi pindalade suhet, parandab kordustäpsust. Kõige madalama kontsentratsiooni tasemel analüüsi korratavus narirutiini puhul vähenes 4,7%-lt 4,05%-ni ning hesperidiinil 10,9%-lt 9,6%-ni.

Tabel 3. Päevasisene korduvus.

Analüüdid	5 µg/ml			50 µg/ml			100 µg/ml		
	A Pindala, SSH%	A/IS Pindala SSH%	t _R , SSH%	A Pindala, SSH%	A/IS Pindala SSH%	t _R , SSH%	A Pindala, SSH%	A/IS Pindala SSH%	t _R , SSH%
Narirutiin	3,20	2,83	0,15	0,34	0,31	0,29	0,25	0,19	0,37
Hesperidiin	2,12	1,74	0,09	0,34	0,28	0,24	0,21	0,13	0,29

Tabel 4. Päevadevaheline korratavus. A – analüüt.

Analüüdid	5 µg/ml			50 µg/ml			100 µg/ml		
	A Pindala, SSH%	A/IS Pindala SSH%	t _R , SSH%	A Pindala, SSH%	A/IS Pindala SSH%	t _R , SSH%	A Pindala, SSH%	A/IS Pindala SSH%	t _R , SSH%
Narirutiin	10,90	9,56	0,63	6,99	5,98	2,18	5,14	4,61	1,70
Hesperidiin	4,73	4,05	0,54	1,34	1,05	1,76	2,91	2,32	1,37

3.3.3. Instrumentaalne avastamis- ja määramispiir

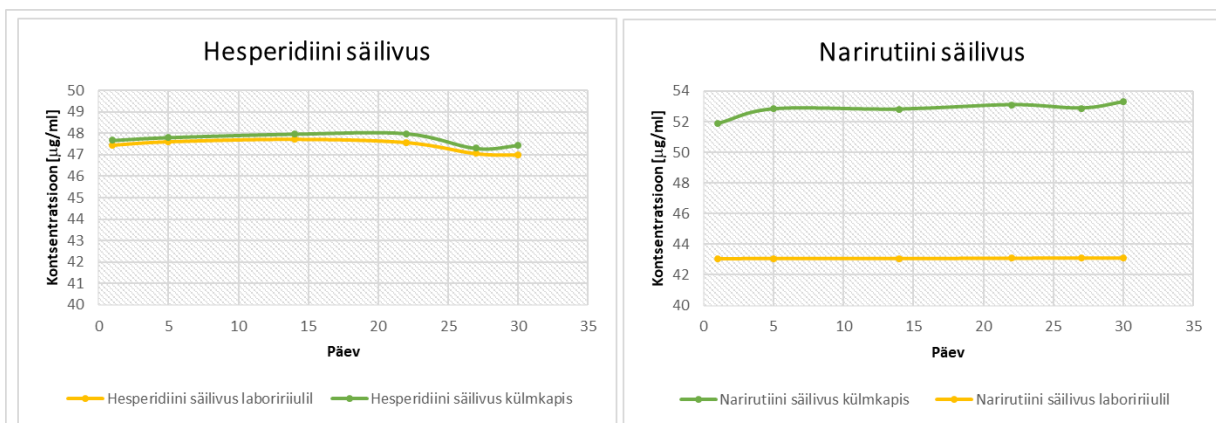
Instrumenti avastamis- ja määramispiiri leidmisel kasutati signaal/müra suhte hindamisviisi (Valemid 8 ja 9). Nullproovina kasutatud 0,5 µg/ml standardlahust mõõdeti kümme korda järjest ühe päeva jooksul ja tulemuste põhjal leiti instrumentaalsed avastamis- ja määramispiirid.

Narirutiini instrumentaalseks avastamispiiriks on 0,17 µg/ml ja instrumentaalseks määramispiiriks 0,57 µg/ml, hesperidiinil on need vastavalt 0,12 µg/ml ja 0,38 µg/ml.

3.3.4. Säilivus

Säilivuskatsete jaoks valmistati kaks 50 µg/ml standardlahust vastavalt tabelile (Lisa 3). Üks lahustest jäeti labori riulile ja teine külmkappi ning nendes mõõdeti HPLC-ga narirutiini ja hesperidiini kontsentratsioone lahuses ühe kuu vältel kuuel päeval, tehes iga kord kolm paralleelkatset. Kõikidel mõõtmispäevadel vahetati peale analüüsimist viaali kõrge, vältimaks lahusti aurustumist, ning asetati tagasi samasse kohta, et vältida keskkonna muutusest tulenevaid juhuslikke erinevusi.

