

Ekstrakcija polifenola primjenom vodenog dvofaznog sustava s eutektičkim otapalom u makro- i mikroekstrктору

Milićević, Nela

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:677471>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Nela Milićević
944/BPI

**EKSTRAKCIJA POLIFENOLA
PRIMJENOM VODENOG
DVOFAZNOG SUSTAVA S
EUTEKTIČKIM OTAPALOM U
MAKRO- I
MIKROEKSTRAKTORU**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju, Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek i uz pomoć Manuele Panić, mag. ing. iz Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zavoda za Biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za procesno inženjerstvo

Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

EKSTRAKCIJA POLIFENOLA PRIMJENOM VODENOG DVOFAZNOG SUSTAVA S EUTEKTIČKIM OTAPALOM U MAKRO- I MIKROEKSTRAKTORU

Nela Miličević, 944/BPI

Sažetak: : Cilj ovoga rada bio je ispitati potencijal primjene vodenog dvofaznog sustava s eutektičkim otpalom za ekstrakciju polifenola u makro- i mikroekstraktor. U okviru rada, na temelju učinkovitosti ekstrakcije, kao pogodno eutektičko otapalo odabran je kolin-klorid: etilen-glikol. Primjenom metode odzivnih površina procijenjeni su optimalni uvjeti za provedbu procesa ekstrakcije u šaržnom makroekstraktor: masa DES-a od 1,25 g, koncentracija soli od 0,95 g mL⁻¹, vrijeme ekstrakcije od 15 min, temperatura ekstrakcije od 50 °C, koncentracija galne kiseline od 60 mg L⁻¹ te je uočeno da je temperatura varijabla koja najviše utječe na učinkovitost ekstrakcije. Pri navedenim optimalnim uvjetima provedeni su pokusi ekstrakcije u kontinuiranom mikroekstraktor te je postignuta učinkovitost ekstrakcije od približno 94 % za vrijeme zadržavanja od 2,43 s što predstavlja značajan napredak usporedbi sa šaržnim procesom gdje je za vrijeme ekstrakcije od 15 min postignuta učinkovitost ekstrakcije od 88 %.

Ključne riječi: mikroekstraktor, ekstrakcija polifenola, vodeni dvofazni sustav, eutektička otapala

Rad sadrži: 61 stranica, 18 slika, 13 tablica, 67 literaturna navoda, 00 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: dr. sc. Ana Jurinjak Tušek

Pomoć pri izradi: Manuela Panić, mag.ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. Davor Valinger
2. Doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek
3. Doc.dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo
4. Doc.dr.sc. Antonija Trontel (zamjena)

Datum obrane: 15. srpnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Process Engineering

Laboratory for Measurement, Control and Automatisation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

EXTRACTION OF POLYPHENOLS USING THE AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM WITH EUTECTIC SOLVENT IN MACRO- AND MICROEXTRACTOR

Nela Milićević, 944/BPI

Abstract: *The aim of this work was to investigate the potential of aqueous two-phase system with eutectic solvents for extraction of polyphenols in macro- and microextractor. Based on the efficiency of the extraction, choline chloride: ethylene-glycol was selected as a suitable eutectic solvent. Using the Response surface method, the optimum conditions for the aqueous two-phase system extraction in the batch conditions were estimated (DES weight of 1.25 g, salt concentration of 0.95 g mL⁻¹, 15 minute extraction time, extraction temperature of 50 °C, galic acid concentration of 60 mg L⁻¹) and it was observed that the temperature is the most important variable for the extraction efficiency. Extraction experiments in a continuous microextractor were carried out at selected optimum conditions, and the extraction efficiency of the of approximately 94 % was achieved at the residence time of 2.43 s, which represents a significant improvement compared to the batch process where the extraction efficiency of 88 % was achieved for extraction time of 15 min.*

Keywords: *microextractor, polyphenol extraction, aqueous two-phase system, eutectic solvents*

Thesis contains: 61 pages, 18 figures, 13 tables, 67 references, 00 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Ana Jurinjak Tušek, Assistant professor*

Technical support and assistance: *Manuela Panić, mag. ing.*

Reviewers:

1. PhD. *Davor Valinger*, Assistant professor
2. PhD *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
3. PhD. *Marina Cvjetko Bubalo*, Assistant professor
4. PhD. *Antonija Trontel*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 15 July 2019

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	2
2.1.	MIKROREAKTORI	2
2.1.1.	Struktura mikroreaktora.....	4
2.1.2.	Profili strujanja sustava kapljevina-kapljevina u mikroreaktorima	6
2.1.3.	Matematičko modeliranje procesa u mikroreaktoru.....	8
2.1.4.	Primjena mikroreaktora u području biotehnologije.....	10
2.2.	EUTEKTIČKA OTAPALA	13
2.2.1.	Priprava eutektičkih otapala	14
2.2.2.	Primjena DES-ova u biotehnološkim procesima.....	16
2.3.	VODENI DVOFAZNI SUSTAVI	17
2.3.1.	Općenito	17
2.3.2.	Vodeni dvofazni sustavi s DES-om.....	18
2.3.3.	Primjena vodenih dvofaznih sustava u mikroreaktoru	19
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	21
3.1.	MATERIJALI	21
3.1.1.	Uzorci	21
3.1.2.	Otapala i reagensi	21
3.2.	METODE	22
3.2.1.	Priprava eutektičnih otapala	22
3.2.2.	Karakterizacija komponenata vodenog dvofaznog sustava s eutektičnim otapalima.....	23
3.2.2.1.	<i>Određivanje gustoće</i>	23
3.2.2.2.	<i>Određivanje viskoznosti</i>	23
3.2.3.	Ekstrakcija polifenola u makroekstratoru (šaržni pokus)-odabir DESa	24
3.2.4.	Optimiranje uvjeta ekstrakcije u makroekstratoru metodom odzivnih površina	24
3.2.5.	Priprema vodenih ekstrakata mente i melise	26
3.2.6.	Analiza profila strujanja dvofaznog vodenog sustava s eutektičnim otpalom u mikroekstratorskom sustavu	27
3.2.7.	Ekstrakcija polifenola u mikroekstraktor	28
3.2.8.	Određivanje koncentracije polifenola.....	29
3.2.9.	Statistička analiza i matematičko modeliranje	30
3.2.9.1.	<i>Metoda odzivnih površina za planiranje eksperimenata</i>	30
3.2.9.2.	<i>Matematički model ekstrakcije polifenola u mikroekstratoru</i>	30

4. REZULTATI I RASPRAVA	33
4.1. ODABIR EUTEKTIČKOG OTAPALA ZA PROVEDBU EKSTRAKCIJE.....	33
4.2. Optimiranje uvjeta ekstrakcije galne kiseline u vodenom dvofaznom sustavu s DES-om u makroekstratoru	37
4.3. Ekstrakcija polifenola u vodenom dvofaznom sustavu s DES-om u mikroekstratoru	48
5. ZAKLJUČAK	54
6. LITERATURA.....	55

1. UVOD

Mikroreaktorski sustavi su dio novih tehnologija koje sadrže procesne jedinice vrlo malih dimenzija. Mikroreaktori imaju mnogo prednosti s obzirom na klasične reaktore, a neke od njih su smanjenje volumena reakcijske smjese, manja potrošnja energije, zauzimaju manje prostora, manja je potrošnja kemikalija i katalizatora, lakše je uvećanje procesa i smanjeno je vrijeme potrebno za provedbu reakcija. Laminaran profil strujanja koji nastaje zbog smanjenja dimenzija, znatno olakšava problem postavljanja matematičkih modela procesa koji se odvijaju u mikroreaktorskim sustavima. Mikroreaktori danas nalaze primjenu u mikro-elektro-mehaničkim sustavima, elektroničkom hlađenju, kemijskom inženjerstvu, medicini i genetičkom inženjerstvu, bio-inženjerstvu itd. Primjena mikroreaktora omogućava preciznu regulaciju procesa te upotrebu malih količina reaktanata i katalizatora, a pogodni su i za obavljanje reakcija koje su izrazito egzotermne/endotermne. Prema literaturi oko 50 % reakcija koje se primjenjuju u proizvodnji finih kemikalija i farmaceutskih proizvoda bi se moglo značajno poboljšati provođenjem kontinuiranih procesa u mikroreaktorskim sustavima, a za većinu (~44 %) mikroreaktori bi bili najbolji reakcijski sustav.

Osim na razvoju reaktorskog stava tijekom godina radi se i na novim i sofisticiranim otapalima koja zadovoljavaju potrebe održivih eko-efikasnih procesa. U tom području istaknula su se eutektička otapala koja predstavlja mješavinu komponenti koje na temelju specifičnih omjera imaju najnižu točku taljenja.

Cilj ovoga rada je ispitati potencijal primjene vodenih dvofaznih sustava s eutektičnim otapalima za ekstrakciju polifenola u šaržnom makroekstratoru i kontinuiranom mikroekstratorskom sustavu te definirati optimalne procesne uvjete za provođenje procesa ekstrakcije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKROREAKTORI

U posljednjih nekoliko godina, zbog sve veće potrebe za sirovinama, energijom i rješenjima ekoloških problema, značajan je interes kemijskih inženjera i biotehnologa usmjeren prema tehnologijama mikro dimenzija (primjerice mikroreaktorima, mikroseparatorima, mikroizmjenjivačima topline...). Mikroreaktorska tehnologija dobiva sve više na važnosti u kemijskim i farmaceutskim sintezama, kemijskom inženjerstvu i procesnoj tehnologiji. Smanjenjem dimenzija procesne opreme za nekoliko redova veličine, postižu se značajne ekonomske uštede, veća sigurnost procesa, a i opterećenje okoliša postaje značajno manje (Pohar i Plazl, 2009). Osim toga, intenzifikacija procesa ima za posljedicu skraćenje vremena izlaska proizvoda na tržište što je ključno za proizvodnju finih kemikalija i farmaceutskih proizvoda (Marques i Fernandes, 2011). Prema Roberge i sur. 2005 oko 50 % reakcija koje se primjenjuju u proizvodnji finih kemikalija i farmaceutskih proizvoda bi se moglo značajno poboljšati provođenjem kontinuiranih procesa u mikroreaktorskim sustavima, a za većinu (~44 %) mikroreaktori bi bili najbolji reakcijski sustav. Naime manja količina upotrijebljenih reaktanata i katalizatora, manje izlaganje štetnim i toksičnim tvarima te mogućnost provođenja specifičnih kemijskih i biokemijskih reakcija važna su prednost mikroreaktora (Mills i sur., 2007). Poboljšano vođenje procesa omogućava dobru selektivnost procesa i osigurava dobivanje proizvoda visokog stupnja čistoće (Commenge i sur., 2005).

Mikroreaktori su općenito definirani kao minijaturni reakcijski sustavi koji su barem djelomično izrađeni metodama mikrotehnologije i preciznog inženjerstva. Karakteristične dimenzije unutarnjih struktura unutar mikroreaktora tipično su u rasponu mikrometara, dok su konektori, kućišta ili izolacijski uređaji, obično izvedeni u makroskopskim dimenzijama (Löwe i Ehrfeld, 1999).

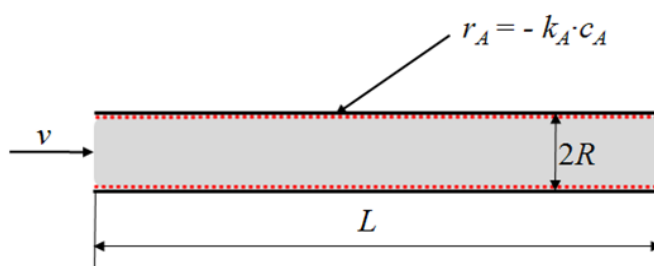
Kao rezultat malih volumena reaktora, ukupna sigurnost postupka je značajno poboljšana, čak i kada se koriste ekstremni reakcijski uvjeti. Na taj način, mikroreaktorska tehnologija nudi jedinstven način za izvođenje jako brzih, egzotermnih reakcija i omogućuje izvođenje reakcija koje se odvijaju kroz vrlo nestabilne ili čak eksplozivne intermedijere (Gutmann i sur., 2015).

Male dimenzije mikrokanala mikroreaktora osiguravaju neke osnovne prednosti u usporedbi s klasičnim reaktorskim sustavima (tablica 1):

Tablica 1. Usporedba mikro- i makro-reaktora (Lomel i sur., 2006)

<i>reaktor</i>	d / m	$U / W m^{-2} K^{-1}$	$a / m^2 m^{-3}$	τ / s
kotlasti reaktor s pritokom (idealno miješanje)	$2 \cdot 10^0$	$2,0 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^0$	$2,52 \cdot 10^4$
protočni kotlasti reaktor	$2 \cdot 10^0$	$2,0 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^0$	$2,02 \cdot 10^4$
minireaktor	$1 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^3$	$1,50 \cdot 10^0$
mikroreaktor	$1 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^4$	$1,50 \cdot 10^{-3}$

Učinak smanjenja dimenzije reaktora najbolje se očituje analizom karakterističnih vremena provedbe procesa (slika 1). Pri tome je posebno interesantan učinak smanjenja dimenzije reakcijske opreme na difuzijsko vrijeme. Kako je difuzijsko vrijeme omjer kvadrata puta i difuzijskog koeficijenta, smanjenje veličine procesne opreme kod mikroreaktora ima za posljedicu vrlo kratka vremena koja su potrebna molekulima da difundiraju u prostoru gdje se odvija proces.



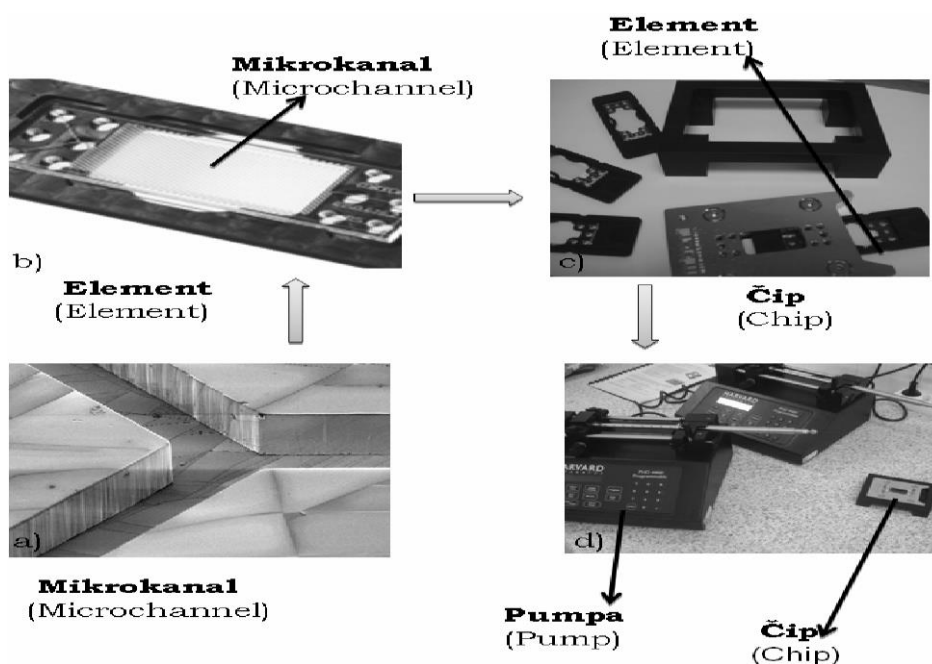
$k_A = 10 \text{ s}^{-1}$	reakcijsko vrijeme	$t_A = \frac{1}{k_A} = \frac{1}{10} = 0,1 \text{ s}$
$R = 1 \cdot 10^{-4} \text{ m}$	vrijeme zadržavanja	$\tau = \frac{L}{v} = \frac{1 \cdot 10^{-2}}{1 \cdot 10^{-2}} = 1 \text{ s}$
$D = 1 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	difuzijsko vrijeme	$t_D = \frac{R^2}{D} = \frac{(1 \cdot 10^{-4})^2}{1 \cdot 10^{-6}} = 0,01 \text{ s}$
$L = 1 \cdot 10^{-2} \text{ m}$		
$v = 1 \cdot 10^{-2} \text{ m s}^{-1}$		

Slika 1. Učinak smanjenja procesne opreme na karakteristične procesne veličine mikroreaktora (Jovanović, 2009).

2.1.1. Struktura mikroreaktora

Osnovna strukturna jedinica mikroreaktora je mikrokanal (slika 2a). Mikrokanal može biti pravokutnog ili kružnog oblika, a površina poprečnog presjeka mikrokanala je od nekoliko μm^2 do nekoliko mm^2 . Ovisno o kasnijoj primjeni, mikrokanali se različitim tehnikama izrade (mokro jetkanje, fotolitografija, lijevanje u kalupe) urezuju u pogodan materijal (najčešće staklo). Primijenjena tehnika urezivanja i materijal u koji se mikrokanal urezuje izravno utječe na svojstva površine mikrokanala (hrapavost), što kao posljedicu može imati različite oblike strujanja fluida u mikrokanalima za iste brzine strujanja, a samim time i različit utjecaj na karakteristike provedenog procesa. Mikrokanali se urezuju u pravokutne pločice (prosječne dimenzije širina : debljina : duljina = 15 mm : 2 mm : 45 mm), koje se nazivaju elementi mikroreaktora (slika 2b). Elementi mikroreaktora mogu biti izvedeni s nekoliko ulaznih/izlaznih procesnih tokova koji se spajaju/razdvajaju u zajedničke/odvojene tokove pomoću "Y" (slika 2a) ili "T"-spojnica. Kako bi se povećala stabilnost sustava i omogućilo jednostavno i sigurno spajanje elemenata s pumpama za dovod fluida i detektorima (slika 2d) te spajanje dvaju ili više elemenata serijski ili paralelno, element mikrokanala ugrađuje se u kućište (slika 2c), opremljeno otvorima za spajanje vanjskih cijevi (najčešće kapilarnih) s mikrokanalom. Element mikroreaktora ugrađen u kućište često se naziva i mikroreaktorski čip (Šalić i sur., 2010).

Mikroreaktorski sustavi sadrže niz komponenti, koje uključuju pumpe za uvođenje reaktanata, mjerila protoka/regulatora, reaktore s grijačima/rashladnim jedinicama s povratnom vezom, separatore za kemijsku obradu između reakcijskih stupnjeva, ventile, regulatore protutlaka, ventile za uzorkovanje i opremu za analizu produkata (Jensen, 2017).



Slika 2. Osnovne strukturne jedinice mikroreaktorskog sustava (Šalić i sur., 2010).

Način umrežavanja mikroreaktora za veći obim proizvodnje (eng. „*scale-up*“) varira ovisno o procesima u mikroreaktoru i ekonomičnosti proizvoda (Prashant i sur., 2018). Jednostavni način podrazumijeva upotrebu duljih mikrokana uz istovremeno držanje vremena zadržavanja istim, a to rezultira većim površinskim brzinama koje mijenjaju hidrodinamiku i transportna svojstva. Ova strategija može u određenoj mjeri poboljšati učinkovitost miješanja i fenomene prijenosa topline i mase. Povećavanjem broja procesnih jedinica (eng. „*numbering up*“), konstruira se sustav koji sastoji od nekoliko mikroreaktorskih uređaja koji su postavljeni paralelno, što omogućava konstantni fenomen prijenosa topline i mase, dok se ukupna iskoristivost procesa postupno povećava. Način na koji se „*numbering up*“ može još izvesti je vanjski i unutarnji „*numbering up*“. Za plinsko-tekuće reakcijske sustave, vanjski „*numbering up*“ uključuje višestruke autonomne reakcijske sustave (npr. svaki uređaj ima vlastitu pumpu, regulator protoka i mikrokana) paralelno. Nasuprot tome, unutarnji „*numbering up*“ koristi jedan sustav za uvođenje komponenata u sustav pomoću pumpe, nakon čega se reakcijska smjesa distribuira kroz niz mikrokana. Međutim, glavna poteškoća unutarnjeg „*numbering up*“ leži u jednakoj raspodjeli reakcijskog toka preko različitih kana. Male razlike u padu tlaka rezultiraju lošom raspodjelom protoka, a time i nejednakim uvjetima reakcije u različitim kanalima (Su i sur., 2016).

Predloženo je da se za moguću industrijalizaciju mikroprotočne kemije koristi paralelni reaktorski sustav („*numbering up*“) umjesto povećanja karakteristične dimenzije kana

(„scale up“). Kao i kod većine stvari, treba uzeti u obzir prednosti i mane različitih načina povećanja iskoristivosti. „Numbering up“ zahtijeva složenu distribuciju protoka i razrađene metode praćenja reakcije, dok „scale up“ pruža ograničeni pristup prostoru reakcijske faze koji se može usporediti s performansama mikrofluidnog reaktora (Elvira i sur., 2013).

