

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**USPOREDBA FENOLNOG SASTAVA I  
ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI  
EKSTRAKATA BIJELOG I CRNOG ČEŠNJAKA  
PRIPRAVLJENIH POSTUPKOM EKSTRAKCIJE  
MIKROVALOVIMA**

**ZAVRŠNI RAD**

**NINA MIMICA**

**Matični broj: 45**

**Split, rujan 2019.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE  
TEHNOLOGIJE**

**USPOREDBA FENOLNOG SASTAVA I  
ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI  
EKSTRAKATA BIJELOG I CRNOG ČEŠNJAKA  
PRIPRAVLJENIH POSTUPKOM EKSTRAKCIJE  
MIKROVALOVIMA**

**ZAVRŠNI RAD**

**NINA MIMICA**

**Matični broj: 45**

**Split, rujan 2019.**

**UNIVERSITY OF SPLIT  
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY  
UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY**

**PHENOLIC COMPOSITION AND ANTIOXIDANT  
ACTIVITY OF WHITE AND BLACK GARLIC  
EXTRACTS OBTAINED BY MICROWAVE-  
ASSISTED EXTRACTION**

**BACHELOR THESIS**

**NINA MIMICA**

**Parent number: 45**

**Split, September 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij Prehrambene tehnologije

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Tema rada** je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta  
**Mentor:** Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić  
**Pomoć pri izradi:** Azra Đulović, mag. chem.

### USPOREDBA FENOLNOG SASTAVA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA BIJELOG I CRNOG ČEŠNJAKA PRIPRAVLJENIH POSTUPKOM EKSTRAKCIJE MIKROVALOVIMA

Nina Mimica, 45

#### Sažetak:

Povrće iz porodice lukova (Alliaceae) odlikuje prisutnost brojnih fitokemikalija koje pokazuju značajnu biološku aktivnost. Zasigurno jedna od najistraživanijih biljnih vrsta iz ove porodice je češnjak (*Allium sativum* L.) kojem su do danas u brojnim studijama dokazana različita pozitivna svojstva. Cilj ovog rada bio je pripremiti ekstrakte svježeg češnjaka i crnog češnjaka (dobivenog postupkom fermentacije svježeg češnjaka) korištenjem uređaja za mikrovalnu ekstrakciju (500 W, 94 °C, 30 min). U dobivenim ekstraktima određen je udio ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom te im je testirana antioksidacijska aktivnost korištenjem različitih metoda: Briggs-Rauscher oscilacijskom metodom, sposobnošću hvatanja molekula slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) te metodom određivanja redukcijske aktivnosti (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP).

**Ključne riječi:** *Allium sativum* L., mikrovalna ekstrakcija, ukupni fenoli, antioksidacijska aktivnost.

**Rad sadrži:** 22 stranice, 11 slika, 2 tablice, 21 literaturnu referencu

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Doc. dr. sc. Danijela Skroza
2. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek
3. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

**Datum obrane:** 13. rujna 2019. g.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Undergraduate Study of Food Tehnology**

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food Technology  
**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.19  
**Mentor:** Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor  
**Technical assistance:** Azra Đulović, mag. chem.

### PHENOLIC COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WHITE AND BLACK GARLIC EXTRACTS OBTAINED BY MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION

Nina Mimica, 45

#### **Abstract:**

Vegetable from the Alliaceae plant family is characterized by the presence of numerous phytochemicals that show significant biological activity. Probably one of the most investigated plant species is garlic (*Allium sativum* L.) with large number of studies that already proved its positive properties. The aim of this study was to prepare extracts of fresh and black garlic (produced by the fermentation of fresh garlic) by the microwave-assisted extraction (500 W, 94°C, 30 min). The obtained extracts were tested for total phenolics using Folin-Ciocalteu method while the antioxidant activity was tested by multiple method approach using Briggs-Rauscher oscillating reaction, by scavenging ability against free 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazil radical (DPPH), and reducing activity determination by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay.

**Keywords:** *Allium sativum* L., microwave-assisted extraction, total phenolics, antioxidant activity.

**Thesis contains:** 22 pages, 11 figures, 2 tables, 21 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Prof.
2. Ph. D. Mario Nikola Mužek, Assistant Prof.
3. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Prof.