Säilivuskatsete tulemusena oli riulil asetsenud proovi narirutiini määratava kontsentratsiooni standardhälveks 0,49 ja suhteliseks standardhälveks 0,92% ning hesperidiinil 0,28 ja 0,58%. Külmikus hoitud proovil vastavalt 0,04 ja 0,09% ning 0,30 ja 0,64%. Samuti, vastavalt joonisele 9, ei esine märkimisväärseid kontsentratsiooni kõikumisi, mis viitavad proovi stabiilsusele. Seega võib väita, et proovi hoiustamine labori riulil või tavakülmikus ei mõjuta analüüdi sisaldust proovis, vähemalt mitte lühema perioodi, nagu ühe kuu, jooksul. Ehk siis kokkupuude elektromagnetkiirguse või erinevate temperatuuridega ei mõjuta 30-päevase perioodi jooksul analüüdi sisaldust proovis.

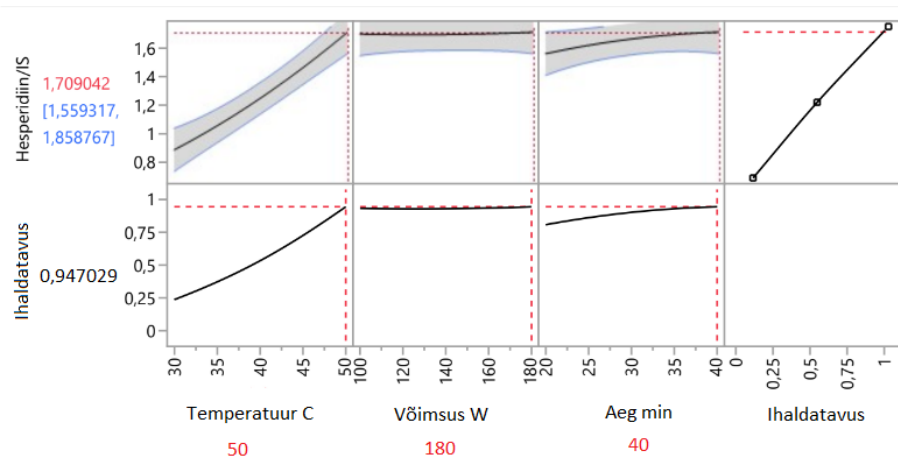


Joonis 9. Hesperidiini ja narirutiini sisalduse muutus standardlahuses kuu vältel.

3.4. Ultraheli ekstraktsioon

3.4.1. Hesperidiini ekstraktsiooni optimaalsed tingimused

Hesperidiini ekstraktsiooni optimaalsete tingimuste leidmiseks rakendati katseplaani lähenemisviisi. Vastavalt katseplaanile (Tabel 1) viidi läbi 15 katset, analüüsiti ekstrakt optimeeritud HPLC-DAD meetodika abil ning määrati analüüdi ja sisestandardi piigi pindalade suhted ning arvatati vastavad kontsentratsioonid (Lisa 5). Nende tulemuste põhjal leiti JMP® tarkvaraga ja Marlen Leemeti abil optimaalseteks ekstraktsiooni tingimusteks 50 °C, 180 W ja 40 min (Joonis 10). Eelduste kohaselt võimaldavad saadud tingimused hesperidiini mandariini biomassist eraldada koguses 6,83 mg/gDW.



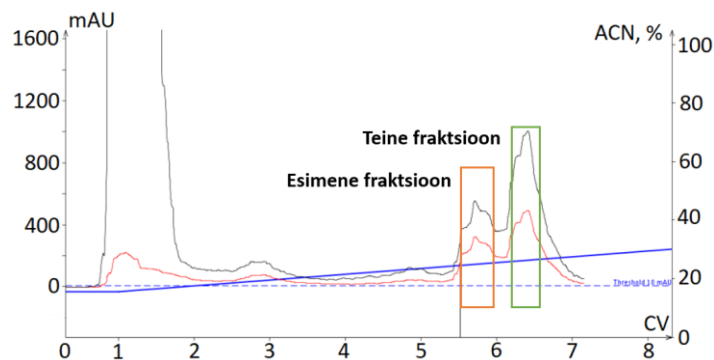
Joonis 10. DOE ennustatavad tulemused.