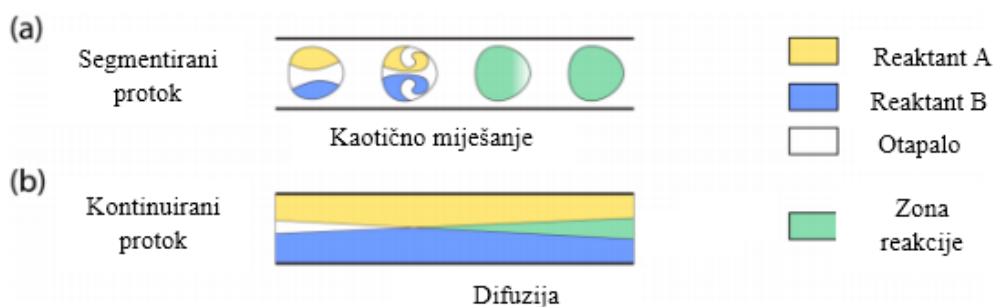
Jedna od najvećih prednosti mikroreaktora je njihova sposobnost da provode kompleksne reakcije uz visoku mogućnost kontrole kinetike, te zbog poboljšanih uvjeta sinteze, raste mogućnost poboljšanja svojstava proizvoda. Spomenute kompleksne reakcije često uključuju više faza koje se međusobno ne miješaju (Prashant i sur., 2018). Prednosti mikroreaktora također uključuju: (i) smanjenu veličinu kroz mikrofabrikaciju, (ii) smanjene difuzijske udaljenosti, (iii) povećane brzine prijenosa topline i mase, te samim time i prinosi obrade, (iv) smanjeni volumeni reakcije, (v) kontrolirani zatvoreni sustavi koji izbjegavaju kontaminaciju (vi) korištenje otapala pri povišenim tlakovima i temperaturama, (vii) smanjenu potrošnju kemikalija, (viii) mogućnost kontinuirane sinteze (Wirth, 2013).

2.1.2. Profili strujanja sustava kapljevina-kapljevina u mikroreaktorima

Mikroprotočni sustavi koji uključuju dvofazne sustave plin-kapljevina ili kapljevina-kapljevina su proučavani jer su prijenos topline i tvari u tim uređajima znatno veći u usporedbi s konvencionalnim uređajima, zbog dobro definiranih profila strujanja i vrlo velike međufazne površine. Nadalje, veliki omjer površine prema volumenu i mali volumen radnog medija u mikroprotočnim sustavima ubrzavaju kemijsku reakciju i poboljšavaju prinos proizvoda. Osim toga, smicanje unutar segmenta tekućine stvara vrtložno strujanje u kanalu, što poboljšava miješanje unutar segmenata i poboljšava prijenos tvari preko međufazne površine, osiguravajući jednaku raspodjelu tvari i temperature u kanalu (Chandra i sur., 2016).

Dvije kapljevine u mikrokanal mogu biti dovedene pomoću vanjskih pumpi upotrebom “Y”- ili “T”-spojnice. Difuzija i reakcija u takvim sustavima su poboljšane primjerice izmjenom lipofilnih svojstava nepolarnih kapljevina u procesu dodavanjem ionskih čestica (npr. kvaternih amonijevih soli), formiranjem micela ili stvaranjem mikroemulzija, tzv. ulje u vodi (eng. *oil-in-water*) upotrebom odgovarajućih površinski aktivnih tvari (Šalić i sur., 2010). Uobičajeni načini međudjelovanja u slučaju dvofaznog protoka kapljevina-kapljevina su segmentirano strujanje (slika 3a) i paralelno strujanje (slika 3b). Kod segmentiranog strujanja, poznato je da su dva mehanizma odgovorna za prijenos mase između dvije tekućine: unutarnja cirkulacija se odvija unutar svakog segmenta i koncentracijski gradijenti između

susjednih segmenta dovode do difuzije između faza. U slučaju paralelnog strujanja, protok je laminarni, a prijenos molekula između dvije faze trebao bi se odvijati samo difuzijom (Dessimoz i sur., 2008).



Slika 3. Usporedba miješanja reaktanata u mikrofluidnim uređajima s segmentiranim i kontinuiranim protokom. Žuta i plava boja označavaju reaktante, bijela boja je čisto područje otapala, a zeleno je područje reakcije (Gonidec i Puigmarti-Luis 2019)

Kao što je prikazano na slici 3, u uređajima sa segmentiranim protokom (a), miješanje je rezultat kaotične advekcije, dok je u kontinuiranim mikroprotočnim uređajima (b), miješanje reaktanata postignuto samo molekularnom difuzijom (Gonidec i Puigmarti-Luis 2019).

Dvofazni paralelni protok može se koristiti za provedbu reakcija i ekstrakcija, kao i za postizanje učinkovitog odvajanja faza na izlazu iz mikroreaktora. Profili strujanja u mikroreaktoru ovise o mnogim parametrima, uključujući linearne brzine strujanja pojedine faze, svojstva fluida, geometriju mikrokanala te materijal od kojeg je mikrokanal izveden. Protok je tipično laminarni; kada je sustav dvofazan, granice međufaznih područja su jasno vidljive. Tipični laminarni protok na mikroskali omogućuje paralelno strujanje dviju faza bez miješanja, što omogućuje visoko kontrolirane uvjete za određeni kemijski proces. Budući da tekućina s višom viskoznošću ima tendenciju zauzimanja većeg dijela mikrokanala, položaj međufazne površine može se kontrolirati podešavanjem brzina protoka. Predviđanje položaja međufazne površine važno je za projektiranje i rad mikroreaktora te zahtijeva rješavanje jednadžbi mehanike fluida (Pohar i sur., 2011).

2.1.3. Matematičko modeliranje procesa u mikroreaktoru

Unatoč širokoj primjeni o osnovnim procesima prijenosa tvari i topline u mikroreaktorima se još uvijek malo zna što ograničava precizno predviđanje produktivnosti sustava. Zbog toga se provodi analiza hidrodinamike procesa, te prijenosa tvari i topline (Yue i sur., 2004). Za opis hidrodinamičkih uvjeta strujanja u mikroreaktorima može se upotrijebiti Navier-Stokes-ova jednadžba (Xu i sur., 2000). Za višefazne sustave te jednadžbe dobivaju se primjenom drugog Newton-ovog zakona na tok fluida (Ehrfeld i sur., 2000). Ako je u sustavu plinska faza, primjenjuje se Navier-Stokes-ova jednadžba za stlačive fluide (jednadžba 1):

$$\rho \cdot \left(\frac{\partial v_i}{\partial t} + v_j \cdot \frac{\partial v_i}{\partial x_j} \right) = - \frac{\partial p}{\partial x_i} + \rho \cdot g_i + \frac{\partial}{\partial x_k} \left[\mu \cdot \left(\frac{\partial v_i}{\partial x_k} + \frac{\partial v_k}{\partial x_i} - \frac{2}{3} \cdot \delta_{ik} \cdot \frac{\partial v_j}{\partial x_j} \right) \right] \quad [1]$$

gdje je v_i komponenta brzine toka u smjeru x , ρ gustoća fluida, μ dinamička viskoznost, p tlak, g_i ubrzanje sile teže, t vrijeme i δ_{ij} Kronecker-ov simbol. U jednadžbi 1 v i g su vektorske veličine, dok su i, j i k komponente vektora. Navier-Stokes-ove jednadžbe definiraju sustav tri jednadžbe za četiri nepoznanice (v_i, v_j, v_k i p). Za potpunu definiciju sustava potrebna je još i jednadžba očuvanja mase (jednadžba 2):

$$\frac{\partial p}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x_i} (\rho \cdot v_i) = 0 \quad [2]$$

Kod opisa toka kapljevine u mikroreaktorima primjenjuje se oblik Navier-Stokes-ove jednadžbe za nestlačivi fluid (jednadžba 3):

$$\frac{\partial v_i}{\partial t} + v_j \cdot \frac{\partial v_i}{\partial x_j} = - \frac{1}{\rho} \cdot \frac{\partial p}{\partial x_i} + g_i + \frac{1}{\rho} \cdot \frac{\partial}{\partial x_j} \left(\mu \cdot \frac{\partial v_i}{\partial x_j} \right) \quad [3]$$

Kod toka fluida u cijevima, kao što je slučaj i u mikrokanalima, moguće je provesti pojednostavljenije Navier-Stokes-ove jednadžbe uz pretpostavku da je tok stacionaran i da postoji konstantan pad tlaka, pri čemu se dobiva izraz (jednadžba 4):

$$q = \frac{\Delta p}{L} \cdot \frac{\pi \cdot d^4}{128 \cdot \mu} \quad [4]$$

Gornji izraz poznat je kao Hagen-Poiseuille-ov tok, gdje su L i d duljina i promjer mikrokanala. Hagen-Poiseuille-ov tok karakteriziraju maksimalna brzina u sredini mikrokanala, minimalna brzina na stijenkama (uz uvjet da nema „smicanja“) i proporcionalnost protoka i pada tlaka. Kod konstantnog protoka, pad tlaka je potreban za pokretanje fluida kroz mikrokanal.

Osnovna jednadžba koja se koristi za opis prijenosa tvari u slučaju nestlačivih fluida izvodi se iz opće jednadžbe koja opisuje konvekciju i difuziju (jednadžba 5) (Ehrfeld i sur., 2000):

$$\frac{\partial c}{\partial t} + v_i \cdot \frac{\partial c}{\partial x_i} = \frac{\partial}{\partial x_i} \left(D \cdot \frac{\partial c}{\partial x_i} \right) - r \quad [5]$$

gdje c predstavlja koncentraciju, v brzinu protjecanja, D molekularnu difuzivnost, a r brzinu kemijske/biokemijske reakcije. Jednostavna analiza prijenosa tvari u mikrokanalima provodi se definiranjem vrijednosti Peclet-ove bezdimenzijske značajke (jednadžba 6):

$$Pe = \frac{v \cdot L}{D} \quad [6]$$

Za većinu kemijskih i biokemijskih procesa, posebno onih koji se odvijaju u višefaznim sustavima, difuzija predstavlja limitirajući korak (Häusler i sur., 2012). Smanjenjem dimenzija reaktora, dolazi do smanjenje karakteristične udaljenosti koju molekule moraju prijeći, što dovodi do značajnog skraćivanja difuzijskog vremena.

Mikrokanale karakteriziraju male vrijednosti Reynolds-ove značajke (vrijednosti uglavnom ispod 100 (Plazl i Lakner, 2010), što upućuje na laminarno strujanje pri čemu miješanje faza ovisi isključivo o difuziji molekula iz jedne faze u drugu. Osim navedene Reynolds-ove značajke za analizu strujanja sustava kapljevina-kapljevina u mikroreaktorima, koriste se i bezdimenzijske značajke nabrojane u tablici 3.

Tablica 3. Važne bezdimenzijske značajke za opis segmentiranog strujanja u sustavu kapljevin-kapljevina u mikroreaktoru (Kashid, 2007)

<i>bezdimenzijska značajka</i>	<i>opis</i>
$Ca = \frac{\mu \cdot v}{\sigma}$	omjer viskozne sile i površinske napetosti
$m = \frac{c_1^*}{c_2^*}$	omjer koncentracija zasićenja topljive tvari u fazama 1 i 2
$Fo = \frac{t \cdot D}{r^2}$	omjer realnog vremena i vremena potrebnog za postizanje stacionarnog stanja
$Pe = \frac{d^2 \cdot v}{D \cdot L}$	omjer prijenosa tvari konvekcijom i molekularnom difuzijom
$Re = \frac{v \cdot \rho \cdot d}{\mu}$	omjer inercijske i viskozne sile
$D_R = \frac{D_1}{D_2}$	omjer difuzivnosti topljive tvari u fazama 1 i 2
$\mu_R = \frac{\mu_1}{\mu_2}$	omjer viskoznosti topljive tvari 1 i 2

2.1.4. Primjena mikroreaktora u području biotehnologije

Zbog sigurnosti, održivosti, kompaktnosti, značajnog smanjenja otpada, isplativosti, niskih operativnih i kapitalnih troškova te smanjene potražnje za energijom, primjena mikrostrukturiranih reaktora posljednjih je godina raznolika. Biološka i farmaceutska primjena mikroreaktora uglavnom uključuje biosintezu i biokemijske procese, enzimske testove, biološke „screening“ testove, preklapanje proteina i analitičke testove (Prashant i sur., 2018). U tablici 4 se spominju primjeri mikroprotočnih tehnologija za različite znanstvene primjene. Tipični postupci sinteze u mikroreaktorima uključuju složene reakcijske procese i proizvodnju molekula relevantnih za farmaceutsku i medicinsku kemiju. Nadalje, moguće je integrirati mikroreaktore u visoko osjetljive sustave bioloških testova na bazi mikrokanala koji mogu riješiti neke od potencijalnih industrijskih zahtjeva. Istraživanje o sintezi i primjeni nanomaterijala dramatično se povećalo tijekom posljednja dva desetljeća. Pojava mikroreaktora omogućila je potencijalne alternative za veliku proizvodnju nanočestica (Prashant i sur., 2018). U kemijskom inženjerstvu, mikroreaktori se uglavnom koriste za sintezu organskih spojeva, specijalnih kemikalija, kemijskih intermedijera i farmaceutskih

proizvoda. U tim organskim sintezama istraživačima često predstavlja problem toksičnost kemikalija, opasnim uvjetima temperature i tlaka te kinetikom reakcije. Mikroreaktori pružaju mogućnost odvijanja takvih reakcija na sigurniji način (Prashant i sur., 2018).

Tablica 4. Primjeri mikroprotočnih tehnologija koje koriste različite vrste uređaja i materijala za različite znanstvene primjene (Oliveira i sur., 2016).

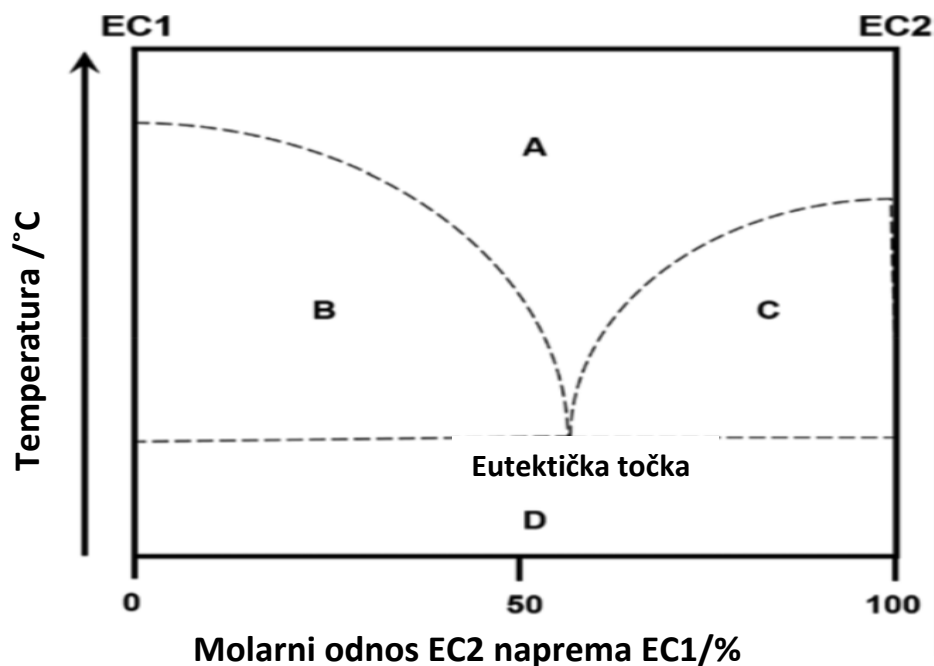
Tehnologija	Materijal	Primjena
Mikroprotočni uređaji za stvaranje koncentracijskog gradijenta	Staklo- PDMS	Koncentracijsko gradijent-generirajući uređaj za uzgoj kvasca
		Kultura ljudskih neuronskih stanica u koncentracijsko gradijent-generirajućem uređaju
		Generiranje oksidacijskih gradijenata za proučavanje kultura stanica sisavaca i njihovo ponašanje
	Staklo – polistiren	2D gradijent-generirajući uređaj za testiranje stanica sisavaca
Mikroprotočni sustavi koji se baziraju na kapljicama	Staklo – PDMS	Inkapsulacija stanica sisavaca u kuglice
		Kapljični elektroporacijski čip za transformaciju stanica algi
		Kapljica u digitalno uređaj za testiranje pojedinačnih stanica kvasca
	Bazirani na staklu	Mikroprotočni injekcijski sustav baziran na kapljicama za testiranje inhibicije enzima
Mikrobioreaktori	Staklo – staklo	Dugoročno kultiviranje hepatocita štakora
	Staklo - PDMS	Kemotaktične komore za proučavanje recipročnih radnji između neutrofila i monocita
		Kultiviranje stanica uz kontrolu dinamike signaliranja pojedinačnih stanica kvasca
		Protočni mikroreaktor za enzimsku biosintezu
		Šaržna i kontinuirana fermentacija mikroorganizama
		Modeliranje rasta bakterija i quorum sensing
Kemostat za kultivaciju i nadziranje bakterijskih populacija		

	Bazirani na PDMS	Proučavanje dinamičke regulacije mezodermalne predanosti u ljudskim pluripotentnim matičnim stanicama
		Kultivacija stanica sisavaca za paralelnu analizu učinaka mikroekoloških znakova
		Prianjanje stanica raka dojke na mikrotočni endotel
		Rast i odvajanje ghlivičnih biofilmova
	PDMS - PMMA	Kultivacija mikrobnih stanica sa integriranim sensorima
Bazirani na PMMA	Imobilizacija enzima za amperometrijsko određivanje	
	Mikroprotočni sustav s više ulaza sposoban za doziranje supstrata koji se koristi za istraživanje enzimskih reakcija	
Analitički mikroprotočni sustav	Bazirano na PDMS	Proučavanje minimuma inhibitorske koncentracije antibiotika protiv bakterija
		Odvajanje bakterija od ljudskih krvnih stanica
		Određivanje lokalne hidroksid elektro-koncentracije dobivene lizom ljudskih stanica
	Bazirano na papiru	Biosenzor luminiscencije za određivanje glukoze i mokraćne kiseline
		Odjeljivanje krvi

2.2. EUTEKTIČKA OTAPALA

Potruga za novim i sofisticiranim materijalima koji zadovoljavaju potrebe modernog doba i za održive eko-efikasne procese, podigla je eutektička otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DES) na istaknuto mjesto. Istraživanje usmjereno na korištenje ovih otapala - vrlo povoljnih u ekonomskom, praktičnom i ekološkom smislu - za stvaranje inovativnih materijala brzo raste. Mbous i sur. (2016) govore o korištenju DES-a kao vrijednom alternativom za prevladavanje ograničenja konvencionalnih otapala, pa čak i ionskih tekućina. DES-ovi su dokazali da nude veliki broj mogućnosti primjene i otvorili su nove perspektive za proizvodnju novih i rafiniranih materijala (Tomé i sur., 2018).

Eutektički sustav predstavlja mješavinu komponenti koje na temelju specifičnih omjera imaju najnižu točku taljenja. Kao što je vidljivo iz faznog dijagrama prikazanog na slici 4, odnos temperature i komponentata su dvije glavne odrednice u binarnom eutektičkom sustavu. Ove komponente međusobno djeluju putem intermolekularnih sila, ali ne kroz kovalentnu ili ionsku vezu. U teoriji, uključivanje drugih molekula komponenti delokalizira komponente molekularne rešetke, uzrokujući sniženje točke taljenja odgovarajuće eutektičke smjese. U usporedbi s kovalentnom ili ionskom vezom u kemijskim entitetima, kao što su ionske tekućine, na eutektičku smjesu s niskom termodinamičkom stabilnošću obično utječe geometrija i kemijsko okruženje i može doći do disocijacije na pojedinačne tvari. Zahvaljujući tom termodinamičkom prijelazu, postojanje eutektičkog stanja nije lako prepoznati u prirodnim materijalima, što može objasniti zašto je to relativno slabo zastupljena tema u istraživanju prirodnih otapala. Klasični primjeri eutektičkog fenomena su med i sirup, koji predstavljaju smjesu različitih šećera koji su jako viskozni mediji na sobnoj temperaturi. Koriste se stotinama godina kao dodatak prehrani i kao sastojci za tradicionalne medicinske preparate. Drugi istaknuti primjer je mješavina dvaju krutina mentola i kamfora, koji mogu tvoriti eutektičnu tekućinu koja se koristi kao sredstvo za otapanje lijekova (Liu i sur., 2018).



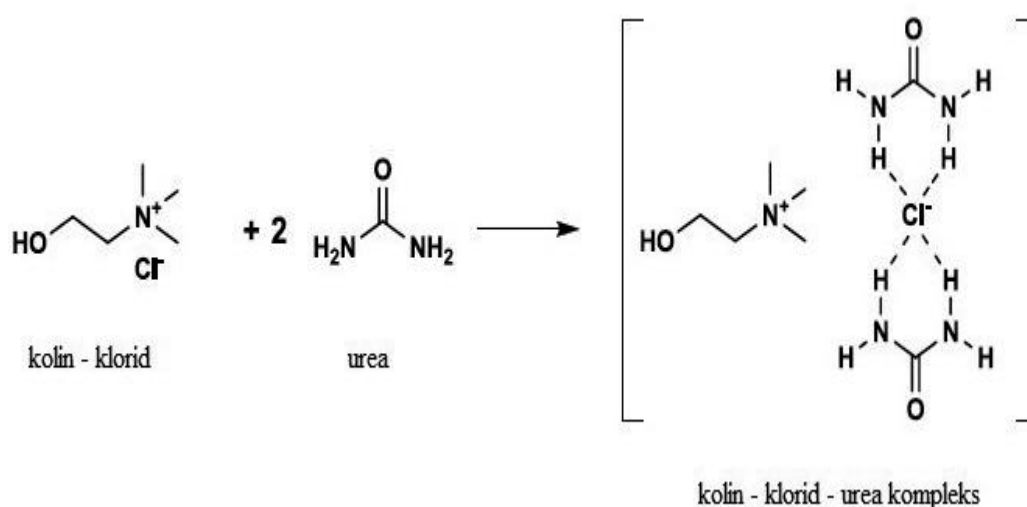
Slika 4. Shematski prikaz eutektičke točke na dvokomponentnoj (1 i 2) fazi.

Na slici 4, EC označava eutektičku komponentu. Isprekidana krivulja predstavlja točke taljenja binarne obitelji NADES pod različitim molarnim omjerima. Svi ujedinjeni tekući mediji nalaze se u A. B i C predstavljaju smjese EC1 i EC2 (krutina/tekućina ili tekućina/krutina), a D je smjesa EC1 i EC2 (krutina/krutina). Eutektička točka je posebna po tome što se dva ili više spojeva mogu kombinirati u preciznim i nasumičnim razmjerima da bi postali međusobno kompatibilni na način koji bi dramatično smanjio točku taljenja smjese (Liu i sur., 2018).

2.2.1. Priprava eutektičkih otapala

Za razliku od ostalih generacija ionskih kapljevina, priprava eutektičkih otapala je jednostavnija i ekonomičnija te se mogu pripremiti na više načina: iz koncentrirane vodene otopine koja sadrži svaku komponentu, iz otopine jedne komponente u kojoj je druga disocirana ili iz krute mješavine dviju komponenti koje se zagrijavaju do unaprijed određene vrijednosti temperature (slika 5). Kod priprave ovih otapala ne dolazi do kemijske reakcije već se komponente povezuju vodikovim vezama tvoreći eutektičko otapalo. S aspekta zelene kemije važno je spomenuti da je priprava ovih otapala održivi proces koji se ostvaruje sa 100 %-tnom atomskom učinkovitošću (svi atomi supstrata se ugrađuju u produkt) pri čemu se ne

stvara otpad. Najčešće se pripremaju postupkom blagog zagrijavanja gdje se točno određena masa komponenata izvaže te se s ili bez dodatka vode zagrijava uz miješanje na temperaturi do $T = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, kroz vrijeme od $t = 30$ do 240 min dok se ne formira bistra tekućina. Molarni omjer komponenata i temperatura taljenja ovisi o kemijskoj prirodi komponenata eutektičkog otapala. Vrijeme potrebno za dobivanje tekućeg otapala iz krutih i tekućih komponenata također varira te se ono mijenja s obzirom na tip komponenata i udio vode unutar otapala. Za pripremu otapala koje sadrži tekući glicerol bilo je potrebno od 30 do 45 min, ovisno o udjelu vode. U slučaju ostalih otapala koja sadrže čvrste komponente potrebno je manje vremena (u prosjeku 1-1,5 h) za pripremu eutektičkih otapala koji sadrže 50 % vode u usporedbi s onima koji sadrže 10 % vode (prosjek 2-3 h). Otapala istog kemijskog profila mogu se dobiti vakuum upravljanjem gdje se komponente prvo otapaju u vodi, a potom se voda uklanja uparavanjem na $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomoću vakuum rotacionog uparivača do postizanja konstantne mase. Također, jedan od novijih načina pripreme uključuje primjenu ultrazvuka ili mikrovalnog zračenja te također njihovu istovremenu uporabu (Cvjetko Bubalo i sur., 2016).



Slika 5. Predložena shema kojom nastaje eutektičko otapalo $\text{ChCl} : \text{urea}$ (1:2) (Cvjetko Bubalo i sur., 2016).

2.2.2. Primjena DES-ova u biotehnološkim procesima

Postoji velik broj publikacija koji govori o raznolikom potencijalu primjene eutektičkih otapala u biotehnološkim procesima. Zamani i Khosropour (2016) su pokazali nove postupke za sintezu 3-aminoheksahidroksumarina uz pomoć lako upotrebljivih polaznih materijala i standardnih, komercijalno dostupnih reagensa. Njihov rad dokumentira prvu visoko-účinkovitu četvero-komponentnu sintezu 3-aminoheksahidroksumarina izravno iz hipuričnih kiselina, aril aldehida, anhidrida octene kiseline i dimedona/cikloheksan-1,3-diona. Ova reakcija je prva protočna metodologija opisana korištenjem prirodnih eutektičkih otapala (*eng. Natural Deep Eutectic Solvents, NADES*) kao netoksičnog i zelenog otapala i katalizatora u usporedbi s uobičajenim isparljivim organskim spojevima.

Biodizel kao alternativno gorivo posljednjih je godina privuklo značajnu pozornost. Unatoč tome, jedan značajan nedostatak su komplicirane komponente biodizela i poteškoće u pročišćavanju proizvoda biodizela. Glicerol je jedna od najznačajnijih komponenti koja utječe na kvalitetu biodizela. (Tang i sur., 2015). Hayyan i sur. (2010) su ekstrahirali glicerol iz biodizela na bazi palminog ulja koristeći ChCl /glicerol DES. Skupina je ispitala učinke DES/biodizela i DES sastava na učinkovitost postupka ekstrakcije. Istraživanja su pokazala održivost tehnike odvajanja s optimalnim molarnim omjerom DES/biodizel od 1:1 i DES molarnim sastavom od 1:1 (ChCl /glicerol). Nakon pročišćavanja biodizel je ispunio standardne specifikacije za biodizelsko gorivo u smislu sadržaja glicerola.

Park i sur. (2014), su u svom istraživanju ekstrakcije klorogenih i kofeinskih kiselina iz *Herbe Artemisiae Scopariae* koristeći DES kao kootapalo, izvijestili o povećanju od 177 % u odnosu na 138 % količine dobivene od Han i sur. (2009), koji su kao otapalo koristili smjesu metanola i vode (60:40, v/v). Sposobnost dizajniranja DES-ova s različitim topljivostima je velika prednost u tome što se, hipotetski, mogu promatrati kao univerzalno otapalo s obzirom na njihov očekivani široki raspon polariteta. Ove su studije ukazale na ključne čimbenike koji imaju značajan utjecaj na ekstrakcijske postupke temeljene na DES-u (Mbous i sur., 2016).

Zeng i sur. (2014) postigli su pročišćavanje proteina (goveđi serumski albumin) u raznim uzorcima pomoću DES-ova u dvofaznom vodenom sustavu. Migracija proteina u fazu DES pripisana je hidrofobnim interakcijama, učinku isušivanja i mreži vodikove veze.

Radošević i sur. (2016) ekstrahirali su fenolne spojeve iz koštice grožđa pomoću kolin-klorid : glukoza, kolin-klorid : fruktoza, kolin-klorid : ksilen, kolin-klorid : glicerol i kolin-klorid : jabučna kiselina sustava NADES-a i dobivene količine su usporedive s frakcijama dobivenim korištenjem vodene otopine metanola (metanol/voda (70:30), v/v).

Aromatski ugljikovodici osnovni su materijali u kemijskoj industriji i široko se primjenjuju u proizvodnji vlakana, plastike, pesticida, lijekova, konzervansa, eksploziva itd. S druge strane, većina aromatskih ugljikovodika šteti ljudskom zdravlju. Sa stajališta ljudskog zdravlja, korisno je ukloniti sve aromatske ugljikovodike iz kemijskih proizvoda ili smanjiti količinu aromatskih ugljikovodika (Tang i sur., 2015). Pang i sur. (2012) koristili su amonijeve soli za odvajanje fenola od ulja formiranjem DES i utvrdili da je ChCl posebno prikladan za formiranje DES-a za odvajanje fenola (fenola i krezola) od ulja (heksan, toluen i p-ksilen).

2.3. VODENI DVOFAZNI SUSTAVI

2.3.1. Općenito

Vodeni dvofazni sustavi (eng. *Aqueous two-phase system*, ATPS) općenito se ne smatraju tehnikama tekuće mikro-ekstrakcije, budući da se obično koriste obilni volumeni ekstrakcijskih otapala. Nekonvencionalna otapala kao što su IL i DES imaju široku primjenu kao ekstrakcijska otapala u ATPS-u. ATPS je prvi put predložio Albertsson 1958. kao metodu koja može učinkovito odvojiti i pročititi biološke molekule kao što su proteini, enzimi i stanice. U uobičajenim ATPS postupcima, formiraju se dvije faze miješanjem dviju otopljenih tvari koje se miješaju s vodom, koje se međusobno ne miješaju iznad kritičnih koncentracija. Tipične smjese se sastoje od dva polimera ili soli, ili kombinacije polimera i soli. Budući da se u sustavu ne koriste hlapljivi organski spojevi, postupak se općenito smatra ekološki prihvatljivim (An i sur., 2017).

Iznad kritičnih koncentracija tih komponenti, spontano razdvajanje faza odvija se sa svakom od dvije rezultirajuće faze obogaćene s obzirom na jednu od komponenti. ATPS-ovi sadrže tri zone; dvije glavne faze, često razdvojene gustoćom u gornju i donju fazu, te sučelje. Koncentracija vode u ATPS-u kreće se od 65 % do 90 %, čime se osigurava blaga okolina za ekstrakciju. Koncentracija vode iznad 70 % stvara nisku napetost na površini, nezapaljive, blago toksične sustave koji su sigurni za okoliš. Alternativni dvofazni sustavi mogu se dobiti

korištenjem surfaktanata, micelarnih spojeva ili ionskih tekućina. Vodeni dvofazni sustavi smatrani su tehnikom kompetitivne razdiobe zbog kratkog vremena procesa, niske viskoznosti, malog formiranja emulzije, visoke učinkovitosti ekstrakcije i niske potrošnje energije (Jurinjak Tušek i sur., 2018).

ATPS predstavlja mogućnost primjene koncepta ekstrakcije tekuće-tekuće od klasičnog kemijskog inženjerstva do pročišćavanja bioloških proizvoda. Prisutnost organskih otapala i/ili procesnih uvjeta (visoka temperatura ili tlak) često isključuje korištenje ekstrakcije tekuće-tekuće koja može oštetiti biološke proizvode. Međutim, ATPS se može formirati upotrebom biorazgradivih i bio-kompatibilnih komponenti (polimera i soli) u blagom vodenom okruženju (Grilo i sur., 2014).

2.3.2. Vodeni dvofazni sustavi s DES-om

U vodenim dvofaznim sustavima, hidrofobne ionske tekućine (eng. *Ionic liquid*, IL) se koriste kao separatori faza ili s vodom ili s vodenom otopinom polimera. Ionske tekućine se koriste u vodenim bifaznim sustavima za podešavanje fizikalno-kemijskih svojstava ABS-a (eng. *Aqueous Biphasic System*, ABS). Korištenjem ABS-a s IL-om osiguran je mnogo širi hidrofilni-lipofilni raspon, što omogućuje opsežnije i selektivnije odvajanje (Jurinjak Tušek i sur., 2018).

Nedostaci kao što su poteškoće sa sintezom, visoka cijena i toksičnost određenih ionskih tekućina su ograničili širi razvoj mnogih primjena, kao što su prehrambena i farmaceutska industrija. Kako bi se prevladali ovi nedostaci, pojavila su se brojna duboka eutektička otapala (DES) koja su naslijedila prednosti ionskih tekućina, ali također imaju i neke razlikovne značajke, uključujući jednostavnost pripreme miješanjem, niže troškove i vrijednost u industrijskoj primjeni (Zhang i sur., 2018a).

Zbog očiglednih prednosti u odnosu na druge sustave ekstrakcije tekuće-tekuće, ABS-ovi bazirani na DES-u razvijaju se brzim tempom (Xu i sur., 2019). Zhang i sur. (2018b) proučavali su niz ABS-ova sastavljenih od DES-a i nekoliko novih vrsta soli za podjelu triju pigmentata. Farias i sur. (2017) su istražili mogućnost očuvanja stehiometrije DES u ternarnim ABS-ovima i njihovu potencijalnu primjenu u odvajanju različitih biomolekula. Xu i sur. (2018) razvili su nove ABS-ove bazirane na DES-u i IL-u kako bi učinkovito izdvojili DNA.

Xu i sur. (2019) su dokazali da su ABS-ovi bazirani na DES-u učinkoviti u razdvajanju biomolekula. U njihovom radu, sintetiziran je niz DES-ova i spojen s ABS-om za ekstrakciju lizozima. Dosad su ABS-ovi bazirani na DES-u zauzeli važno mjesto u polju razdvajanja (Xu i sur., 2019).

2.3.3. Primjena vodenih dvofaznih sustava u mikroreaktoru

Ekstrakcija tekuće-tekuće ima važnu ulogu u odvajanju i pročišćavanju tvari. Minijaturni procesi ekstrakcije bazirani na mikro-protoku dobivaju sve veću pozornost za primjenu u područjima kao što su pročišćavanje u malim količinama, fina kemijska sinteza i brza analiza kemijskih i bioloških uzoraka (Wang i Luo 2017).

Izvorno istraživanje o korištenju ATPS-a za odvajanje stanica proveden je prije 50 godina u kojem je pokazana podjela bakterija i staničnih fragmenata. Od tada se pokazalo da je ATPS učinkovit u razdvajanju eritrocita na temelju dobi i vrsti. ATPS je također korišten za analizu svojstava površinskih naboja krvnih stanica i frakcioniranje podtipova leukocita. ATPS se pokazao korisnim u mikroprotočnim uređajima za odvajanje agregata biljnih stanica, živih/mrtvih stanica jajnika kineskog hrčka s djelotvornošću frakcioniranja do 97 %, i za pročišćavanje proteina (SooHoo i Walker, 2008).

Zhang i sur. (2018c) su u svom istraživanju predstavili novi 3D mikroreaktor s povratnim tokom za ekstrakciju i odvajanje Co iz otopine Ni sulfata. Utvrđeno je da je ovaj mikroreaktor vrlo učinkovit u procesima ekstrakcije i razdvajanja tekuće-tekuće i dopušta korištenje širokog raspona protoka do 9 l h^{-1} . S visokim brzinama protoka vrijeme zadržavanja može se svesti na najmanju moguću mjeru kako bi se postigla visoka propusnost bez smanjenja učinkovitosti ekstrakcije i separacije.

Imanishi i sur. (2018) su radili na višefaznom protoku faznog razdvajanja pomoću vodenog dvofaznog sustava miješane otopine polietilen glikola/dekstrana, gdje su razvili metodu kojom se generiraju dvofazne odjeljive miješane otopine kao što su vodeno-hidrofilno-hidrofobna organska ternarna miješana otopina, ionska tekuće-vodena otopina, fluorokarbon-hidrokarbonska organska miješana otopina itd.

Vobecká i sur. (2018) su radili na optimizaciji vodenih dvofaznih sustava za proizvodnju 6-aminopenicilanske kiseline u integriranim mikroprotočnim reaktorima-separatorima.

Novak i sur. (2015) su radili eksperimentalna istraživanja i modeliranje dvofazne ekstrakcije α -amilaze u vodi u mikroprotočnom uređaju. Polietilen glikol (PEG)/fosfatni vodeni dvofazni sustav korišten je za kontinuiranu ekstrakciju α -amilaze unutar staklenih mikrofluidnih čipova s Y- i Ψ -razgranatim kanalima ulaza i izlaza. Uspostavljanjem stabilnih paralelnih protoka sa sučeljima na mjestu spojeva ulaznih/izlaznih kanala postignuto je odvajanje faza na izlazu mikrofluidnih uređaja.

Li i sur. (2018) su radili na intenziviranju dvofaznog prijenosa mase tekuće-tekuće u kapilarnom mikroreaktorskom sustavu koristeći prikladnu strategiju koja je razvijena sužavanjem ulaznog kanala T-mikromiksera ili dodavanjem pregrada u kapilaru.

Tsukamoto i sur. (2009) su stvorili vodeni dvofazni laminarni tok u mikrofluidnom čipu i koristili su sustav za izoliranje stanica leukocita i eritrocita iz cijelih krvnih stanica. Mikrofluidni sustav smanjio je utjecaj gravitacije u vodenom dvofaznom sustavu (ATPS). Navedeni mikrofluidni čip za odvajanje cijelih krvnih stanica može se učinkovito integrirati u Micro Total Analysis sustav dizajniran za kliničku, forenzičku i ekološku analizu.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

- sušeni list mente (*Mentha x piperita*), Suban, Strmec, Hrvatska
- sušeni list melise (*Melissa officinalis*), Suban, Strmec, Hrvatska

3.1.2. Otapala i reagensi

- 3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina (galna kiselina, $C_6H_2(OH)_3COOH$), 98 %, AcrosOrganics, SAD
- citrat ($C_6H_5O_7^{3-}$), Merck, Njemačka
- etilen glikol ($C_2H_6O_2$), Gram-Mol d. o. o., Hrvatska
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Hrvatska
- glicerol ($C_3H_8O_3$), Sigma Aldrich, Švicarska
- glukoza ($C_6H_{12}O_6$), Fisher, UK
- kalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4), J.T.Baker, Nizozemska
- kolin klorid ($C_5H_{14}ClNO$), Merck, Njemačka
- natrijev karbonat (Na_2CO_3), Gram-Mol d.o.o., Hrvatska

Oprema i uređaji

- analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- centrifuga (Hettich Universal 320R, Njemačka)
- kamera(AM2111, Dino-Lite, SAD)
- klipne pumpe (NE-1000 Syringe Pump, New Era Pump Systems, SAD)
- magnetska miješalica (Heidolph Instruments, Njemačka)
- mikroreaktori (Micronit Microfluidics BV, Nizozemska)
- mikroskop (B1 Series, Motic electric Group Co., Kina)
- pH metar (Jenco 601A, SAD)
- spektrofotometar (Biochrom Libra S12, Engleska)
- termostatirana mješalica (MRClab, UK)
- uljna-vodena kupelj s integriranom miješalicom (HBR 4 digital, IKA-Werke, Njemačka)
- vorteks (Biosan Vortex V1 Plus, Latvija)

Programski paketi

- Microsoft Office Excel 2016, Microsoft Corporation, SAD
- Statistica 13.0, StatSoft, SAD
- Wolfram Mathematica 10.0, Wolfram Research, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Priprava eutektičnih otapala

Za potrebe ovog rada eutektična su otapala pripravljena u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Sve kemikalije korištene za pripremu eutektičkih otapala sušene su visokom vakuumu prije uporabe.

U tikvici sa okruglim dnom pomiješane su određene količine kolin-klorida i citratne kiseline, odnosno kolin-klorida i etilen-glikola, kolin-klorida i glicerola te kolin-klorida i glukoze u molarnim omjerima prikazanim u tablici 5. Tako pripremljena smjesa se zagrijava do $T = 50$ °C na magnetskoj miješalici tijekom $t = 2$ h koliko je potrebno da nastane homogena, prozirna i bezbojna kapljevinna. Eutektička je otapala potrebno zaštititi parafilmom i čuvati na tamnom mjestu.

Tablica 5. Sintetizirana eutektička otapala

Eutektično otapalo	Kratica	Molarni omjer komponenti
kolin-klorid : citrat	ChCit	1:1
kolin-klorid : etilen-glikol	ChEg	1:2
kolin-klorid : glicerol	ChGly	1:2
kolin-klorid : glukoza	ChGlc	1:1

3.2.2. Karakterizacija komponenata vodenog dvofaznog sustava s eutektičnim otapalima

3.2.2.1. Određivanje gustoće

Gustoća eutektičnih otapala i otopine kalijevog hidrogen fosfata određena je pomoću piknometra – staklene posude koja se sastoji od bočice poznatog volumena ($V = 2 \text{ mL}$) i čepa s cjevčicom u sredini kroz koju izlazi višak tekućine da bi u njemu ostao točno poznati volumen mjerene tekućine. Masa praznog i čistog piknometra se odredila vaganjem na analitičkoj vagi nakon čega je napunjen odabranim eutektičnim otapalom ili otopinom kalijevog hidrogen fosfata i ponovo izvagan. Potom se gustoća može izračunati prema sljedećoj relaciji (jednadžba 7):

$$\rho_{DES} = \frac{m_{pik+DES} - m_{pik}}{V_{pik}} \quad [7]$$

3.2.2.2. Određivanje viskoznosti

Viskoznost eutektičnih otapala i otopine kalijevog hidrogen fosfata određena je Ostwaldovim (kapilarnim) viskozimetrom. Metoda se temelji na mjerenju vremena potrebnog da određeni volumen ispitivane tekućine protekne kroz kapilaru pod utjecajem gravitacijske sile. Viskozimetar je napunjen tekućinom te je štopericom mjereno vrijeme za koje je razina tekućine stigla od točke A do točke B. Najprije je provedeno mjerenje za destiliranu vodu, a nakon toga i za analizirane uzorke. Za računanje dinamičke viskoznosti analiziranih uzoraka korištena je sljedeći izraz (jednadžba 8):

$$\eta_{DES} = \eta_{H_2O} \frac{t_{DES} \cdot \rho_{DES}}{t_{H_2O} \cdot \rho_{H_2O}} \quad [8]$$

gdje su:

η_{DES}, η_{H_2O} – dinamička viskoznost eutektičkog otapala i vode, Pas

t_{DES}, t_{H_2O} – vrijeme protjecanja eutektičkog otapala i vode, s

ρ_{DES}, ρ_{H_2O} – gustoća eutektičkog otapala i vode, kg m^{-3}

3.2.3. Ekstrakcija polifenola u makroekstratoru (šaržni pokus)-odabir DESa

U Falcon epruvetu volumena $V = 15$ mL doda se $m = 1,3$ g DES-a te $V = 2$ mL vodene otopine K_2HPO_4 koncentracije $\gamma = 0,9$ g mL⁻¹ i galne kiseline koncentracije $\gamma = 80$ g L⁻¹. Smjesa se miješa kroz $t = 20$ min pri brzini miješanja od $rpm = 2000$ min⁻¹ u termostatiranoj miješalici na temperaturi od $T = 25$ °C. Uzorci se nakon toga centrifugiraju na $rpm = 3000$ min⁻¹ kroz $t = 5$ min. Nakon ekstrakcije bilježi se volumen gornje i donje faze te se određuje koncentracija polifenola u obje faze. Uzorak se uzima iglom iz gornje i donje faze kako bi se spriječilo miješanje faza. Na temelju dobivenih vrijednosti koncentracija određuje se omjer volumena faza (R), koeficijent razdiobe (K) i učinkovitost ekstrakcije (E) prema slijedećim formulama.