Mudeli kontrollimiseks viidi läbi optimaalsetel tingimustel kolm kontrollkatset Marlen Leemeti poolt läbiviidud hüdrodestillatsiooni järgse biomassiga. Tulemusena saadi keskmiseks hesperidiini ja sisestandardi suhteks 1,66, millele vastas kontsentratsioon 6,74 mg/gDW (Lisa 5), mis sarnanes katseplaanist saadud ennustuslikule 1,71 suhtele (6,83 mg/gDW). Seega võib kinnitada, et katseplaani mudel töötab ning võib olla rakendatud ka kõikides edaspidistes katsetes. Ekstraktide analüüsimisel selgus, et proovisegu sisaldab ka muid komponente, peamiselt narirutiini (Lisa 6), millest hesperidiini isoleerimiseks kasutati kiirkolonnkromatograafiat.

3.5. Kiirkolonnkromatograafia

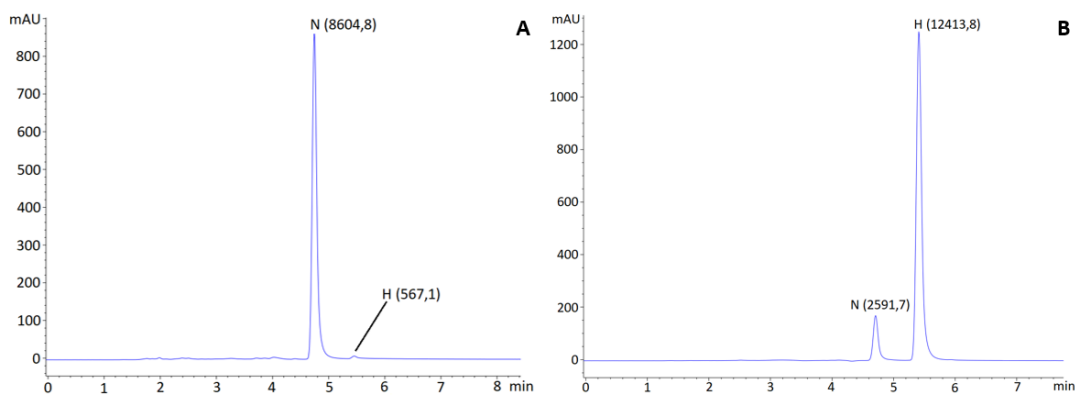
Eesmärgiga isoleerida hesperidiini ekstraktist, töötati välja kiirkolonnkromatograafia lahutusmetoodika.

Metoodika välja töötamist alustati isokraatse elueerimisega voolukiirusel 12 ml/min, eluent sisaldas 32% ACN ja 68% MQ vett. Tulemuseks saadi üks lai piik, seega seejärel prooviti isokraatset elueerimist 30, 25 ning 20%-lise atsetonitriili sisaldusega eluendiga, mille tulemustena piikide lahutus ei paranenud. Edasi mindi gradientse elueerimisega, kus algseks ACN sisalduseks oli 15%, mida ühe kolonni mahu (CV) jagu hoiti ning mille sisaldust tõsteti 10 CV jooksul 80%-ni. Eluendi koostise muutmist ei seadistatud katse aja, vaid kolonni mahu järgi, tähendades, et 17 ml jagu läbipumbatava eluendi kogus on võrdne ühe kolonni mahuga. Tulemusena saadi kitsas piik, kuid selles ei saanud eristada analüüdi piike. Järgmisena muudeti atsetonitriili lõpp kontsentratsiooni eluendis 60% peale, mis võimaldas näha kahte halvasti lahutatud piiki. Seejärel prooviti 50, 40, 35, 30%-list atsetonitriili lõppkontsentratsiooni, millest eelviimane võimaldas eristada kahte eraldatud piiki. Viimaks katsetati voolukiirusega, tõstes seda 15, 20, 25, 30 ja 35 ml/min peale, kuid see ei muutnud tulemust ning liiga kõrge voolukiirus alandas lahutusvõimet. Seega lõplikuks eluendi voolukiiruseks jäi 12 ml/min ja gradiendiks 15-35% (ACN). Optimeeritud tingimustel läbiviidud isoleerimisprotsessi käigus koguti kaks fraktsiooni (Joonis 11). Fraktsioonide lahused analüüsiti HPLC-DAD abil.



Joonis 11. Ekstrakti fraktsioneerimine kasutades kiirkolonnkromatograafiat.