Omjer volumena faza (R) određuje se kao omjer volumena gornje i donje faze prema izrazu (jednadžba 9):

$$R = \frac{V(\text{gornja faza})}{V(\text{donja faza})} \quad [9]$$

Koeficijent razdiobe (K) određuje se omjer koncentracija polifenola u gornjoj i donjoj fazi prema izrazu (jednadžba 10):

$$K = \frac{\gamma(\text{polifenoli, gornja faza})}{\gamma(\text{polifenoli, donja faza})} \quad [10]$$

Učinkovitost ekstrakcije (E) se određuje uzimajući u obzir koncentracije polifenola u gornjoj i donjoj fazi prema izrazu (jednadžba 11):

$$E = \frac{\gamma(\text{polifenoli, gornja f.}) \cdot V(\text{gornja f.})}{\gamma(\text{polifenoli, gornja f.}) \cdot V(\text{gornja f.}) + \gamma(\text{polifenoli, donja f.}) \cdot V(\text{donja f.})} \quad [11]$$

DES za nastavak istraživanja odabire se na temelju postignute učinkovitosti ekstrakcije.

3.2.4. Optimiranje uvjeta ekstrakcije u makroekstratoru metodom odzivnih površina

U Falcon epruvetu volumena $V = 15$ mL doda se određena masa DES-a (prema dizajnu eksperimenta, tablica 6) te $V = 2$ mL vodene otopine K_2HPO_4 određene koncentracije (prema dizajnu eksperimenta, tablica 6) i galne kiseline određene koncentracije (prema dizajnu

eksperimenta, tablica 6). Smjesa se miješa kroz vrijeme prema dizajnu eksperimenta na brzini miješanja od $rpm = 2000 \text{ min}^{-1}$ u termostatoranoj miješalici na temperaturi prema dizajnu eksperimenta. Uzorci se nakon toga centrifugiraju na $rpm = 3000 \text{ min}^{-1}$ kroz $t = 5 \text{ min}$. Nakon ekstrakcije bilježi se volumen gornje i donje faze te se određuje koncentracija polifenola u obje faze. Uzorak se uzima iglom iz gornje i donje faze kako bi se spriječilo miješanje faza. Na temelju dobivenih vrijednosti koncentracija određuje se omjer volumena faza (R), koeficijent razdiobe (K) i učinkovitost ekstrakcije (E) prema već nađenim formulama.

Ispitan je utjecaj 5 ulaznih veličina na tri razine na učinkovitost ekstrakcije polifenola u vodenom dvofaznom sustavu s DES-om (tablica 6):

1. masa DES-a od $m = 1 \text{ g}$ do $m = 1,5 \text{ g}$
2. koncentracija K_2HPO_4 od $\gamma = 0,85 \text{ g mL}^{-1}$ do $\gamma = 1,05 \text{ g mL}^{-1}$
3. vrijeme ekstrakcije od $t = 5 \text{ min}$ do $t = 25 \text{ min}$
4. temperatura ekstrakcije od $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ do $T = 70 \text{ }^\circ\text{C}$
5. koncentracija polifenola od $\gamma = 20 \text{ mg L}^{-1}$ do $\gamma = 100 \text{ mg L}^{-1}$

Tablica 6. Dizajn eksperimenata prema metodi Box-Benhken.

Eksperiment	m(DES) /g	$\gamma (\text{K}_2\text{HPO}_4) / \text{g mL}^{-1}$	t / min	$T / \text{ }^\circ\text{C}$	$\gamma (\text{galna}) / \text{g mL}^{-1}$
1	1,00 (-1)	0,85 (-1)	15 (0)	50 (0)	60 (0)
2	1,50 (1)	0,85 (-1)	15 (0)	50 (0)	60 (0)
3	1,00 (-1)	1,50 (1)	15 (0)	50 (0)	60 (0)
4	1,50 (1)	1,50 (1)	15 (0)	50 (0)	60 (0)
5	1,25 (0)	0,95 (0)	5 (-1)	30 (-1)	60 (0)
6	1,25 (0)	0,95 (0)	25 (1)	30 (-1)	60 (0)
7	1,25 (0)	0,95 (0)	5 (-1)	70 (1)	60 (0)
8	1,25 (0)	0,95 (0)	25 (1)	70 (1)	60 (0)
9	1,25 (0)	0,85 (-1)	15 (0)	50 (0)	20 (-1)
10	1,25 (0)	1,50 (1)	15 (0)	50 (0)	20 (-1)
11	1,25 (0)	0,85 (-1)	15 (0)	50 (0)	100 (1)
12	1,25 (0)	1,50 (1)	15 (0)	50 (0)	100 (1)
13	1,00 (-1)	0,95 (0)	5 (-1)	50 (0)	60(0)
14	1,50 (1)	0,95 (0)	5 (-1)	50 (0)	60 (0)
15	1,00 (-1)	0,95 (0)	25 (1)	50 (0)	60 (0)
16	1,50 (1)	0,95 (0)	25 (1)	50 (0)	60 (0)
17	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	30 (0)	20 (-1)
18	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	70 (1)	20 (-1)

19	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	30 (-1)	100 (1)
20	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	70 (1)	100 (1)
21	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)
22	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)
23	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)
24	1,25 (0)	0,85 (-1)	5 (-1)	50 (0)	60 (0)
25	1,25 (0)	1,50 (1)	5 (-1)	50 (0)	60 (0)
26	1,25 (0)	0,85 (-1)	25 (1)	50 (0)	60 (0)
27	1,25 (0)	1,50 (1)	25 (1)	50 (0)	60 (0)
28	1,00 (-1)	0,95 (0)	15 (0)	30 (-1)	60 (0)
29	1,50 (1)	0,95 (0)	15 (0)	30 (-1)	60 (0)
30	1,00 (-1)	0,95 (0)	15 (0)	70 (1)	60 (0)
31	1,50 (1)	0,95 (0)	15 (0)	70 (1)	60 (0)
32	1,25 (0)	0,95 (0)	5 (-1)	50 (0)	20 (-1)
33	1,25 (0)	0,95 (0)	25 (1)	50 (0)	20 (-1)
34	1,25 (0)	0,95 (0)	5 (-1)	50 (0)	100 (1)
35	1,25 (0)	0,95 (0)	25 (1)	50 (0)	100 (1)
36	1,00 (-1)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	20 (-1)
37	1,50 (1)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	20 (-1)
38	1,00 (-1)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	100 (1)
39	1,50 (1)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	100 (1)
40	1,25 (0)	0,85 (-1)	15 (0)	30 (-1)	60 (0)
41	1,25 (0)	1,50 (1)	15 (0)	30 (-1)	60 (0)
42	1,25 (0)	0,85 (-1)	15 (0)	70 (1)	60 (0)
43	1,25 (0)	1,50 (1)	15 (0)	70 (1)	60 (0)
44	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)
45	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)
46	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)

3.2.5. Priprema vodenih ekstrakata mente i melise

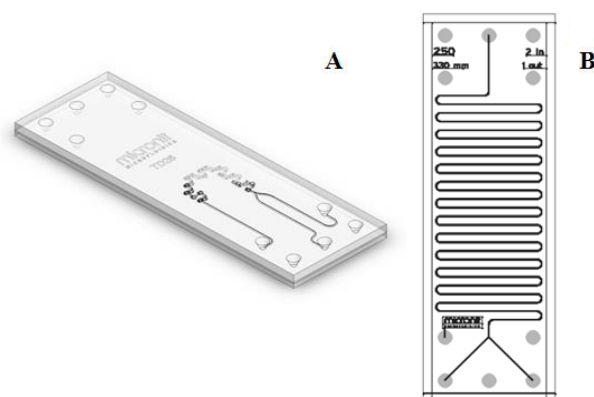
Ekstrakcija biološki aktivnih komponenta bazira se na denaturaciji stanične membrane i otpuštanju molekula s biološkom aktivnošću (Kaushik i sur., 2010). U staklenu čašu volumena $V = 200$ mL odvaži se $m = 1$ g usitnjenog osušenog lista mente (melise) te se prelije s $V = 50$ mL destilirane vode zagrijane na $T = 80$ °C. Pripremljena ekstrakcijska smjesa termostatira se na temperaturi od $T = 80$ °C u uljnoj kupelji pri brzini miješanja od $rpm = 500$ min^{-1} u vremenu od $t = 90$ min. Nakon isteka vremena ekstrakcije, uzorak se profiltrira kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krute faze.

3.2.6. Analiza profila strujanja dvofaznog vodenog sustava s eutektnim otpalom u mikroekstraktorskom sustavu

Provedena je analiza strujanja u mikroekstraktorskom sustavu izvedenom s dva serijski spojena mikroreaktora; prvi mikroreaktor je izveden s mikromješačima, dok je drugi mikroreaktor cijevni izvedenom s dva ulaza i jednim izlazom. Određene su Reynolds-ove značajke za obje faze. Dimenzije korištenih mikroreaktora su prikazane u tablici 7, a struktura na slici 6.

Tablica 7. Dimenzije korištenih mikroreaktora.

oznaka	V/ mm^3	broj i oblik ulaza	broj i oblik izlaza	širina · visina · duljina mikrokanala/ $\mu\text{m} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{mm}$	h.p./ μm
A	2	2 Y	1	200 · 150 · 55,3	1
B	4	2 Y	1	250 · 50 · 330	0



Slika 6. Mikroreaktori upotrijebljeni u pokusima; (A) mikroreaktor volumena $V = 2 \text{ mm}^3$, (B) mikroreaktor volumena $V = 4 \text{ mm}^3$ (dva ulaza i jedan izlaz)

3.2.7. Ekstrakcija polifenola u mikroekstraktor

Mikroreaktorski sustav se sastojao od dva elementa mikroreaktora načinjenih od borosilikatnog stakla spojenih u seriju (slika 7). Prvi mikroreaktor je izveden s mikromješačima, a drugi cijevni s jednim ulazom u dva izlaza u obliku slova „Y“ za izlaz različitih procesnih struja. Mikroreaktorski element je postavljen u nosač od nehrđajućeg čelika (Micronit Microfluidics BV, Nizozemska) koji omogućuje stabilnost sustava i jednostavnije spajanje sa pumpama. Za dovodjenje procesnih struja bile su potrebne dvije pumpe (NE-1000 Syringe Pump, New Era Pump Systems, SAD) sa klipovima od nehrđajućeg čelika (8 cm³, Harvard Apparatus, SAD). Jedna klipna pumpa je služila za uvođenje eutektičnog otapala, a druga za uvođenje vodene faze. Spajanje pumpi sa mikroreaktorskim čipom je izvedeno pomoću silikatnih cjevčica (375 μm O.D., 150 μm I.D., Micronit Microfluidics BV, Nizozemska), a protok fluida u mikrokanalima je praćen pomoću mikroskopa (B1 Series, Motic electric Group Co., Kina) na uvećanju od 40x. Cijeli mikroreaktorski sustav je termostatiran u uljno-vodenoj kupelji (IKA-Werk GmbH & Co. KG, Njemačak). Provedeni su eksperimenti ekstrakcije s modelnom otopinom galne kiseline te s ekstraktima mente i melise pri uvjetima procijenjenim kao optimalnim u šaržnom pokusu.

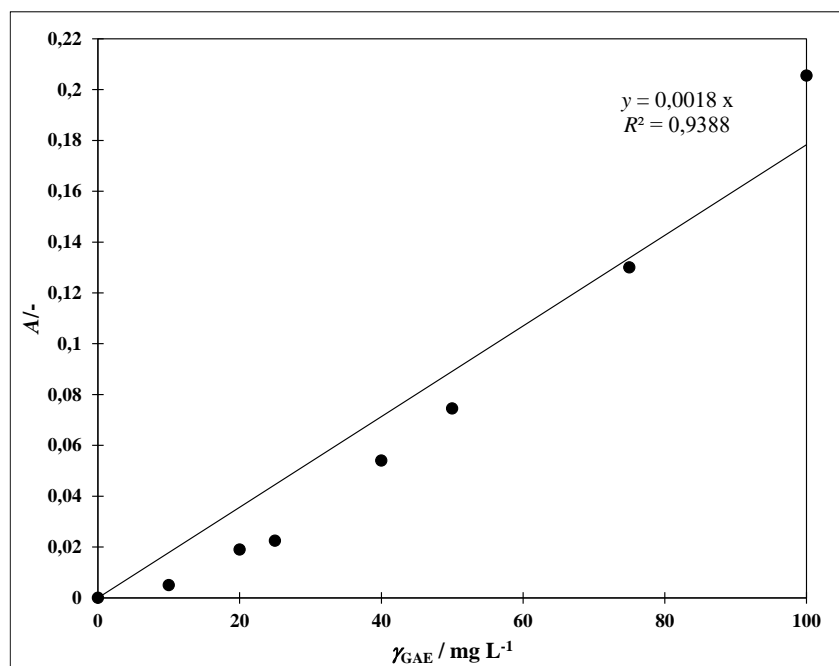


Slika 7. Vlastita fotografija aparature korištene za provedbu procesa ekstrakcije u mikroekstraktoru

3.2.8. Određivanje koncentracije polifenola

Ukupni polifenoli određeni su spektrofotometrijski prema metodi koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida. Intenzitet nastalog plavog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri $\lambda = 765$ nm i proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u uzorku (Pinelo i sur., 2005).

U epruvetu se otpipetira $V = 7,9$ mL destilirane vode, $V = 100$ μ L uzorka, $V = 500$ μ L Folin-Ciocalteu reagensa i $V = 1,5$ mL 20 %-tne otopine Na_2CO_3 . Nakon dodatka 20 %-tne otopine Na_2CO_3 pokreće se reakcija te uzorci stoje 2 h na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra na $\lambda = 765$ nm. Osim uzoraka priprema se i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke samo što umjesto uzorka sadrži $V = 100$ μ L destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Sadržaj ukupnih polifenola u pojedinim uzorcima određen je na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline ($\gamma_{\text{GAE}} = 0 - 100$ mg L⁻¹) (slika 8).



Slika 8. Baždarni pravac za određivanje koncentracije ukupnih polifenola

3.2.9. Statistička analiza i matematičko modeliranje

3.2.9.1. Metoda odzivnih površina za planiranje eksperimenata

Metoda odzivnih površina (eng. *Response surfaces methodology; RSM*) analizira odnose između nekoliko ulaznih varijabli te jedne ili više varijabli odziva. Osnovni motiv za korištenje RSM metode je pronalaženje optimalnih uvjeta za dobivanje optimalnog odziva. Plan eksperimenata za optimiranje uvjeta ekstrakcije polifenola u vodenom dvofaznom sustavu s DES-om izrađen je koristeći Box Behnken eksperimentalni dizajn u programskom paketu Statistica 13.0 (StatSoft, SAD). Ispitan je utjecaj mase eutektičnog otapala, koncentracije kalijevog hidrogen fosfata, vremena ekstrakcije, temperature ekstrakcije i koncentracije galne kiselina na učinkovitost ekstrakcije. Eksperimentalni podaci opisani su polinomom drugog stupnja prema izrazu (jednadžba 12 i 13):

$$y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \dots + \beta_k \cdot x_k + \varepsilon \quad [12]$$

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + \varepsilon \quad [13]$$

gdje Y predstavlja zavisnu varijablu, β_0 , β_i , β_{ii} i β_{ij} regresijski koeficijenti linearnih članova, kvadratnih članova i interakcijskih članova, a X_i i X_j su nezavisne varijable. Parametri modela procijeni su u programskom paketu Statistica 13.0 (StatSoft, SAD).

3.2.9.2. Matematički model ekstrakcije polifenola u mikroekstratoru

Za opis procesa ekstrakcije primijenjen je 2D matematički model koji uključuje konvekciju u smjeru osi (x) i difuziju u dva smjera (x i y) u stacionarnim uvjetima. Matematički model čine parcijalne diferencijalne jednadžbe s pripadajućim rubnim i početnim uvjetima za opis promjene koncentracije polifenola u vodenoj fazi (faza s kalijevim hidrogen fosfatom) i u fazi eutektičnog otapala prema jednadžbama:

- koncentracija polifenola u fazi s kalijevim hidrogen fosfatom (jednadžba 14):

$$\nu \cdot \frac{\partial \gamma_{polifenoli,KHF}}{\partial \xi} = \frac{D_{polifenoli,KHF}}{W} \cdot \left(\frac{\partial^2 \gamma_{polifenoli,KHF}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \gamma_{polifenoli,KHF}}{\partial \psi^2} \right) \quad [14]$$

$$\gamma_{polifenoli,KHF}(0, \psi) = \gamma_{polifenoli,KHF,u} \quad 0 \leq \psi \leq 1$$

$$\frac{\partial \gamma_{polifenoli,KHF}\left(\frac{L}{W}, \psi\right)}{\partial \xi} = 0 \quad 0 \leq \psi \leq 1$$

$$\gamma_{polifenoli,KHF}(\xi, 0) = K_P \cdot \gamma_{polifenoli,DES}(\xi, 0) \quad 0 < \xi < \frac{L}{W}$$

$$\frac{\partial \gamma_{polifenoli,KHF}(\xi, 1)}{\partial \psi} = 0 \quad 0 < \xi < \frac{L}{W}$$

- koncentracija polifenola u fazi s eutektičkim otpalom (jednadžba 15):

$$\nu \cdot \frac{\partial \gamma_{polifenoli,DES}}{\partial \xi} = \frac{D_{polifenoli,DES}}{W} \cdot \left(\frac{\partial^2 \gamma_{polifenoli,DES}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \gamma_{polifenoli,DES}}{\partial \psi^2} \right) \quad [15]$$

$$\gamma_{polifenoli,DES}(0, \psi) = 0 \quad -1 \leq \psi \leq 0$$

$$\frac{\partial \gamma_{polifenoli,DES}\left(\frac{L}{W}, \psi\right)}{\partial \xi} = 0 \quad -1 \leq \psi \leq 0$$

$$\gamma_{polifenoli,DES}(\xi, 0) = \frac{D_{polifenoli,KHF}}{D_{polifenoli,DES}} \cdot \frac{\partial \gamma_{polifenoli,KHF}(\xi, 0)}{\partial \psi} \quad 0 < \xi < \frac{L}{W}$$

$$\frac{\partial \gamma_{polifenoli,DES}(\xi, -1)}{\partial \psi} = 0 \quad 0 < \xi < \frac{L}{W}$$

gdje ν predstavlja srednju providnu linearnu brzinu strujanja, ξ su ψ nezavisne bezdimenzijske varijable $\xi = x/W$, $\psi = y/W$, x i y su koordinate u smjeru duljine (L) i širine mikrokanala ($2W$). $D_{polifenoli,KHF} = 3,440 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ i $D_{polifenoli,DES} = 9,211 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ su koeficijenti difuznosti polifenola u vodenoj fazi (fazi s kalijevim hidrogen fosfatom) i u fazi s eutektičnim otpalom. Koeficijenti molekularne difuzivnosti određeni su primjenom Hyduk-Laudie empirijske korelacije (jednadžba 16):

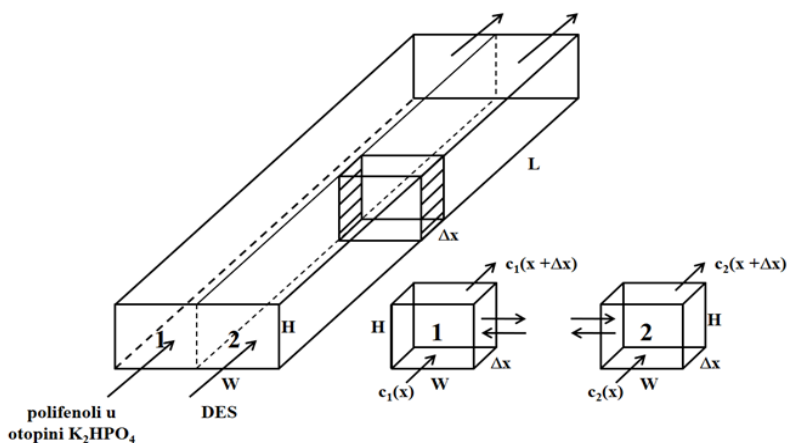
$$D_{\text{polifenoli,KHF(DES)}} = \frac{13,26 \cdot 10^{-9}}{\eta_{\text{KHF(DES)}} \cdot V_{\text{polifenoli}}^{0,589}} \quad [16]$$

gdje $V_{\text{polifenoli}}$ predstavlja molarni volumen galne kiseline kao standard za polifenolne molekule, a η dinamička viskoznost komponenata dvofaznog sustava. Sustav parcijalnih diferencijalnih jednadžbi riješen je uvođenjem pojednostavljenja (jednadžba 17 i 18). Svaka od dvije faze koje se uvode u mikroreaktor opisane su kao zaseban idealni cijevni reaktor u stacionarnom stanju (Slika 9) (Jurinjak Tušek i sur., 2013).

$$v_1 \cdot \frac{\partial c_1}{\partial x} = -\frac{D}{W^2} \cdot (c_2 - c_1) \quad [17]$$

$$v_2 \cdot \frac{\partial c_2}{\partial x} = \frac{D}{W^2} \cdot (c_2 - c_1) \quad [18]$$

Prijenos tvari između faza se odvija difuzijom koja se definira kao kvocijent razlike koncentracija i udaljenosti između dviju odabranih pozicija (1. Fickov zakon).