Joonisel 12 olevate kromatogrammide puhul on näha, et narirutini ja hesperidiini eraldamine on põhimõtteliselt võimalik, kasutades pööratudfaasi kromatograafia printsiipe. Esimeses kogutud fraktsioonis leidis põhiliselt ainult narirutini (94%), teises fraktsioonis 83% hesperidiini ja 17% narirutini. Puhtama hesperidiini fraktsiooni kättesaamiseks tuleks meetodikat edasi optimeerida või teise kromatograafilise piigi fraktsiooni koguda veidi hiljem, kaotades osa hesperidiini kogusest. Samas tuleb märkida, et antud lahutusmetoodika lubab efektiivselt isoleerida nii narirutini kui ka hesperidiini.



Joonis 12. Kiirkolonnkromatograafia fraktsioonide kromatogrammid. (A – fraktsioon 1, B – fraktsioon 2).

Kokkuvõte

Käesoleva töö põhieesmärgiks oli mandariini pressijääkides suurtes kogustes leiduva bioflavonoidse ühendi, hesperidiini, analüüsi, eraldamise ja isoleerimise meetodikate väljatöötamine.

Seatud sihi saavutamiseks tegeles autor esmalt HPLC kvantitatiivse meetodika optimeerimisega, eesmärgiga lühendada analüüsiks kuluvat aega, säilitades samal ajal meetodika eesmärgile vastavust. Otstarvele kohasust kontrolliti osalise valideerimisega, määraates meetodika korduvust ja korratavust, instrumentaalseid avastamis- ja määramispiire, proovi säilivust, kalibratsioonisirge lineaarsust ning kromatograafiliste parameetritega, nagu lahutuvus, efektiivsus, selektiivsus, mahtuvusfaktor ja sümmeetrilisus. Optimeerimise tulemusena lühenes analüüsiaeg 35 minutilt 17 minutile. Valideerimisel käigus leiti narirutiini instrumentaalseks avastamispiiriks 0,17 µg/ml ja määramispiiriks 0,57 µg/ml, hesperidiinil vastavalt 0,12 µg/ml ja 0,38 µg/ml. Lisaks tehti kindlaks, et temperatuur ja kiirus ei mõjuta analüüdi sisaldust proovis vähemalt ühe kuu vältel.

Järgmisena eraldati hesperidiin biomassist ultraheli ekstraktsiooni meetodil, mille puhul tuli teha kindlaks optimaalsed ekstraktsiooni tingimused, mis võimaldaksid eraldada pressijääkidest maksimaalsel hulgal huvipakkuvat ühendit. Muudetavateks parameetriteks osutusid ekstraktsiooni aeg, ultrahelivanni võimsus ja vedeliku temperatuur, mille varieerimisel katseplaani põhjal selgusid parimateks ekstraktsiooni läbiviimise tingimusteks 40 minutit, 180 W ja 50 °C. Samuti pandi eelkatsetega paika kuiva biomassi ja solvendi suhe (1:20 gDW:v) ning etanooli protsentuaalne sisaldus ekstrahendis (60%).

Hesperidiini puhtamal kujul kätte saamiseks pidi seda järgnevalt isoleerima ekstraktist kõrvalistest ühenditest, peamiselt narirutiinist. Analüüdi eraldamine viidi läbi kiirkolonnkromatograafia meetodil, mille puhul tuli välja töötada eraldusmeetodika, eesmärgiga lahutada kahe analüüdi piigid võimalikult maksimaalselt, et hesperidiini isoleerimine segust kõige puhtamal kujul oleks lihtsasti teostatav. Lisaks meetodikale oli vajalik valmistada kontsentreeritud ekstrakt, millest oleks võimalik hesperidiini suuremas koguses isoleerida ning puhastada. Proovi lahus valmis ultraheli ekstraktsiooni ekstrakti kokkuaurutamisel ja lahustamisel minimaalseimas solvendi koguses. Töö käigus selgus, et sobivaimaks lahustiks oli DMSO ning lahutusmeetodika kujutas endast gradientset elueerimist voolukiirusega 12 ml/min, mis algas ACN 15% ja MQ vee 85%-lise koostise hoidmisega 1 kolonni mahu jagu ning 2-11 CV jooksul muutus ACN protsentuaalne sisaldus 15-lt 35%-ni. Optimeerimise tulemusena oli võimalik efektiivselt isoleerida hesperidiini ekstraktist puhtusega 83%.

Tulevikus võiks uurida, kas ultraheli ekstraktsiooni läbiviimine kõrgematel temperatuuridel parandab ekstraktsiooni efektiivsust, et see oleks energiakulu suurenemise kohalt tulus. Samuti vajab isoleerimismetoodika edasist optimeerimist ning katsetamist suuremate proovi kogustega.