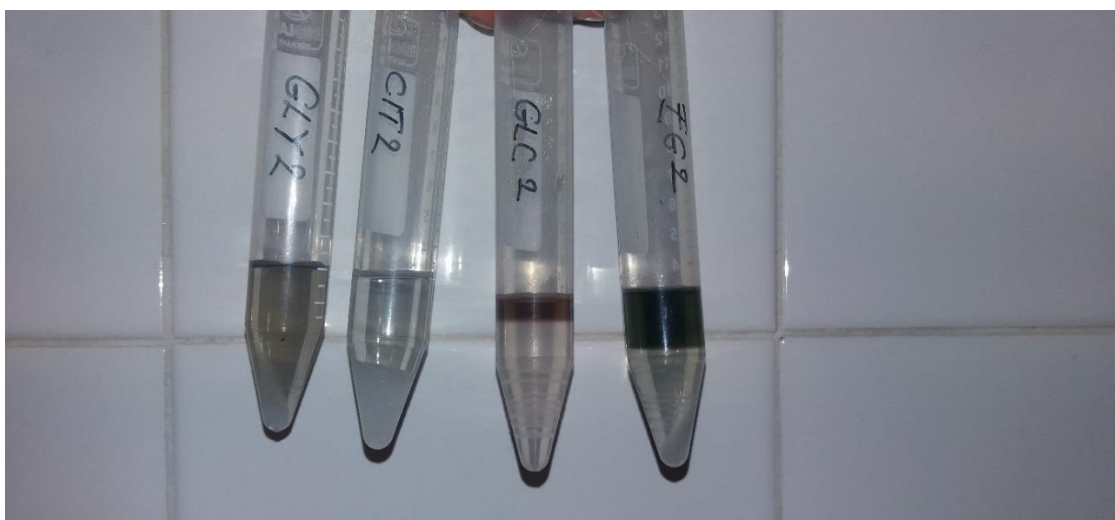
Slika 9. Shematski prikaz dva paralelna idealna cijevna reaktora u koje se uvode voda i eutektičko otapalo (Jurinjak Tušek i sur., 2013)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ODABIR EUTEKTIČKOG OTAPALA ZA PROVEDBU EKSTRAKCIJE

Prva faza eksperimenata bila je odabir eutektičkog otapala za provedbu ekstrakcije. Ispitana je moguća primjena četiri bezvodna eutektička otapala (kolin-klorid : citratna kiselina, kolin-klorid : etilen-glikol, kolin-klorid : glicerol, kolin-klorid : glukoza). Eksperimenti su provedeni tako se smjesa pojedinog DES-a, K_2HPO_4 i galne kiseline miješala na termostatiranoj miješalici pri temperaturi od $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ kroz $t = 20\text{ min}$, nakon čega je slijedilo centrifugiranje na $rpm = 3000\text{ min}^{-1}$. Na slici 10 je prikazana fotografija koja je dobivena nakon centrifugiranja za sve četiri smjese te se vizualnim pregledom može uočiti da je do najboljeg razdvajanja faza došlo kod smjese kolin-klorid : etilen-glikola (na slici označen kao EG2). Nakon odjeljivanja i uzorkovanja faza određeni su koeficijent razdiobe, omjer volumena faza i učinkovitost ekstrakcije (tablica 8). Iz tablice je vidljivo da se koeficijent razdiobe kreće u rangu od $K = 1,488 \pm 0,878$ do $K = 9,646 \pm 0,414$, pri čemu je najviši u iznosu od $K = 9,646 \pm 0,414$ dobiven kod kolin-klorid : etilen-glikola. Najniža vrijednost koeficijenta razdiobe dobivena je za sustav s kolin-klorid : glicerol ($K = 1,488 \pm 0,878$), nakon čega slijede sustavi kolin-klorid : citratna kiselina ($K = 3,934 \pm 0,229$) te sustav kolin-klorid : glukoza ($K = 4,301 \pm 0,433$).

Za slijedeću fazu istraživanja odabran je DES na temelju učinkovitosti ekstrakcije koja se pokazala najviša kod kolin-klorid : etilen-glikola te je iznosila $E = 97,263 \pm 0,843\%$.



Slika 10. Fotografija vodenih dvofaznih sustava s eutektičnim otapalom nakon centrifugiranja.

Prema Zhang i sur. (2016) kada je DES dodan u vodenu otopinu K_2HPO_4 , došlo je do natjecanja prema vodi između DES i soli, gdje je natjecanje dobila sol zbog većeg afiniteta za vodu. Kao rezultat, jedna faza je obogaćena DES-om, a druga se uglavnom sastojala od otopine soli. Obzirom da su u otopinama različiti samo DES-ovi, može se procijeniti njihov utjecaj na razdvajanje faza, a samim time i učinkovitost ekstrakcije.

U okviru rada ispitan je također utjecaj koncentracije soli (K_2HPO_4) u vodenom dvofaznom sustavu na učinkovitost ekstrakcije za sva četiri sustava u rasponu od $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,15 \text{ g mL}^{-1}$ do $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,90 \text{ g mL}^{-1}$. Kao što je vidljivo u tablici 9 kod koncentracija soli ispod $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,30 \text{ g mL}^{-1}$ dvofazni sustav se ne formira te učinkovitost ekstrakcije koja se postiže nije zadovoljavajuća da bi se takav sustav mogao primjenjivati. Zanimljivo je da u slučaju vodenog dvofaznog sustava kolin-klorid : citratna kiselina uočeno da se učinkovitost ekstrakcije ne mijenja značajno promjenom koncentracije soli, tj pri koncentraciji soli od $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,30 \text{ g mL}^{-1}$ postignuta je učinkovitost ekstrakcije od $E = 82,191 \pm 2,765 \%$ dok je pri koncentraciji soli od $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,90 \text{ g mL}^{-1}$ postignuta učinkovitost od $E = 83,111 \pm 0,563 \%$. Najviša učinkovitost je dobivena za sustav kolin-klorid : etilen-glikola pri koncentraciji soli od $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,90 \text{ g mL}^{-1}$. Iako ne postoje radovi koji su se bavili ekstrakcijom polifenola, Li i sur. (2016) su na sličan način provodili ekstrakciju proteina. Prema njihovim navodima viša koncentracija soli smanjila je topljivost proteina u donjoj fazi, tako da su proteini preneseni u gornju fazu, međutim u njihovom istraživanju, učinkovitost ekstrakcije se povećavala povećanjem koncentracije soli samo do određene granice, nakon čega učinkovitost naglo opada. Pretpostavljeno je zbog količine vode koja se smanjuje. U našem slučaju, u granicama koncentracije soli koje smo ispitali, učinkovitost većinom raste povećanjem koncentracije soli.

Tablica 8. Koeficijenti razdiobe i učinkovitost ekstrakcije vodenih dvofaznih sustava s različitim eutektičkim otapalima

Eutektičko otapalo	$\gamma_{\text{GAE,DES}} / \text{mg L}^{-1}$	$\gamma_{\text{GAE, K}_2\text{HPO}_4} / \text{mg L}^{-1}$	$K / -$	$R / -$	$E / \%$
kolin-klorid: citrat	18,161 ± 6,491	61,838 ± 4,915	3,934 ± 0,229	1,167 ± 0,148	92,571 ± 2,379
kolin-klorid: etilenglikol	10,309 ± 1,518	69,690 ± 5,191	9,646 ± 0,414	3,071 ± 0,257	97,263 ± 0,843
kolin-klorid: glicerol	34,549 ± 2,256	45,450 ± 5,564	1,488 ± 0,878	3,500 ± 0,866	28,682 ± 8,971
kolin-klorid: glukoza	64,841 ± 1,183	15,153 ± 1,857	4,301 ± 0,433	2,930 ± 0,236	92,571 ± 0,985

Tablica 9. Utjecaj koncentracije soli na učinkovitost ekstrakcije u vodenim dvofaznim sustavima s eutektičkim otapalom

Eutektičko otapalo	$\gamma_{\text{K}_2\text{HPO}_4} / \text{g mL}^{-1}$	$R / -$	$\gamma_{\text{GAE,DES}} / \text{mg L}^{-1}$	$\gamma_{\text{GAE, K}_2\text{HPO}_4} / \text{mg L}^{-1}$	$K / -$	$E / \%$
kolin-klorid: citrat	0,15	ne formira se dvofazni sustav				
	0,30	4,000	$38,055 \pm 0,393$	$36,667 \pm 0,786$	$1,038 \pm 0,033$	$82,191 \pm 2,765$
	0,50	3,642	$36,111 \pm 5,499$	$34,444 \pm 0,786$	$1,054 \pm 0,184$	$78,838 \pm 5,209$
	0,70	3,089	$44,445 \pm 7,071$	$31,389 \pm 6,678$	$1,424 \pm 0,776$	$81,353 \pm 1,535$
	0,90	2,000	$66,994 \pm 1,178$	$27,224 \pm 1,574$	$2,462 \pm 0,098$	$83,111 \pm 0,563$
kolin-klorid: etilenglikol	0,15	ne formira se dvofazni sustav				
	0,30	ne formira se dvofazni sustav				
	0,50	1,400	$40,611 \pm 5,225$	$27,222 \pm 3,143$	$1,502 \pm 0,018$	$68,511 \pm 1,318$
	0,70	1,450	$62,222 \pm 7,856$	$17,500 \pm 2,749$	$3,635 \pm 1,020$	$84,585 \pm 4,529$
	0,90	1,167	$71,389 \pm 0,393$	$7,222 \pm 1,458$	$9,884 \pm 0,054$	$92,020 \pm 0,404$
kolin-klorid: glicerol	0,15	ne formira se dvofazni sustav				
	0,30	ne formira se dvofazni sustav				
	0,50	2,000	$46,667 \pm 1,571$	$32,778 \pm 3,928$	$1,431 \pm 0,123$	$76,067 \pm 1,186$
	0,70	1,358	$52,222 \pm 1,348$	$35,556 \pm 2,357$	$1,471 \pm 0,053$	$67,703 \pm 0,767$
	0,90	1,118	$72,778 \pm 3,928$	$18,889 \pm 0,785$	$3,861 \pm 0,368$	$81,625 \pm 2,199$
kolin-klorid: glukoza	0,15	ne formira se dvofazni sustav				
	0,30	ne formira se dvofazni sustav				
	0,50	3,428	$44,722 \pm 1,178$	$36,111 \pm 4,714$	$1,249 \pm 0,174$	$80,118 \pm 0,488$
	0,70	1,144	$49,722 \pm 1,855$	$28,944 \pm 3,535$	$2,993 \pm 0,554$	$77,248 \pm 3,268$
	0,90	1,058	$65,277 \pm 3,535$	$21,389 \pm 1,178$	$3,057 \pm 0,031$	$79,359 \pm 0,169$

4.2. Optimiranje uvjeta ekstrakcije galne kiseline u vodenom dvofaznom sustavu s DES-om u makroekstraktor

Nakon što je odabran kolin-klorid : etilen-glikol kao optimalni DES za ekstrakciju slijedilo je optimiranje uvjeta ekstrakcije pomoću metode odzivnih površina u makroekstraktor na temelju šaržnih pokusa. U tablici 10 je prikazano 46 pokusa kojima je ispitan utjecaj mase DES-a u rasponu od $m_{DES} = 1,00$ do $1,50$ g, koncentracije soli u rasponu od $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,85$ do $1,50$ g mL⁻¹, vremena u rasponu od $t = 5$ do 25 min, koncentracije galne kiseline u rasponu od $\gamma_{GAE} = 20$ do 100 mg L⁻¹ i temperature u rasponu od $T = 30$ do 70 °C na učinkovitost ekstrakcije. U ovom radu ispitan je utjecaj pet ulaznih veličina na tri razine na učinkovitost ekstrakcije polifenola u vodenom dvofaznom sustavu s DES-om, za razliku od drugih radova (Xu i sur., 2015; Li i sur., 2016; Zeng i sur., 2014; Zhang i sur., 2016) koji su ispitivali pojedinačne eksperimentalne faktore. Dizajn metode po Box-Benhken-u pružio je prednosti kao što su smanjenje broja eksperimenata koje je bilo potrebno provesti što je rezultiralo nižom potrošnjom reagensa i znatno manje laboratorijskog rada (Ferreira i sur., 2007). Za provedene eksperimente dobivene vrijednosti koeficijenta razdiobe bile su u rasponu od najveći koeficijent razdiobe u iznosu od $K = 2,306 \pm 0,541$ do $K = 20,675 \pm 4,172$, a vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije u rasponu od $E = 67,117$ % do $E = 96,659$ %. Najviši koeficijent razdiobe i najviša učinkovitost ekstrakcije postignuti su pri eksperimentalnim uvjetima mase DES-a $m_{DES} = 1,25$ g, koncentracije soli $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,85$ g mL⁻¹, vremena $t = 15$ min, temperature $T = 50$ °C, koncentracije galne kiseline $\gamma_{GAE} = 20$ mg L⁻¹. S druge pak strane najniži koeficijent razdiobe u iznosu od $K = 2,774 \pm 0,470$ i najniža učinkovitost u iznosu od $E = 2,774 \pm 0,470$ % je postignuta pri eksperimentalnim uvjetima mase DES-a $m_{DES} = 1,00$ g, koncentracije soli $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,95$ g mL⁻¹, vremena $t = 15$ min, temperature $T = 30$ °C, koncentracije galne kiseline $\gamma_{GAE} = 60$ mg L⁻¹.

Analiziran je utjecaj učinka pet neovisnih varijabli, masa DES-a (X_1), koncentracija soli (X_2), vrijeme (X_3), temperatura (X_4) i koncentracija galne kiseline (X_5) i njihov interaktivni odnos sa ovisnom varijablom Y (učinkovitost ekstrakcije polifenola). Polinom drugog stupnja s interakcijskim članovima je upotrijebljen za opis eksperimentalnih podataka. Za predloženi model dobiveno je slaganje između eksperimentalnih vrijednosti i modelom previđenih vrijednosti u iznosu od $R^2 = 0,871$. Prema Le Man i sur. (2010) model se može smatrati primjenjivim ako koeficijent determinacije koji opisuje razliku između eksperimentalnih vrijednosti i modelom previđenih vrijednosti prelazi 0,75. Na temelju te pretpostavke može se

zaključiti da je razvijeni model odzive površine primjenjiv za opis navedenog procesa. Analizom vrijednosti parametra modela odzivne površine (tablica 11) može se uočiti da masa DES-a, koncentracija soli, vrijeme ekstrakcije i temperatura imaju pozitivan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije, tj. njihovim porastom raste učinkovitost ekstrakcije (koeficijenti RSM modela koji dolaze uz navedene varijable imaju pozitivan predznak). S druge pak strane koncentracija galne kiseline ima negativna utjecaj na učinkovitost ekstrakcije (koeficijent RSM modela uz koncentraciju galne kiseline ima negativan predznak). Može se također uočiti da je vrijednost parametra RSM model koja dolazi uz temperaturu signifikantna što znači da ima najvažniji utjecaj na učinkovitost ekstrakcije. Rezultati su također pokazali da je signifikantna vrijednost parametra koji dolazi uz kvadrat koncentracije galne kiseline. Za većinu interakcijskih koeficijenta dobivene su p -vrijednosti veće od 0,05 tj. njihove vrijednosti nisu signifikantne za model pa bi se prema tome model mogao i pojednostaviti redukcijom ne signifikantnih parametra. Također analiza varijance modela (ANOVA) je pokazala da je razvijeni model signifikantan (za $p < 0,05$). Prema Teng i sur. (2011) za svaki parametar modela, visoka vrijednost koeficijenta determinacije i mala p -vrijednost bi značile signifikantan utjecaj analizirane varijable. Statistička analiza je također pokazala da je odstupanje modela (eng. *lack of fit*) nije signifikantno ($p > 0,05$) te da je F -vrijednost za model visoka ($F = 44,842$). Dobiveni rezultati indiciraju pouzdanost razvijenog modela odzivne površine za analizirani raspon ulaznih varijabli. Shafie i sur. (2019) su radili na optimizaciji ekstrakcija pektina iz *Averrhoa bilimbi* s dubokim eutekničnim otapalima (DES), te su koristeći RSM metodu došli do sličnih rezultata, gdje im je također ključna varijabla bila temperatura. Utjecaj temperature su povezali sa točkom topljenja pektina te i sa činjenicom da visoka temperatura ekstrakcije može značajno smanjiti viskoznost otapala za ekstrakciju, povećati difuziju otapala za ekstrakciju i ubrzati prijenos mase ciljanih spojeva.

Tablica 10. Koeficijenti razdiobe i učinkovitosti ekstrakcije prema planu eksperimenata

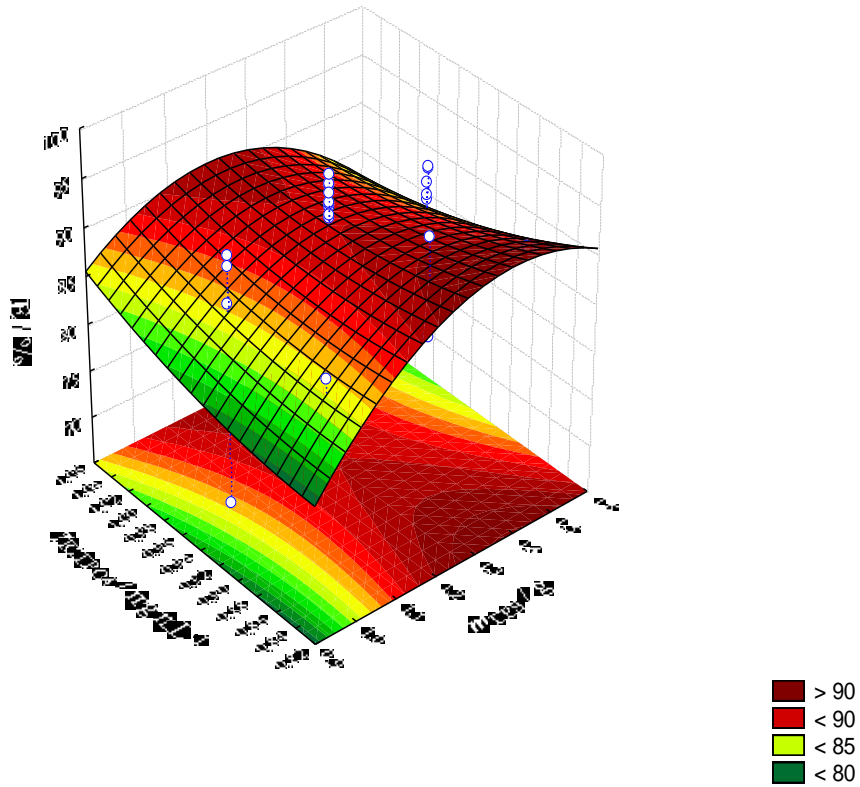
Br. eks.	m_{DES} / g	$\gamma_{K_2HPO_4}$ / g mL ⁻¹	t / min	T / °C	γ_{GAE} / mg L ⁻¹	R / -	K / -	E / %
1	1,00 (-1)	0,85 (-1)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	1,041	6,815 ± 0,587	87,597
2	1,50 (1)	0,85 (-1)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	1,400	7,215 ± 1,624	90,786
3	1,00 (-1)	1,50 (1)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	1,000	7,272 ± 1,799	87,557
4	1,50 (1)	1,50 (1)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	1,400	3,260 ± 1,168	82,029
5	1,25 (0)	0,95 (0)	5 (-1)	30 (-1)	60 (0)	1,000	2,634 ± 0,263	72,463
6	1,25 (0)	0,95 (0)	25 (1)	30 (-1)	60 (0)	1,000	2,306 ± 0,542	69,230
7	1,25 (0)	0,95 (0)	5 (-1)	70 (1)	60 (0)	1,400	13,964 ± 0,656	95,124
8	1,25 (0)	0,95 (0)	25 (1)	70 (1)	60 (0)	1,143	16,518 ± 2,121	94,930
9	1,25 (0)	0,85 (-1)	15 (0)	50 (0)	20 (-1)	1,400	20,675 ± 4,172	96,659
10	1,25 (0)	1,50 (1)	15 (0)	50 (0)	20 (-1)	1,400	7,916 ± 0,648	92,307
11	1,25 (0)	0,85 (-1)	15 (0)	50 (0)	100 (1)	1,500	6,773 ± 0,674	91,005
12	1,25 (0)	1,50 (1)	15 (0)	50 (0)	100 (1)	1,400	8,309 ± 0,303	92,084
13	1,00 (-1)	0,95 (0)	5 (-1)	50 (0)	60(0)	1,000	5,834 ± 0,396	81,938
14	1,50 (1)	0,95 (0)	5 (-1)	50 (0)	60 (0)	1,143	6,925 ± 0,649	88,735
15	1,00 (-1)	0,95 (0)	25 (1)	50 (0)	60 (0)	1,000	8,083 ± 3,653	87,837
16	1,50 (1)	0,95 (0)	25 (1)	50 (0)	60 (0)	1,143	8,055 ± 3,377	89,243
17	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	30 (0)	20 (-1)	1,000	8,187 ± 5,391	86,585
18	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	70 (1)	20 (-1)	1,143	17,252 ± 1,391	95,172
19	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	30 (-1)	100 (1)	1,148	7,522 ± 1,117	89,581
20	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	70 (1)	100 (1)	1,400	17,122 ± 0,816	95,989
21	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	1,000	7,195 ± 1,524	87,444
22	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	1,000	7,669 ± 2,267	88,128
23	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	1,000	7,692 ± 0,108	88,495
24	1,25 (0)	0,85 (-1)	5 (-1)	50 (0)	60 (0)	1,069	6,032 ± 3,247	86,574
25	1,25 (0)	1,50 (1)	5 (-1)	50 (0)	60 (0)	1,068	6,319 ± 0,357	87,089
26	1,25 (0)	0,85 (-1)	25 (1)	50 (0)	60 (0)	1,400	6,258 ± 0,337	89,755
27	1,25 (0)	1,50 (1)	25 (1)	50 (0)	60 (0)	1,400	7,457 ± 1,795	91,001
28	1,00 (-1)	0,95 (0)	15 (0)	30 (-1)	60 (0)	1,000	2,774 ± 0,470	67,117
29	1,50 (1)	0,95 (0)	15 (0)	30 (-1)	60 (0)	1,069	2,739 ± 0,421	74,526
30	1,00 (-1)	0,95 (0)	15 (0)	70 (1)	60 (0)	0,875	6,242 ± 0,789	84,385
31	1,50 (1)	0,95 (0)	15 (0)	70 (1)	60 (0)	1,400	7,032 ± 1,695	90,543
32	1,25 (0)	0,95 (0)	5 (-1)	50 (0)	20 (-1)	1,000	13,757 ± 6,717	92,753
33	1,25 (0)	0,95 (0)	25 (1)	50 (0)	20 (-1)	1,000	12,514 ± 6,369	91,667
34	1,25 (0)	0,95 (0)	5 (-1)	50 (0)	100 (1)	1,400	8,214 ± 0,336	92,024
35	1,25 (0)	0,95 (0)	25 (1)	50 (0)	100 (1)	1,000	14,347 ± 0,731	93,005
36	1,00 (-1)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	20 (-1)	1,143	12,758 ± 0,601	92,833
37	1,50 (1)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	20 (-1)	1,400	9,285 ± 2,081	92,032
38	1,00 (-1)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	100 (1)	1,143	9,648 ± 1,184	91,685
39	1,50 (1)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	100 (1)	1,500	7,814 ± 0,131	92,146
40	1,25 (0)	0,85 (-1)	15 (0)	30 (-1)	60 (0)	1,400	6,371 ± 1,798	89,589
41	1,25 (0)	1,50 (1)	15 (0)	30 (-1)	60 (0)	1,500	16,044 ± 5,876	95,706
42	1,25 (0)	0,85 (-1)	15 (0)	70 (1)	60 (0)	1,770	16,772 ± 6,646	88,398
43	1,25 (0)	1,50 (1)	15 (0)	70 (1)	60 (0)	1,458	6,628 ± 1,831	87,823
44	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	1,000	7,825 ± 1,873	88,016
45	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	1,143	12,177 ± 2,817	93,295
46	1,25 (0)	0,95 (0)	15 (0)	50 (0)	60 (0)	1,000	16,107 ± 1,969	94,117