Tänuavaldused

Sooviksin avaldada tänu oma põhijuhendajale Maria Kuhtinskajale, tema juhendamise ning abi eest töö koostamisel ja laboratoorses töös ning kaasjuhendajat Marlen Leemetit abivalmiduse eest laboris ja töö eksperimentaalses osas.

Kasutatud kirjandus

1. GIAMG homepage <http://giam-group.ge/en/know.html> (külastatud 29.01.2023).
2. GIAMG presentation <http://giam-group.ge/files/prez/PresentationENG.ppt> (accessed January 29, 2023).
3. Mandarin production: https://geostat.ge/media/46441/6.Production_of_Permanent_Crops_ENG.xls (accessed January 29, 2023).
4. Exporters are not satisfied with the quality of Georgian mandarins this season, *EastFruit* **2021** <https://east-fruit.com/en/news/exporters-are-not-satisfied-with-the-quality-of-georgian-mandarins-this-season/>
5. Iqbal, A.; Schulz, P.; Rizvi, S.S. Valorization of bioactive compounds in fruit pomace from agro-fruit industries: Present Insights and future challenges. *Food Bioscience* **2021**, *21*, 101384. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101384>.
6. Osorio, L.L.D.R.; Flórez-López, E.; Grande-Tovar, C.D. The Potential of Selected Agri-Food Loss and Waste to Contribute to a Circular Economy: Applications in the Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Molecules* **2021**, *26* (2), 515. <https://doi.org/10.3390/molecules26020515>.
7. Al-Rumaihi, A.; McKay, G.; Mackey, H.R.; Al-Ansari, T. Environmental Impact Assessment of Food Waste Management Using Two Composting Techniques. *Sustainability* **2020**, *12* (4), 1595. <https://doi.org/10.3390/su12041595>.
8. Suri, S.; Singh, A.; Nema, P.K. Recent advances in valorization of citrus fruits processing waste: a way forward towards environmental sustainability. *Food Science and Biotechnology* **2021**, *30*, 1601-1626. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00984-y>.
9. Satari, B.; Karimi, K. Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resources, Conversation and Recycling* **2018**, *129*, 153-167. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.032>.
10. Circular economy <https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/economy/20151201STO05603/circular-economy-definition-importance-and-benefits> (accessed January 29, 2023).
11. Linear economy <https://www.santander.com/en/stories/linear-and-circular-economies-what-are-they-and-whats-the-difference> (accessed January 29, 2023).
12. Majumdar, S.; Srirangam, R. Solubility, Stability, Physicochemical Characteristics and In Vitro Ocular Tissue Permeability of Hesperidin: A Natural Bioflavonoid. *Pharmaceutical Research* **2009**, *26*, 1217-1225. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9729-6>.
13. Pyrzynska, K. Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities. *Nutrients* **2022**, *14* (12), 2387. <https://doi.org/10.3390/nu14122387>.
14. Soquetta, M.B.; Tonato, D.; Quadros, M.M.; Boeira, C.P.; Cichoski, A.J.; de Marsillac Terra, L.; Kuhn, R.C. Ultrasound extraction of bioactive compounds from Citrus reticulata peel using electrolyzed water. *Food Science and Technology* **2019**, *43* (12). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14236>.