Tablica 11. Parametri modela odzivnih površina za optimiranje procesa ekstrakcije

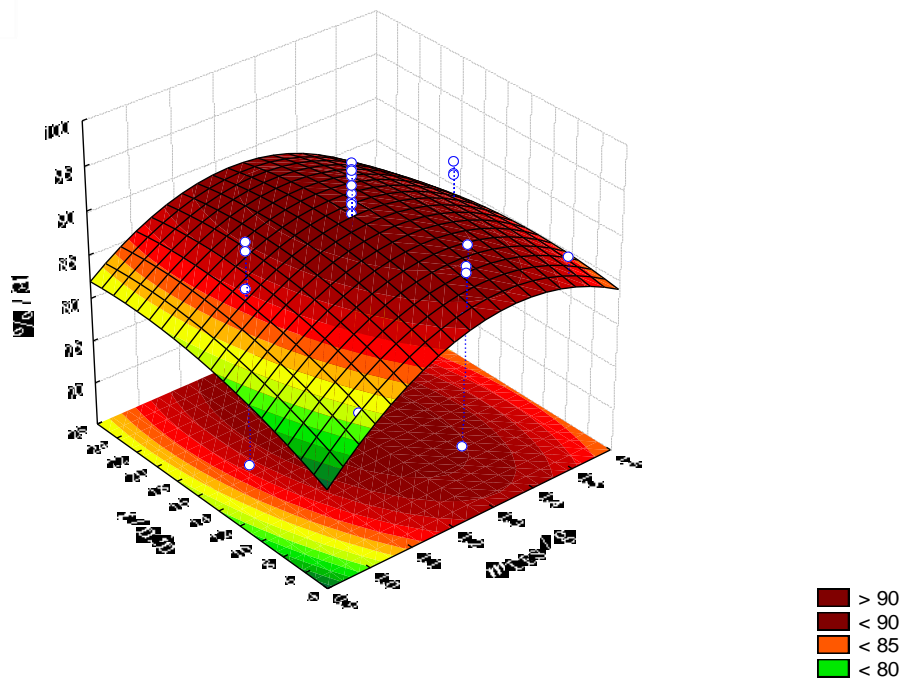
Parametar modela	Vrijednost parametra	Standardna pogreška	<i>p</i> -vrijednost	Interval pouzdanosti
Linearni članovi				
X_1 (<i>m</i> _{DES})	6,646	4,531	0,202	-5,003 < X_1 < 18,296
X_2 (<i>c</i> _{K2HPO4})	1,137	4,531	0,811	-10,512 < X_2 < 12,787
X_3 (<i>t</i>)	3,398	4,531	0,487	-8,251 < X_3 < 15,048
X_4 (<i>T</i>)	16,693	4,531	0,014	5,043 < X_4 < 28,342
X_5 (<i>c</i> _{GAE})	-4,014	4,531	0,416	-15,664 < X_5 < 7,635
Kvadratni članovi				
X_1^2	1,341	3,806	0,738	-8,443 < X_1^2 < 11,125
X_2^2	-6,981	3,806	0,126	-16,765 < X_2^2 < 2,803
X_3^2	-2,202	2,808	0,468	-9,421 < X_3^2 < 5,016
X_4^2	1,637	2,808	0,585	-5,582 < X_4^2 < 8,856
X_5^2	-5,667	1,420	0,010	-9,318 < X_5^2 < 2,017
Interakcijski članovi				
X_1X_2	-4,359	2,966	0,201	-11,985 < X_1X_2 < 3,267
$X_1X_2^2$	0,499	2,097	0,821	-4,893 < $X_1X_2^2$ < 5,893
$X_1^2X_2$	1,381	2,097	0,539	-4,011 < $X_1^2X_2$ < 6,774
$X_1^2X_2^2$	1,527	1,816	0,438	-3,143 < $X_1^2X_2^2$ < 6,198
X_1X_3	-2,696	2,966	0,405	-10,326 < X_1X_3 < 4,931
$X_1X_3^2$	-2,135	2,097	0,355	-7,528 < $X_1X_3^2$ < 3,257
$X_1^2X_3$	-1,622	2,097	0,474	-7,015 < $X_1^2X_3$ < 3,771
$X_1^2X_3^2$	1,829	1,483	0,272	-1,984 < $X_1^2X_3^2$ < 5,643
X_1X_4	-0,625	2,966	0,841	-8,252 < X_1X_4 < 7,001
$X_1X_4^2$	-3,476	2,097	0,158	-8,869 < $X_1X_4^2$ < 1,916
$X_1^2X_4$	-4,572	2,097	0,081	-9,965 < $X_1^2X_4$ < 0,820
$X_1^2X_4^2$	-1,806	1,483	0,277	-5,619 < $X_1^2X_4^2$ < 2,007
X_1X_5	0,631	2,966	0,839	-6,995 < X_1X_5 < 8,257
$X_1^2X_5$	1,211	2,097	0,588	-4,182 < $X_1^2X_5$ < 6,604
X_2X_3	0,364	2,967	0,906	-7,262 < X_2X_3 < 7,991
$X_2X_3^2$	-1,258	2,097	0,574	-6,651 < $X_2X_3^2$ < 4,134
$X_2^2X_3$	-1,793	2,097	0,431	-7,186 < $X_2^2X_3$ < 3,599
$X_2^2X_3^2$	2,242	1,483	0,190	-1,571 < $X_2^2X_3^2$ < 6,056
X_2X_4	-3,345	2,967	0,311	-10,972 < X_2X_4 < 4,281
$X_2X_4^2$	-2,203	2,097	0,341	-7,596 < $X_2X_4^2$ < 3,189
$X_2^2X_4$	6,017	2,097	0,035	0,625 < $X_2^2X_4$ < 11,410
$X_2^2X_4^2$	3,392	1,483	0,071	-0,421 < $X_2^2X_4^2$ < 7,205
X_2X_5	2,715	2,967	0,402	-4,911 < X_2X_5 < 10,341
$X_2^2X_5$	2,422	2,097	0,300	-2,970 < $X_2^2X_5$ < 7,815
X_3X_4	1,519	2,967	0,630	-6,107 < X_3X_4 < 9,146
$X_3X_4^2$	0,836	2,097	0,706	-4,557 < $X_3X_4^2$ < 6,229
$X_3^2X_4$	-8,341	2,097	0,011	-13,734 < $X_3^2X_4$ < -2,948
X_3X_5	1,046	2,967	0,738	-6,580 < X_3X_5 < 8,673
$X_3^2X_5$	0,806	2,097	0,716	-4,586 < $X_3^2X_5$ < 6,199
X_4X_5	-1,089	2,967	0,728	-8,716 < X_4X_5 < 6,537
	SS	MS	F	p
model	987,635	119,641	44,482	0,018

Odnos između zavisne varijable (učinkovitost ekstrakcije) i nezavisnih varijabli modela (masa DES-a, koncentracija soli, vrijeme ekstrakcije, temperatura ekstrakcije i koncentracija galne kiseline) je prikazan 3D odzivnim površinama na slikama 11-15. Grafovi su konstruirani prikazujući dvije varijable modela u analiziranom rasponu te držeći preostale tri varijable konstantnima. Na slici 11 su prikazane odzivne površine utjecaja mase DES-a i koncentracije soli i mase DES-a i vremena ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije pri čemu su vrijednosti proteklih triju varijabli držane konstantnim na gornjim granicama intervala analiziranih vrijednosti. Iz prikaza je vidljivo da se smanjenjem koncentracije soli i povećavanjem mase DES-a učinkovitost povećava, dok je učinkovitost veća pri srednjim omjerima mase i vremena ekstrakcije. Na slici 12 je prikazan utjecaj mase DES-a i temperature ekstrakcije i mase DES-a i koncentracije galne kiseline na učinkovitost reakcije, gdje je učinkovitost reakcije viša pri višim temperaturama i većom masom DES-a, te je učinkovitost viša kod niže koncentracije galne kiseline. Slika 13 prikazuje odzivne površine utjecaja koncentracije soli i vremena ekstrakcije i koncentracije soli i temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije, gdje je vidljivo da je učinkovitost viša kroz dulje vrijeme sa nižom koncentracijom soli, dok je učinkovitost viša pri visokim temperaturama i srednjom vrijednosti koncentracije soli. Na slici 14 su prikazane odzivne površine utjecaja koncentracije soli i koncentracije galne kiseline i vremena ekstrakcije i temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije, gdje je vidljivo da porastom koncentracije galne kiseline pri srednjoj vrijednosti soli učinkovitost raste, te učinkovitost raste i pri višim temperaturama kroz kraće vrijeme. Slika 15 prikazuje odzivne površine utjecaja vremena ekstrakcije i koncentracije galne kiseline i temperature ekstrakcije i koncentracije galne kiseline na učinkovitost ekstrakcije koja se snižava snižavanjem koncentracije galne kiseline i vremena ekstrakcije, dok se povećava povišenjem temperature ekstrakcije i koncentracije galne kiseline.

(a)

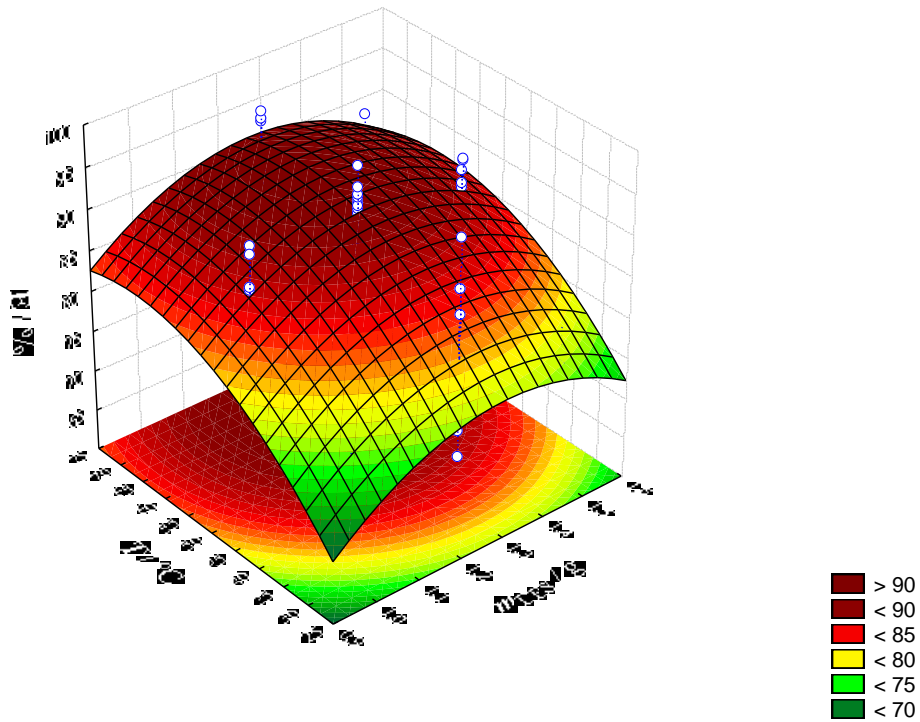


(b)

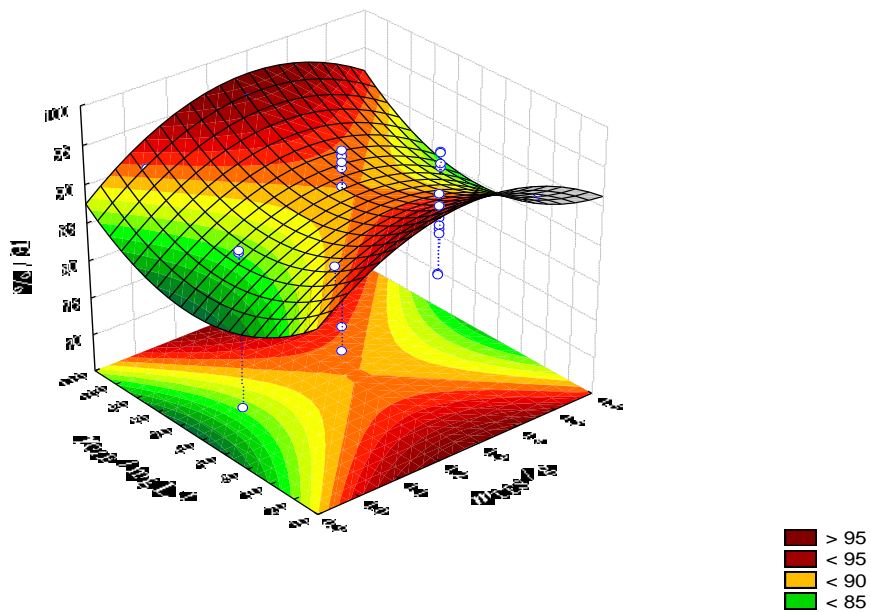


Slika 11. Odzivne površine utjecaja (a) mase DES-a i koncentracije soli i (b) mase DES-a i vremena ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije.

(a)

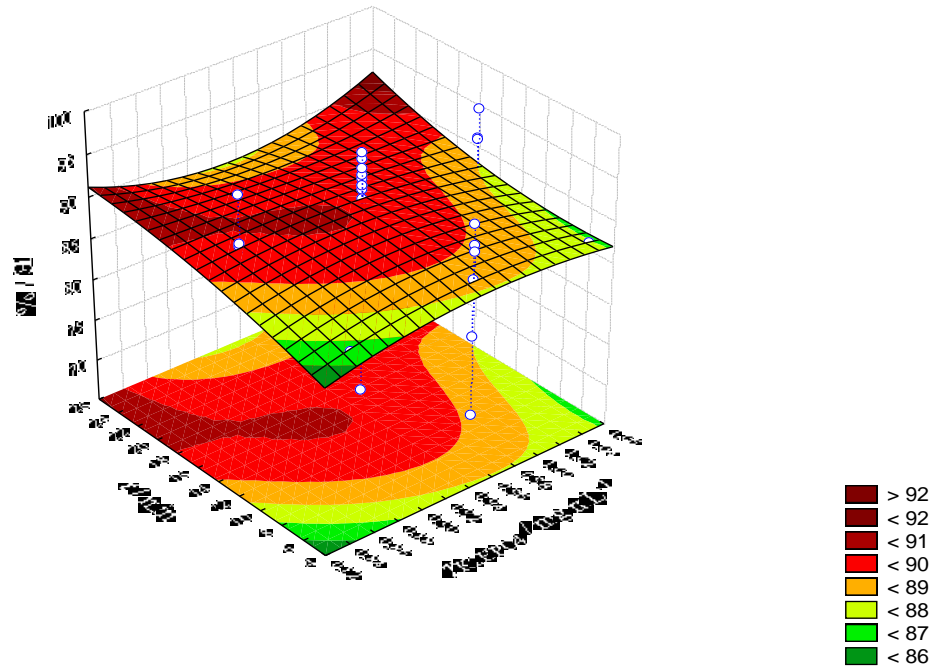


(b)

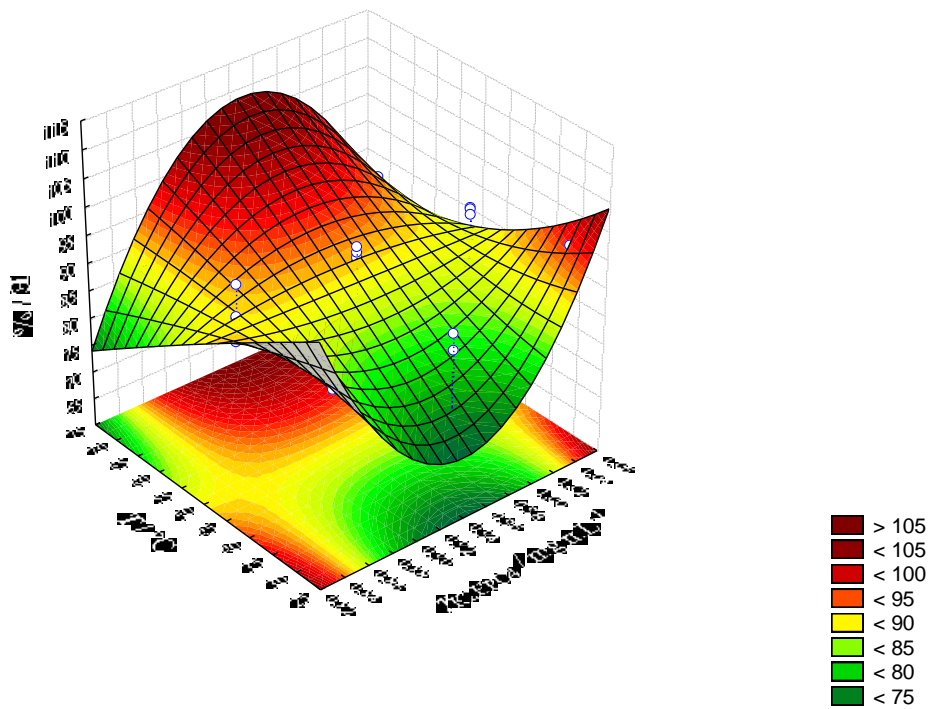


Slika 12. Odzivne površine utjecaja (a) mase DES-a i temperature ekstrakcije i (b) mase DES-a i koncentracije galne kiseline na učinkovitost ekstrakcije.