15. Stanistic, D.; Liu, L.H.; Dos Santos, R.V.; Costa, A.F.; Durán, N.; Tasic, L. New Sustainable Process for Hesperidin Isolation and Anti-Ageing Effects of Hesperidin Nanocrystals. *Molecules* **2020**, *25* (19), 4534. <https://doi.org/10.3390/molecules25194534>.
16. Cho, E.J.; Lee, Y.G.; Chang, J.; Bae, H.J. A High-Yield Process for Production of Biosugars and Hesperidin from Mandarin Peel Wastes. *Molecules* **2020**, *25* (18), 4286. <https://doi.org/10.3390/molecules25184286>.
17. Roge, A.B.; Firke, S.N.; Kawade, R.M.; Sarje, S.K.; Vadvalkar, S.M. Brief review on: Flash chromatography. *Pharmaceutical Sciences and Research* **2011**, *2* (8), 1930-1937.
18. Sirard, T. Fundamentals of HPLC. *Waters* **2012**. https://www.waters.com/webassets/cms/events/docs/FundamentalsofHPLCWebinar_TRS_102012.pdf (accessed March 15, 2023).
19. Meyer, V.R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 5th ed.; Wiley, 2010.
20. McMaster, M.C. *LC/MS. A Practical User's Guide*; Wiley-Interscience, 2005.
21. Dong, M.W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*; Wiley-Interscience, 2006.
22. Corradini, D.; Phillips, T.M. *Handbook of HPLC*, 2nd ed.; CPC Press, 2011.
23. Vickrey, T.M. *Liquid Chromatography Detectors*; CPC Press, 1983.
24. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Dolan, J.W. *Introduction to modern Liquid Chromatography*, 3rd ed.; Wiley, 2010.
25. Kuhtinskaja, M. Vedelikkromatograafia. *Instrumentaalanalüüsi loeng*. 2021.
26. Diode Array HPLC Detectors <https://www.biocompare.com/Lab-Equipment/11699-Diode-Array-HPLC-Detectors/> (accessed March 16, 2023).
27. Dolan, J.W. How Does It Work? Part IV: Ultraviolet Detectors. *LCGC North America* **2016**, *34* (8), 534-539.
28. What are Diffraction Gratings & Diffraction Uses? <https://andor.oxinst.com/learning/view/article/diffraction-gratings> (accessed March 16, 2023).
29. Ravisankar, P.; Anusha, S.; Supriya, K.; Kumar, U.A. Fundamental Chromatographic Parameters. *Pharmaceutical Sciences* **2020**, *55* (2), 46-50.
30. Bose, A. HPLC Calibration Process Parameters in Terms of System Suitability Test. *Austin Chromatography* **2014**, *1* (2), 1-4.
31. Kuhtinskaja, M. Kromatograafia. Sissejuhatus. *Instrumentaalanalüüsi loeng*. 2021.
32. ICH Member. ICH M10 on bioanalytical method validation. *Scientific guideline* **2022**.
33. Kulp, M. Valideerimine I. *Metroloogia-ja kvalideedi hindamine laboris loeng*. 2022.
34. Kulp, M. Valideerimine II. *Metroloogia-ja kvalideedi hindamine laboris loeng*. 2022.
35. Ericksson, L.; Johansson, E.; Kettaneh-Wold, N.; Wikstrom, C.; Wold, S. *Design Of Experiments Principles And Applications*; Umetrics Academy, 2000.
36. Montgomery, D.C. *Design and Analysis of Experiments*, 8th ed.; Wiley, 2013.
37. Oehlert, G.W. *A First Course in Design and Analysis of Experiments*; Minitab, 2010.
38. Dean, A.; Voss, D. *Design and Analysis of Experiments*; Springer, 1999.
39. Ferreira, S.C.; Bruns, R.E.; Ferreira, H.S.; Matos, G.D.; David, J.M.; Brandão, G.C.; da Silva, E.P.; Portugal, L.A.; Dos Reis, P.S.; Souza, A.S.; Dos Santos, W.N.L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *597* (2), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>.

40. Fernando, G.S.N.; Sergeeva, N.N.; Frutos, M.J.; Marshall, L.J.; Boesch, C. Novel approach for purification of major betalains using flash chromatography and comparison of radical scavenging and antioxidant activities. *Food Chemistry* **2022**, *385*, 132632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132632>.
41. Sandesh, J.S.S.; Shyamala, S.K.; Balaiah, S.; Sharma, J.V.C. A review on flash chromatography and its pharmaceutical applications. *Biochemical and Pharmaceutical Research* **2021**, *10* (1), 120-124. <https://doi.org/10.32553/jbpr.v10i1.850>.
42. Kumar, S.S.; Raveendran, R.; Achari, K.M.M. Rapid Preparative Isolation of Cleistanthin A from the Leaves of *Cleistanthus Collinus* Using Reverse-Phase Flash Chromatography. *Pharmacy and Bioallied Sciences* **2022**, *14* (2), 93-98. [10.4103/jpbs.jpbs_723_21](https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_723_21).
43. Nipornram, S.; Tochampa, W.; Rattanatraiwong, P.; Singanusong, R. Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) peel. *Food Chemistry* **2018**, *241*, 338-345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.114>.
44. Londoño-Londoño, J.; de Lima, V.R.; Lara, O.; Gil, A.; Pasa, T.B.C.; Arango, G.J.; Pineda, J.R.R. Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry* **2010**, *119* (1), 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.075>.
45. Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O. and Chemat, F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry* **2010**, *119* (2), 851-858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>.
46. Soquetta, M.B.; Tonato, D.; Quadros, M.M.; Boeira, C.P.; Cichoski, A.J.; de Marsillac Terra, L.; Kuhn, R.C. Ultrasound extraction of bioactive compounds from *Citrus reticulata* peel using electrolyzed water. *Food Processing and Preservation* **2019**, *43* (12). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14236>.