(a)

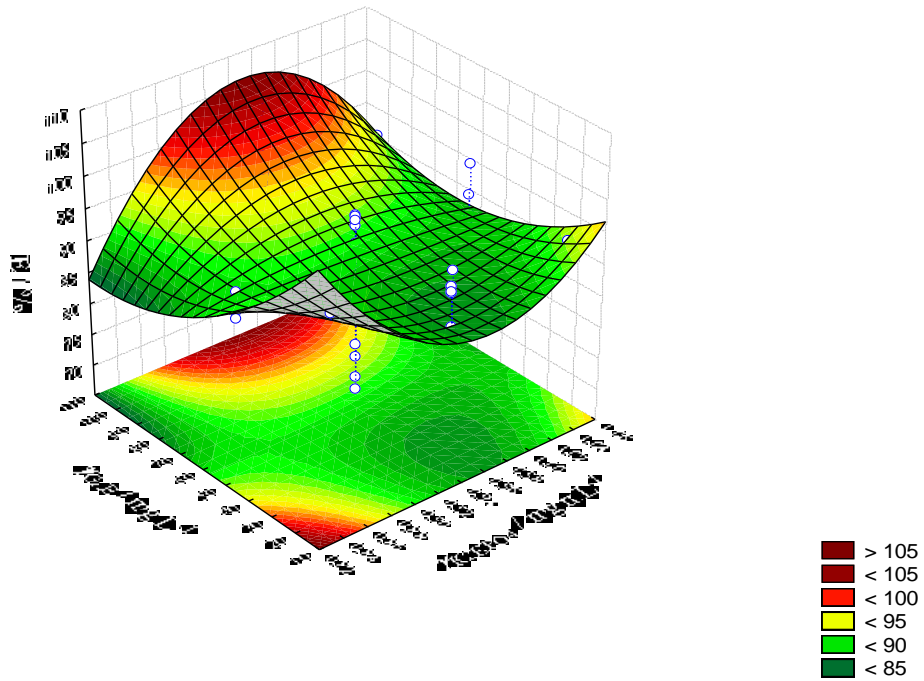


(b)

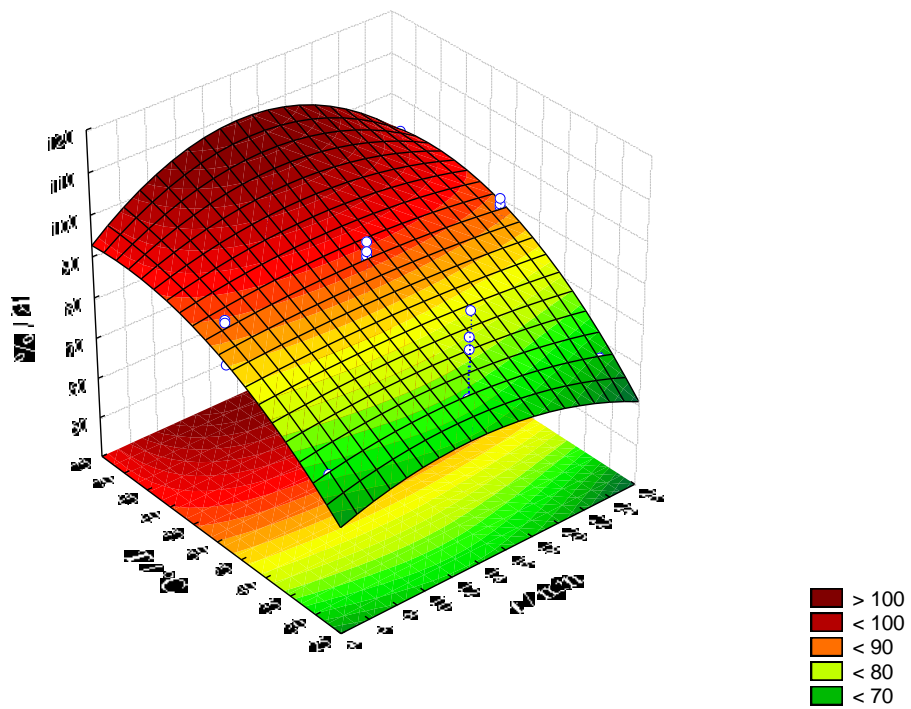


Slika 13. Odzivne površine utjecaja (a) koncentracije soli i vremena ekstrakcije i (b) koncentracije soli i temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije.

(a)

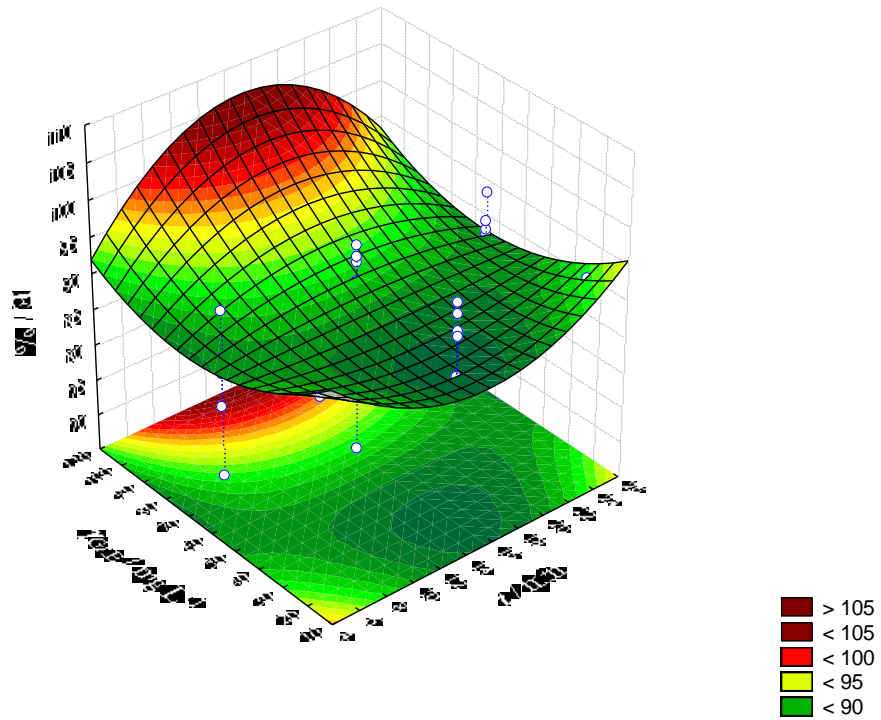


(b)

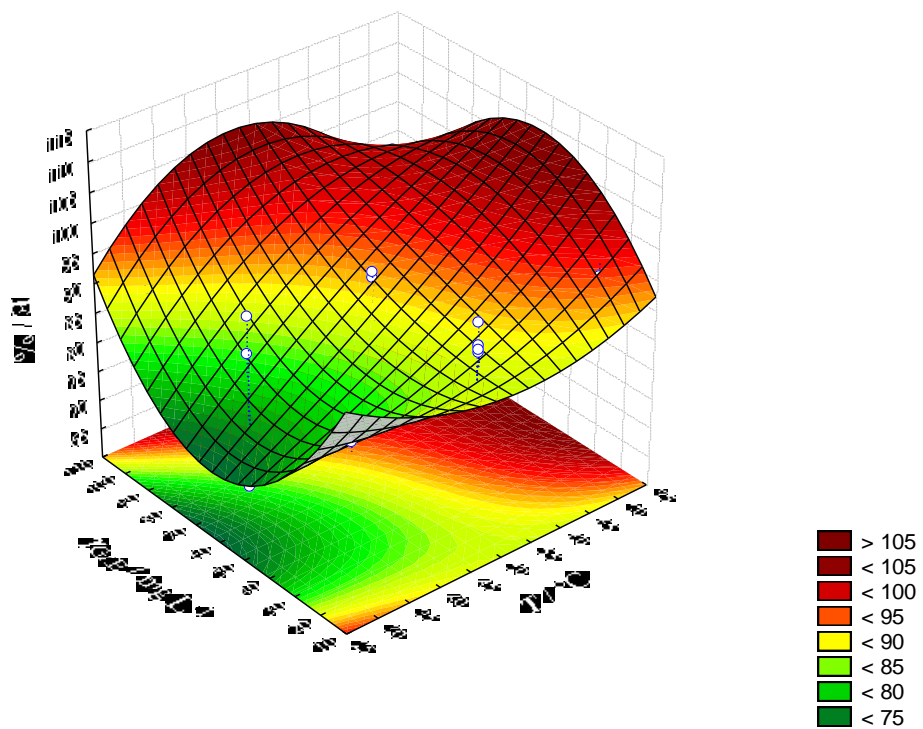


Slika 14. Odzivne površine utjecaja (a) koncentracije soli i koncentracije galne kiseline i (b) vremena ekstrakcije i temperature ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije.

(a)



(b)



Slika 15. Odzivne površine utjecaja (a) vremena ekstrakcije i koncentracije galne kiseline i (b) temperature ekstrakcije i koncentracije galne kiseline na učinkovitost ekstrakcije

Prema polinomnom modelu drugog stupnja za opis utjecaja mase DES-a, koncentracije soli, vremena ekstrakcije, temperature ekstrakcije i koncentracije galne kiseline, određeni su optimalni procesni uvjeti za provođenje procesa ekstrakcije. Kao što je prikazano u tablici 12, optimalni procesni uvjeti su: masa DES-a od $m_{DES} = 1,25$ g, koncentracija soli od $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,95$ g mL⁻¹, vrijeme ekstrakcije od $t = 15$ min, temperatura ekstrakcija od $T = 50$ °C te koncentracija galne kiseline od $\gamma_{GAE} = 60$ mg L⁻¹. Pri optimalnim procesnim uvjetima model je testiran nezavisnim eksperimentom te je dobivena učinkovitost ekstrakcije od $E = 89,916$ %, dok model pri istim eksperimentalnim uvjetima predviđa učinkovitost ekstrakcije od $E = 88,881$ %.

Tablica 12. Optimalni uvjeti za provedbu ekstrakcije, eksperimentom postignuta učinkovitost ekstrakcije pri optimalnim uvjetima te učinkovitost ekstrakcije predviđena modelom

Optimalni procesni uvjeti		E (eksperiment) / %	E (model) / %
m_{DES} / g	1,25	89,916 ± 2,967	88,881 ± 4,572
$\gamma_{K_2HPO_4}$ / g mL ⁻¹	0,95		
t / min	15		
T / °C	50		
γ_{GAE} / mg L ⁻¹	60		

4.3. Ekstrakcija polifenola u vodenom dvofaznom sustavu s DES-om u mikroekstraktoru

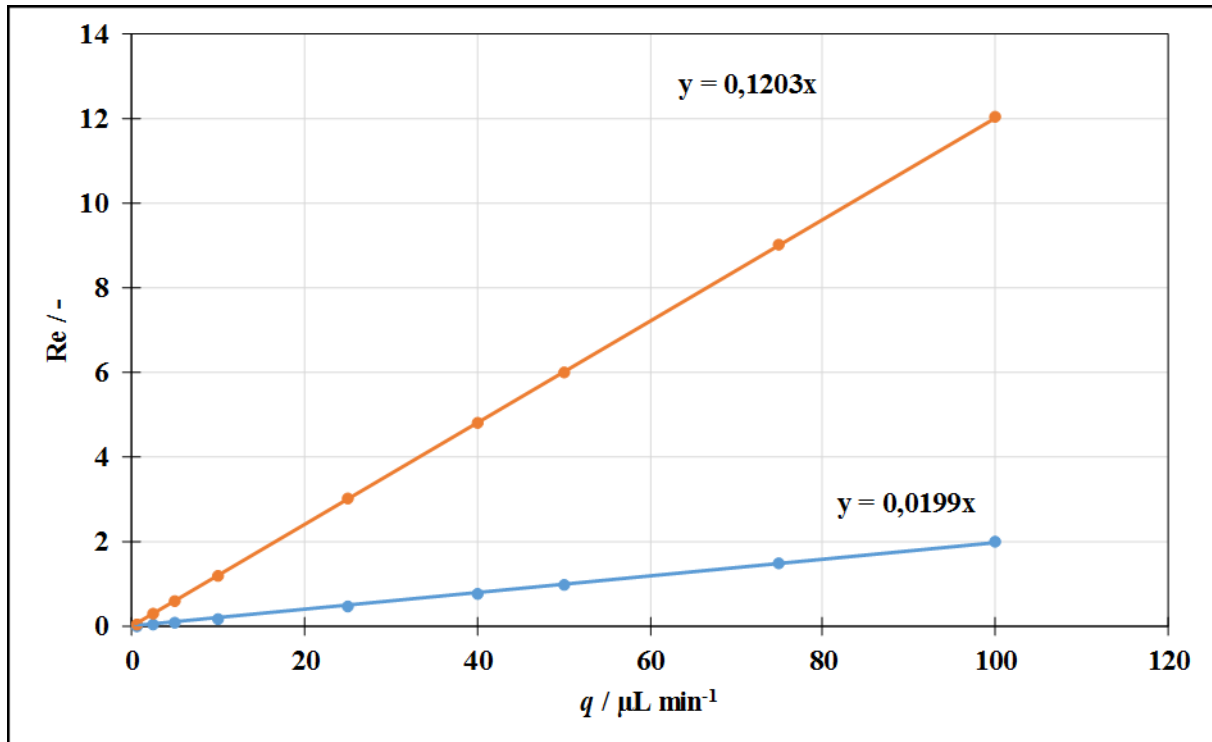
Provedena je analiza profila strujanja vodenog dvofaznog sustava s DES-om u mikroekstraktorskom sustavu s dva serijski spojena mikroreaktora; (i) mikroreaktor s mikromiješalima volumena $V = 2 \mu\text{L}$ s dva ulaza, jednim izlazom i hrapavošću površine od $1 \mu\text{m}$, (ii) mikroreaktor glatkih stjenki volumena $V = 4 \text{ mm}^3$ s dva ulaza i jednim izlazom. Dvije vodene faze uvedene su u opisane mikroreaktore pomoću klipnih pumpi. Kako bi se definirali omjeri protoka faza koji bi osigurali konstantu međufaznu površinu po dužini mikroreaktora glatkih stjenki volumena $V = 4 \text{ mm}^3$ s dva ulaza i jednim izlazom određene su gustoće i viskoznosti odabranog DES-a (kolin-korid : elilen-glikol) i pripremljene otopine soli ($\gamma_{\text{K}_2\text{HPO}_4} = 0,95 \text{ g mL}^{-1}$) pri temperaturi od $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$ (tablica 13). Rezultati pokazuju da pripremljena otopina soli ima nešto višu vrijednost gustoće ($\rho = 1,428 \text{ g mL}^{-1}$) u usporedbi s gustoćom korištenog DES- a ($\rho = 1,014 \text{ g mL}^{-1}$). S druge pak strane korišteni DES ($\eta = 9,715 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$) ima višu viskoznost od pripremljene otopine soli ($\eta = 2,260 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$). Uvođenjem navedenih komponenti dvofaznog sustava u mikroekstraktorski sustav, učeno je intenzivno miješanje faza u mikroreaktoru s mikromiješalima te separacija faza neposredno nakon ulaska u mikroreaktor glatkih stjenki. Također je važno napomenuti da je promatranjem strujanja pod mikroskopom uočeno kako je međufazna površina u mikroreaktoru glatkih stjenki očuvana po čitavoj duljini reaktora za analizirani raspon ukupnih protoka ($q = 1 - 200 \mu\text{L min}^{-1}$) te je sustav kao takav primjenjiv za ekstrakciju.

Tablica 13. Gustoća i viskoznost korištenih otopine soli i DES-a pri $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$.

	$\rho / \text{g mL}^{-1}$	η / Pas
$\gamma_{\text{K}_2\text{HPO}_4} = 0,95 \text{ g mL}^{-1}$	1,428	$2,260 \cdot 10^{-3}$
DES	1,014	$9,715 \cdot 10^{-3}$

Za ispitivani mikroekstraktorski sustav i za sve analizirane protoke izračunate su vrijednosti Reynolds-ove značajke (slika 16) za obje faze vodenog dvofaznog sustava. Reynolds-ova značajka stavlja u omjer inercijske i viskozne sile. Zbog malih srednjih prividnih linearnih brzina strujanja u mikrokanalima vrijednosti karakterističnih Reynolds-ovih značajki su male. Za najveći ispitivani protok pojedine faze od $q = 100 \mu\text{L min}^{-1}$ najveća izračunata vrijednost Reynolds-ove značajke bila je $\text{Re} = 12$ za fazu otopine soli. Plazl i Lakner (2010)

su u svojem radu naveli da se prijelazno područje između laminarnog i turbulentnog strujanja u mikrokanalima postiže za približne vrijednosti Reynolds-ove značajke $Re = 100$ na temelju čega se može zaključiti da su svi pokusi provedeni u laminarnom režimu strujanja.

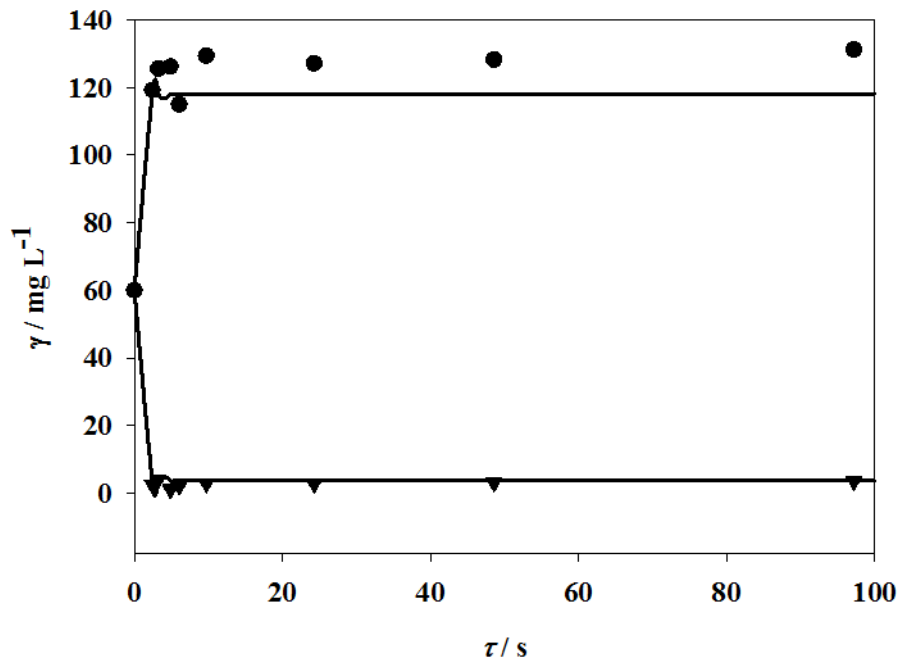


Slika 16. Ovisnost Re značajke o protoku pojedine faze (•) DES-a i (•) otopine soli u mikroreaktoru

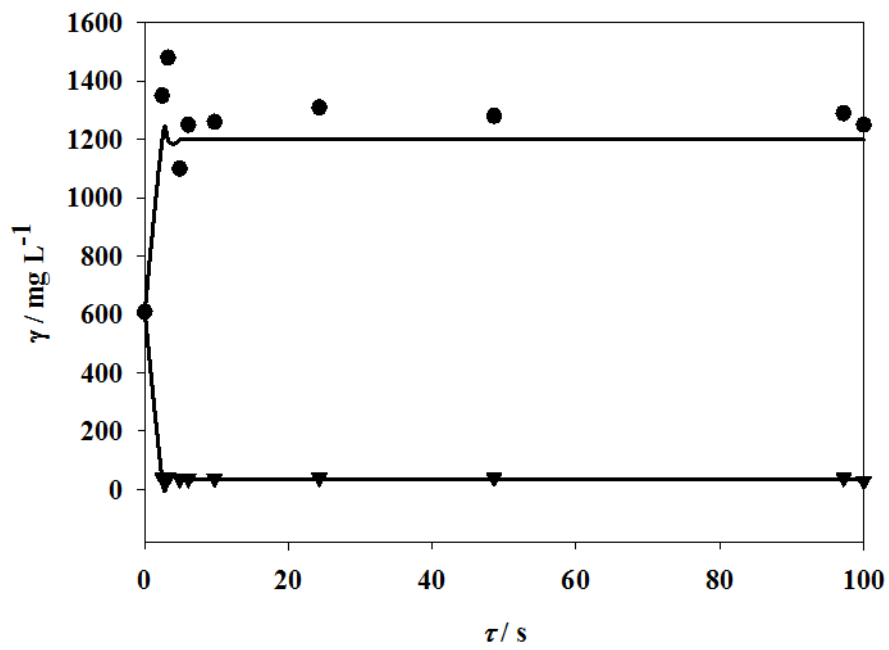
Pri eksperimentalnim uvjetima procijenjenim kao optimalnim u šaržnom makroekstratoru (masa DES-a od $m_{DES} = 1,25$ g, koncentracija soli od $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,95$ g mL⁻¹, temperatura ekstrakcija od $T = 50$ °C te koncentracija galne kiseline od $\gamma_{GAE} = 60$ mg L⁻¹) proveden je proces ekstrakcije u kontinuiranom mikroekstratoru za modelnu otopinu galne kiseline te za vodeni ekstrakt melise i vodeni ekstrakt mente. Faze otopine soli koncentracije $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,95$ g mL⁻¹ u koju je dodana definirana koncentracija galne kiseline (ekstrakt melise i ekstrakt mente) i faza odabranog eutektičkog otapala (kolin-klorid : etilen-glikol) uvedene su u mikroekstraktorski sustav zasebno, te su na izlazu iz mikroekstraktora zasebno skupljani uzorci pojedine faze nakon određenog vremena zadržavanja. Eksperimenti su provedeni pri vremenima zadržavanja u rasponu od $\tau = 2,43$ s do $\tau = 97,2$ s. Napravljena je usporedba eksperimentalnih podataka i simulacije modela ekstrakcije prikazanog sustavom parcijalnih diferencijalnih jednadžbi (jednadžbe 14-15) za obje faze. 2D matematički model koji se

koristi za opis kontinuiranog proces ekstrakcija u mikro-ekstraktorskom sustavu uključuje konvekciju u smjeru protoka i difuziju u dva smjera (po dužini i po širi reaktora). Sustav parcijalnih diferencijalnih jednadžbi riješen je uvođenjem pojednostavljenja. Svaka od dvije faze koje se uvode u mikroreaktor opisane su kao zaseban idealni cijevni reaktor u stacionarnom stanju (Jurinjak Tušek i sur., 2013). Na slici 17 može se uočiti jako dobro slaganje između eksperimentalnih vrijednosti i modelom predviđenih vrijednosti i za ekstraktnu i za rafinantnu fazu za sva tri analizirana sustava. Na slici 18 prikazana je ovisnost učinkovitosti ekstrakcije o vremenu zadržavanja. Analizom tih rezultata može se uočiti da je učinkovitost ekstrakcije najveća pri kratkim vremenima zadržavanja. Za vrijeme zadržavanja od $\tau = 2,43$ s postignuta je učinkovitost ekstrakcije viša od 94 % za sva tri analizirana sustava (modelna otopina galne kiseline, ekstrakt melise i ekstrakt mete). U usporedbi sa šaržnim procesom gdje je za vrijeme zadržavanja od $t = 15$ min postignuta učinkovitost ekstrakcije od 88 %, dobiveni rezultati predstavljaju značajan napredak i indiciraju da bi mikroekstraktorski sustavi u kombinaciji s vodenim dvofaznim sustavom s DES-om mogli biti slijedeći korak za brzu i učinkovitu ekstrakciju polifenola. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima koje su prezentirali Jurinjak Tušek i sur. (2017) u okviru istraživanja koje je obuhvatilo primjenu vodenog dvofaznog sustava s polietilen glikolom i amonijevim sulfatom u mikroekstraktorskom sustavu za kontinuiranu ekstrakciju polifenola iz soka naranče, iz bijelog te iz crnog vina. Uočeno je da za postizanje približno iste učinkovitosti ekstrakcije u šaržnom procesu potrebno 600 s dok je u mikroekstraktorskom sustavu potrebno svega 2,43 s.

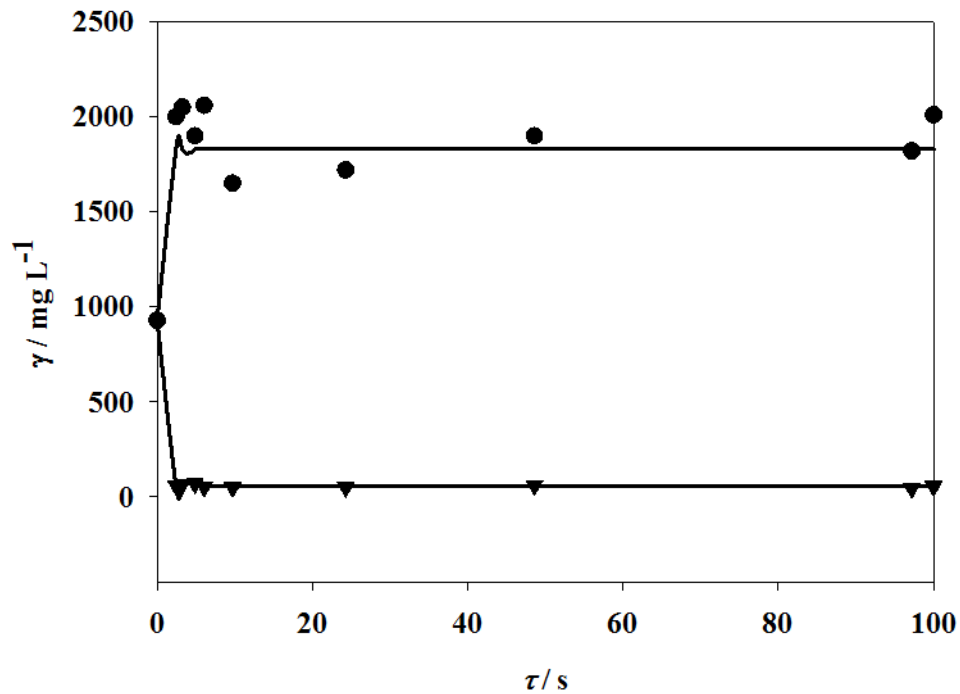
(a)



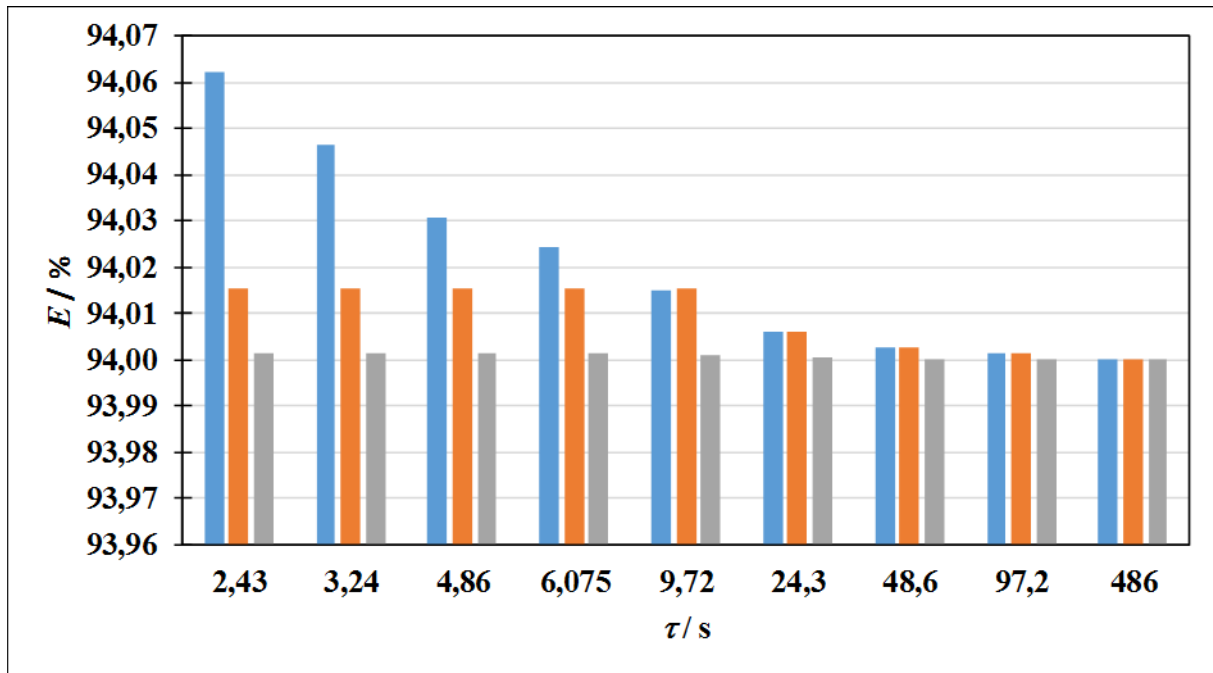
(b)



(c)



Slika 17. Usporedba eksperimentalnih vrijednosti za koncentracije polifenola pri različitim vremenima zadržavanja u obje faze dvofaznog sustava nakon ekstrakcije u mikroekstraktorskom sustavu (a) modelna otopina galne kiseline, (b) ekstrakt melise, (c) ekstrakt mente.



Slika 18. Ovisnost učinkovitosti ekstrakcije o vremenu zadržavanja (■) modelna otopina galne kiseline, (■) ekstrakt melise, (■) ekstrakt mente

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih istraživanja postavljeni su slijedeći zaključci:

1. Odabir pogodnog eutektičkog otapala za proces ekstrakcije s vodenim dvofaznim sastavom u šaržnim uvjetima proveden je na temelju postignute učinkovitosti ekstrakcije. Odabran je vodeni dvofazni sustav s kolin-klorid : etilen-glikol koji postiže učinkovitost ekstrakcije od približno 90 %.
2. Primjenom metode odzivnih površina procijenjeni su optimalni uvjeti za provedbu procesa ekstrakcije u šaržnim uvjetima primjenom vodenog dvofaznog sustava s kolin-klorid : etilen-glikolom od: masa DES-a $m_{DES} = 1,25$ g, koncentracija soli od $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,95$ g mL⁻¹, vrijeme ekstrakcije od $t = 15$ min, temperatura ekstrakcije $T = 50$ °C, koncentracija galne kiseline od $\gamma_{GAE} = 60$ mg L⁻¹.
3. Primjenom metode odzivnih površina došli smo do zaključka da je ključna varijabla koja najviše utječe na učinkovitost ekstrakcije temperatura.
4. Primjenom kontinuiranog mikroekstraktora postignuta je učinkovitost ekstrakcije od približno 94 % za vrijeme zadržavanja od $\tau = 2,43$ s što predstavlja značajan napredak u usporedbi sa šaržnim procesom gdje je za vrijeme ekstrakcije od $t = 15$ min postignuta učinkovitost ekstrakcije od 88 %.
5. Mikroreaktorski sustavi u kombinaciji s vodenim dvofaznim sustavom s DES-om predstavljaju učinkovitu tehnologiju za brzu i ponovljivu ekstrakciju polifenola.

6. LITERATURA

- An, J., Trujillo-Rodríguez, M. J., Pino, V., Anderson, J. L. (2017) Non-conventional solvents in liquid phase microextraction and aqueous biphasic systems. *J. Chromatogr. A.* **1500**, 1–23.
- Chandra, A. K., Kishor, K., Mishra, P. K., Alama, M. S. (2016) Numerical Investigations of Two-phase Flows through Enhanced Microchannels. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **30**, 149–159.
- Commence, J.-M., Falk, L., Corriou, J.-P., Matlosz, M. (2005) Analysis of microstructured reactor characteristics for process miniaturization and intensification. *Chem. Eng. Technol.* **28**, 446-458.
- Cvjetko Bubalo, M., Panić, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I. (2016) Metode priprave eutektičkih otopala. *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* **11**, 164-168.
- Dessimoz, A. L., Cavin, L., Renken, A., Kiwi-Minsker, L. (2008) Liquid–liquid two-Phaseflow patterns and mass transfer characteristics in rectangular glass microreactors, *Chem. Eng. Sci.* **63**, 4035-4044.
- Ehrfeld, W., Hessel, V., Löwe, H. (2000) *Microreactors: new technology for modern chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, str. 1–69.
- Elvira, K. S., i Solvas, X. C., Wootton, R. C. R., deMello, A. J. (2013). The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis. *Nature Chem.* **5**, 905–915.
- Farias, F. O. , Passos, H., Lima, Á. S., Mafra, M. R., Coutinho, J. A. P. (2017) Is It Possible To Create Ternary-like Aqueous Biphasic Systems with Deep Eutectic Solvents? *ACS Sustainable Chem. Eng.* **5**, 9402-9411.
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., dos Santos, W. N. L. (2007) Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal. Chim Acta* **597**, 179–186.
- Gonidec, M. i Puigmartí-Luis, J. (2019) Continuous- versus Segmented-Flow Microfluidic Synthesis in Materials Science, *Crystals* **9**, 12.
- Grilo, A. L., Raquel Aires-Barros, M., Azevedo, A. M. (2014) Partitioning in aqueous two-phase systems: Fundamentals, applications and trends, *Sep. Purif. Rev.* **45**, 68–80.

- Gutmann, B., Cantillo, D., Kappe, C. O. (2015) Continuous-Flow Technology—A Tool for the Safe Manufacturing of Active Pharmaceutical Ingredients. *Ang. Chem. Int. Edit.* **54**, 6688–6728.
- Han, D., Tian, M., Row, K. H. (2009) Isolation of four compounds from *Herba Artemisiae Scopariae* by preparative column HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **32**, 2407–2416.
- Häusler, E., Domagalski, P., Ottens, M., Bardow, A. (2012) Microfluidic diffusion measurements: the optimal H-cell. *Chem. Eng. Sci.* **72**, 45–50.
- Hayyan, M., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., Al Nashef, I. M. (2010) A novel technique for separating glycerine from palm oil-based biodiesel using ionic liquids. *Fuel Proces. Technol.* **91**, 116–120.
- Imanishi, N., Yamasaki, T., Tsukagoshi, K., Murata, M. (2018) Phase separation multi-phase flow using an aqueous two-phase system of a polyethylene glycol/dextran mixed solution. *Anal. Sci.* **34**, 953–958.
- Jensen, K. F. (2017) Flow chemistry—Microreaction technology comes of age. *AIChE Journal* **63**, 858–869.
- Jovanović, G. (2009) Microtechnology - one likely future of chemical processes. Predavanje, Ljubljana 16. prosinca 2009.
- Jurinjak Tušek, A., Šalić, A., Zelić, B. (2017) Mathematical modelling of polyphenol extraction by aqueous two-phase system in continuously operated macro- and micro-extractors. *Sep. Sci. Tech.* **52**, 864–875.
- Jurinjak Tušek, A., Šalić, A., Zelić, B. (2018). Application of aqueous two-phase systems in microstructured devices. U: Aqueous two-phase systems, properties, functions and advantages, (Xanthopoulos, V. A., ured.), Nova Science Publishers, Inc., New York, str. 89–107.
- Jurinjak Tušek, A., Tišma, M., Bregović, V., Ptičar, A., Kurtanjek, Ž., Zelić, B. (2013) Enhancement of phenolic compounds oxidation using laccase from *Trametes versicolor* in a microreactor. *Biotechn. Bioproc. Eng.* **18**, 686–696.

- Kashid, M. N. (2007) Experimental and modelling studies on liquid-liquid slug flow capillary microreactors. Doktorski rad, Sveučilište u Dortmundu, Dortmund.
- Kaushik, R., Pradeo, N., Vamshi, V., Geetha, M., Usha, A. (2010) Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *J. Food Sci. Technol.* **47**, 27-33.
- Le Man, H., Behera, S. K., Park, H. S. (2010) Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **7**, 157–164.
- Li, G., Pu, X., Shang, M., Zha, L., Su, Y., (2018) Intensification of liquid-liquid two-phase mass transfer in a capillary microreactor system, *AIChE Journal*, **65** (1), 334-346.
- Li, N., Wang, Y., Xu, K., Huang, Y., Wen, Q., Ding, X. (2016) Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein, *Talanta* **152**, 23-32.
- Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. D., Chen, S. N., Pauli, G. F. (2018) Natural deep eutectic solvents: Properties, applications, and perspectives, *J. Natur. Prod.* **81**, 679-690.
- Lomel, S., Falk, L., Commenge, J.-M., Houzelot, J.L., Ramdani, K. (2006) The microreactor: a systematic and efficient tool for the transition from batch to continuous process? *Chem. Eng. Res. Des.* **84**, 363-369.
- Löwe, H., Ehrfeld, W. (1999) State-of-the-art in microreaction technology: concepts, manufacturing and applications. *Electrochim. Acta.* **44**, 3679–3689.
- Marques, M. P .C., Fernandes, P. (2011) Microfluidic devices: useful tool for bioprocess intensification. *Molecules* **16**, 8368-8401.
- Mbous, Y. P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A., Looi, C. Y. (2016) Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges. *Biotechnol. Adv.* **35**, 105–134.

- Mills, P. L., Quiram, D. J., Ryley, J. F. (2007) Microreactor technology and process miniaturization for catalytic reactions - a perspective on recent developments and emerging technologies. *Chem. Eng. Sci.* **62**, 6992-7010.
- Novak, U., Lakner, M., Plazl, I., Žnidaršič-Plazl, P. (2015) Experimental studies and modeling of α -amylase aqueous two-phase extraction within a microfluidic device, *Microfluid. Nanofluid.* **19**, 75–83.
- Oliveira, A. F., Pessoa, A. C. S. N., Bastos, R. G. de la Torre, L. G. (2016) Microfluidic tools toward industrial biotechnology, *Biotechnol. Process.* **32**, 1372-1389.
- Pang, K., Hou, Y., Wu, W., Guo, W., Peng, W., Marsh, K. N. (2012) Efficient separation of phenols from oils *via* forming deep eutectic solvents. *Green Chem.* **14**, 2398–2401.
- Park, H. E., Tang, B., Row, K. H., (2014) Application of deep eutectic solvents as additives in ultrasonic extraction of two phenolic acids from *Herba Artemisiae Scopariae*. *Anal. Lett.* **47**, 1476–1484.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., Nunez, M. J. (2005) A thermal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: catechin, resveratrol and grape extract cases. *Eur. Food Res. Technol.* **221**, 284–290.
- Plazl, I., Lakner, M. (2010) Modelling and finite differences numerical analysis of reaction-diffusion dynamics in a microreactor. *Acta Chim. Slov.* **57**, 100-109.
- Plazl, L., Lakner, M. (2010) Modelinng and finite differnces numerical analysis of reation diffusion dynamics in a microreactor. *Acta Chim. Slov.* **57**, 100-109.
- Pohar, A., Lakner, M., Plazl, I. (2011) Parallel flow of immiscible liquids in a microreactor: modeling and experimental study, *Microfluid Nanofluid.* **12**, 307–316.
- Pohar, A., Plazl, I. (2009) Process intensification through microreactor application. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **23**, 537-544.
- Prashant L. S., Sarang P. G., Bharat A. B., Shirish H. S., Makarand S. P. (2018) A review on microreactors: Reactor fabrication, design, and cutting-edge applications. *Chem. Eng. Sci.* **189**, 431–448.

- Radošević, K., Čurko, N., Gaurina Srček, V., Cvjetko Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., Radojčić Redovniković, I. (2016) Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT - Food Sci. Technol.* **73**, 45–51.
- Roberge, D.M., Ducry, L., Bieler, N., Cretton, P., Zimmermann, B. (2005) Microreactor technology: a revolution for the fine chemical and pharmaceutical industries? *Chem. Eng. Technol.* **28**, 318-323.
- Shafie, M. H., Yusof, R., Gan, C.-Y. (2019). Deep eutectic solvents (DES) mediated extraction of pectin from *Averrhoa bilimbi*: Optimization and characterization studies, *Carbohydrate Polymers*, **216**, 303–311.
- SooHoo, J. R., Walker, G. M. (2008) Microfluidic aqueous two phase system for leukocyte concentration from whole blood. *Biomed. Microdevices* **11**, 323–329.
- Su, Y., Kuijpers, K., Hessel, V., Noël, T. (2016). A convenient numbering-up strategy for the scale-up of gas–liquid photoredox catalysis in flow. *Reaction Chem. Eng.*, **1**, 73–81.
- Šalić, A., Tušek, A., Kurtanjek, Ž., Zelić, B. (2010) Mikroreaktori, *Kem. Ind.* **59**, 227–248.
- Tang, B., Zhang, H., Row, K. H. (2015) Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. *J. Sep. Sci.* **38**, 1053–1064.
- Teng, D., Fang, Y., Song, X., Gao, Y. (2011) Optimization of enzymatic hydrolysis parameters for antioxidant capacity of peptide from goat placenta. *Food Bioprod. Process* **89**, 202-208.
- Tomé, L. I. N., Baião, V., Silva, W., Brett, C. M.A. (2018) Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. *App. Mater. Today* **10**, 30–50.
- Tsukamoto, M., Taira, S., Yamamura, S., Morita, Y., Nagatani, N., Takamura, Y., Tamiya, E. (2009) Cell separation by an aqueous two-phase system in a microfluidic device. *The Analyst*. **134** (10), 1994.

- Vobecká, L., Romanov, A., Slouka, Z., Hasal, P., Příbyl, M. (2018) Optimization of aqueous two-phase systems for the production of 6-aminopenicillanic acid in integrated microfluidic reactors-separators. *New Biotechnol.* **47**, 73-79.
- Wang, K. i Luo, G. (2017). Microflow extraction: A review of recent development, *Chem. Eng. Sci.* **169** 18–33.
- Wirth, T. (2013) Microreactors in organic chemistry and catalysis, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Xu, B., Ooi, K. T., Wong, N. T, Choi, W. K. (2000) Experimental investigation of flow friction for liquid flow in microchannels. *Int. Commun. Heat Mass.* **27**, 1165-1176.
- Xu, K., Wang Y., Huang, Y., Li, N., Wen, Q. (2015) A green deep eutectic solvent-based aqueous two-phase system for protein extracting, *Anal. Chim. Acta.* **864**, 9-20.
- Xu, P., Wang, Y., Chen, J., Wei, X., Xu, W., Ni, R., Meng, J., Zhou, Y. (2018) A novel aqueous biphasic system formed by deep eutectic solvent and ionic liquid for DNA partitioning, *Talanta* **189**, 467-479.
- Xu, P., Wang, Y., Chen, J., Wei, X., Xu, W., Ni, R., Meng, J., Zhou, Y. (2019) Development of deep eutectic solvent-based aqueous biphasic system for the extraction of lysozyme, *Talanta*, **202**, 1-10.
- Yue, J., Chen, G., Yuan, Q. (2004) Pressure drop of single and two-phase flows through T-type microchannel mixers. *Chem. Eng. J.* **102**, 11-24.
- Zamani, P., Khosropour, A. R. (2016) A combination of natural deep eutectic solvents and microflow technology: a sustainable innovation for the tandem synthesis of 3-aminohexahydrocoumarins. *Green Chem.* **18**, 6450-6455.
- Zeng, Q., Wang, Y., Huang, Y., Ding, X., Chen, J., Xu, K. (2014) Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning. *Analyst*, **139**, 2565–2573.
- Zhang, H., Wang, Y., Xu, K., Li, N., Wen, Q., Yang Q., Zhou, Y. (2016) Ternary and binary deep eutectic solvents as a novel extraction media for protein partitioning, *Anal. Methods* **8**, 8196-8207.

Zhang, H., Wang, Y., Zhou, Y., Chen, J., Wei, X., Xu, P. (2018b) Aqueous biphasic systems formed by deep eutectic solvent and new-type salts for the high-performance extraction of pigments. *Talanta* **181**, 210-216.

Zhang, L., Hessel, V., Peng, J. (2018c). Liquid-liquid extraction for the separation of Co(II) from Ni(II) with Cyanex 272 using a pilot scale Re-entrance flow microreactor. *Chem. Eng. J.* **332**, 131–139.

Zhang, X., Teng, G., Zhang, J. (2018a) Deep eutectic solvents aqueous two-phase system based ultrasonically assisted extraction of ursolic acid (UA) from *Cynomorium songaricum* Rupr. *Chem. Eng. Comm.* **206** (4), 419-431.