Lisad

Lisa 1 HPLC vana ja uue meetoodika tingimused

Vana meetoodika				Uus meetoodika			
Aeg (min)	H ₂ O (%)	ACN (%)	Voolukiirus (ml/min)	Aeg (min)	H ₂ O (%)	ACN (%)	Voolukiirus (ml/min)
0	95	5	0,6	0	75	25	0,7
20	50	50	0,6	6	67,5	32,5	0,7
25	5	95	0,6	6,01	25	75	0,7
30	5	95	0,6	12	25	75	0,7
30,01	95	5	0,6	12,01	75	25	0,7
35	95	5	0,6	17	75	25	0,7

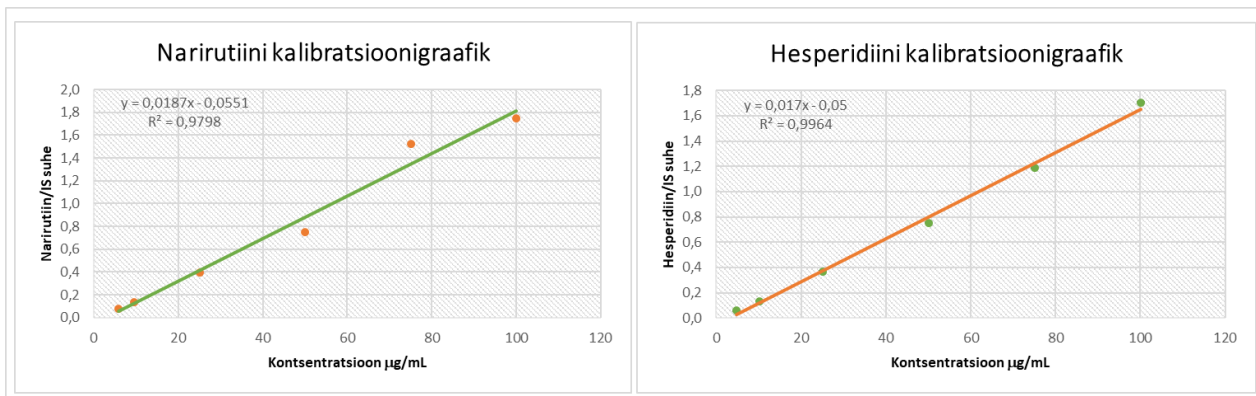
Lisa 2 HPLC metoodika optimeerimine

	I Modifikatsioon		II Modifikatsioon		III Modifikatsioon		IV Modifikatsioon	
	Aeg (min)	ACN (%)	Aeg (min)	ACN (%)	Aeg (min)	ACN (%)	Aeg (min)	ACN (%)
1	0,00	20,0	0,00	20,0	0,00	25,0	0,00	25,0
2	15,00	50,0	10,00	40,0	8,00	35,0	8,00	35,0
3	20,00	95,0	17,00	95,0	10,00	95,0	8,01	95,0
4	25,00	95,0	20,00	95,0	13,00	95,0	10,00	95,0
5	25,01	20,0	20,01	20,0	13,01	25,0	10,01	25,0
6	30,00	20,0	25,00	20,0	18,00	25,0	15,00	25,0
	V Modifikatsioon		VI Modifikatsioon		VII Modifikatsioon		VIII Modifikatsioon	
	Voolukiirus (ml/min)	ACN (%)	Aeg (min)	ACN (%)	Aeg (min)	ACN (%)	Voolukiirus (ml/min)	ACN (%)
1	0,6	25,0	0,00	25,0	0,00	25,0	0,7	25,0
2	0,6	35,0	8,00	35,0	7,00	33,5	0,7	32,5
3	0,7	80,0	8,01	75,0	7,01	75,0	0,7	75,0
4	0,7	80,0	10,00	75,0	12,00	75,0	0,7	75,0
5	0,6	25,0	10,01	25,0	12,01	25,0	0,7	25,0
6	0,6	25,0	15,00	25,0	17,00	25,0	0,7	25,0

Lisa 3 Kalibratsioonilahuste valmistamine

Hesperidiini kontsentratsioon $\mu\text{g/ml}$	Hesperidiini maht μl	Narirutiini kontsentratsioon $\mu\text{g/ml}$	Narirutiini maht μl	IS maht μl	50% MeOH maht μl
5	7	5	3	20	970
10	15	10	5	20	960
25	37	25	13	20	930
50	74	50	26	20	880
75	111	75	39	20	830
100	148	100	52	20	780

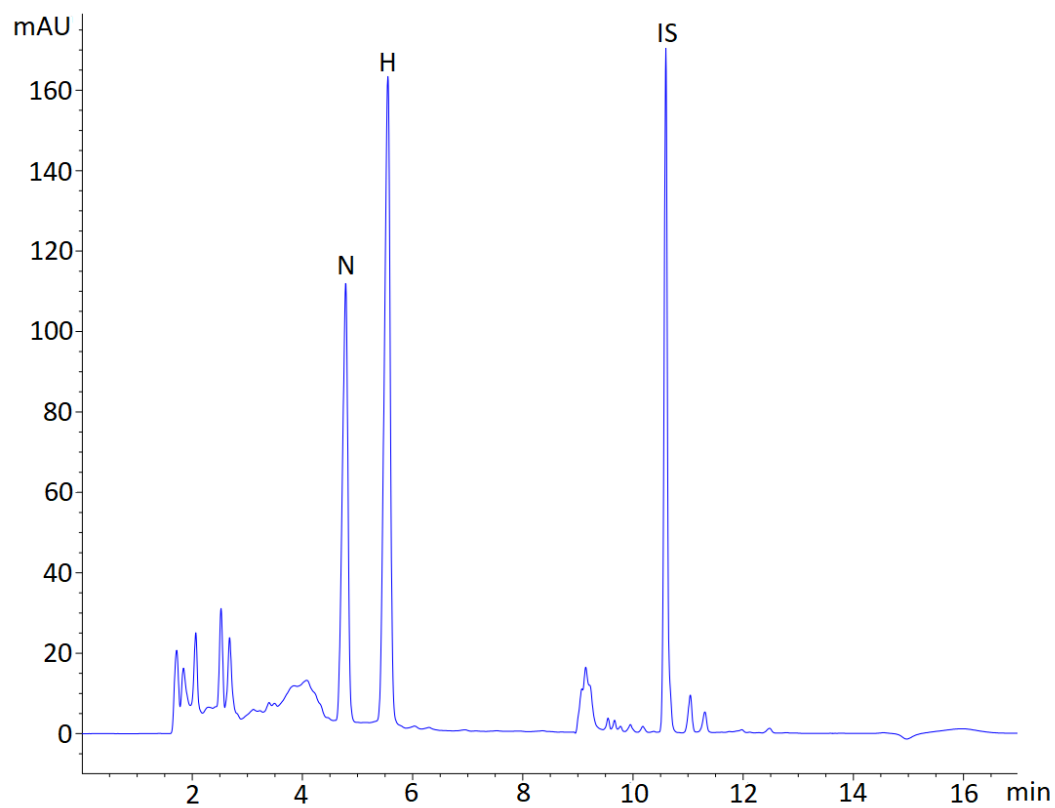
Lisa 4 Analüütide kalibratsioonigraafikud



Lisa 5 Katseplaani mudeli tulemused hesperidiini ekstrakstiooni tingimuste optimeerimiseks

Varjatud muutujad			Dekodeeritud muutujad			Tulemused	
X ₁	X ₂	X ₃	Temperatuur (°C)	Aeg (min)	Võimsus (Vatt)	H/IS	H (mg/gDW)
0	+1	+1	40	40	180	1,24	5,06
-1	-1	0	30	20	140	0,77	3,13
-1	0	+1	30	30	180	0,83	3,32
0	0	0	40	30	140	1,20	4,98
-1	0	-1	30	30	120	0,73	2,85
+1	+1	0	50	40	140	1,66	6,78
+1	0	-1	50	30	120	1,52	6,24
0	-1	+1	40	20	180	1,20	4,76
0	+1	-1	40	40	120	1,15	4,58
+1	0	+1	50	30	180	1,71	6,93
-1	+1	0	30	40	140	0,90	3,64
+1	-1	0	50	20	140	1,61	6,69
0	-1	-1	40	20	120	1,05	4,28
0	0	0	40	30	140	1,09	4,27
0	0	0	40	30	140	1,23	5,06
+1	+1	+1	50	40	180	1,66	6,74

Lisa 6 Ultraheli ekstraktsiooni ekstrakti kromatogramm



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Annabel Taniel

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Hesperidiini ekstraktsioon ja isoleerimine mandariinimahla pressijääkidest“, mille juhendajad on Maria Kuhtinskaja ja Marlen Leemet,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

_____ (kuupäev)

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.