**Defence date:** September 13 2019.

**Printed and electronic (pdf format) version of** thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić te neposrednim vodstvom Azre Đulović, mag. chem., u razdoblju od ožujka do rujna 2019. godine.*

*Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2016-06-1316*

## **ZAHVALA**

*Iskreno se zahvaljujem mojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na savjetima i ukazanoj pomoći prilikom izrade završnog rada. Također, zahvaljujem se i mag. chem. Azri Đulović na ukazanoj pomoći pri izradi završnog rada.*

*Veliko hvala mom dečku, obitelji i prijateljima na neizmjernoj podršci tijekom školovanja.*



## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

Zadatak ovog završnog rada bio je utvrditi razliku između sastava i svojstava svježeg i crnog češnjaka. Zadatak je bio homogenizirane uzorke podvrgnuti postupku mikrovalne ekstrakcije, a u dobivenim ekstraktima odrediti udio ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom te ispitati njihovu antioksidacijsku aktivnost Briggs-Rauscher, FRAP i DPPH metodom.

## SAŽETAK

Povrće iz porodice lukova (Alliaceae) odlikuje prisutnost brojnih fitokemikalija koje pokazuju značajnu biološku aktivnost. Zasigurno jedna od najistraživanijih biljnih vrsta iz ove porodice je češnjak (*Allium sativum* L.) kojem su do danas u brojnim studijama dokazana različita pozitivna svojstva. Cilj ovog rada bio je pripremiti ekstrakte svježeg češnjaka i crnog češnjaka (dobivenog postupkom fermentacije svježeg češnjaka) korištenjem uređaja za mikrovalnu ekstrakciju (500 W, 94 °C, 30 min). U dobivenim ekstraktima određen je udio ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom te im je testirana antioksidacijska aktivnost korištenjem različitih metoda: Briggs-Rauscher oscilacijskom metodom, sposobnošću hvatanja molekula slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) te metodom određivanja redukcijske aktivnosti (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*, FRAP).

**Ključne riječi:** *Allium sativum* L., mikrovalna ekstrakcija, ukupni fenoli, antioksidacijska aktivnost.

## ABSTRACT

Vegetable from the Alliaceae plant family is characterized by the presence of numerous phytochemicals that show significant biological activity. Probably one of the most investigated plant species is garlic (*Allium sativum* L.) with large number of studies that already proved its positive properties. The aim of this study was to prepare extracts of fresh and black garlic (produced by the fermentation of fresh garlic) by the microwave-assisted extraction (500 W, 94°C, 30 min). The obtained extracts were tested for total phenolics using Folin-Ciocalteu method while the antioxidant activity was tested by multiple method approach using Briggs-Rauscher oscillating reaction, by scavenging ability against free 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil radical (DPPH), and reducing activity determination by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay.

**Keywords:** *Allium sativum* L., microwave-assisted extraction, total phenolics, antioxidant activity.

# SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	1
<b>1. OPĆI DIO</b> .....	2
1.1. Češnjak.....	2
1.2. Crni češnjak.....	4
1.3. Ekstrakcija.....	5
1.4. Mikrovalna ekstrakcija.....	6
1.4.1. Prednosti korištenja mikrovalne ekstrakcije.....	8
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	9
2.1. Biljni materijal i postupak ekstrakcije.....	9
2.2. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom.....	11
2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	13
2.3.1. DPPH metoda.....	13
2.3.2. Briggs-Rauscher oscilacijska metoda.....	14
2.3.3. FRAP metoda.....	15
<b>3. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	16
3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola.....	16
3.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti.....	17
<b>4. ZAKLJUČAK</b> .....	20
<b>5. LITERATURA</b> .....	21

## UVOD

Upotreba dielektričnog zagrijavanja korištenjem mikrovalova je posljednjih godina postala jedna od najkorištenijih metoda izolacije bioaktivnih sastojaka iz biljnog materijala. Zbog izuzetno kratkog vremena ekstrakcije, bolje učinkovitosti i značajno manje potrošnje organskih otapala, mikrovalna ekstrakcija predstavlja alternativu tradicionalnim postupcima ekstrakcije kruto-tekuće.<sup>1</sup>

U ovom radu istražen je sastav i svojstva ekstrakata svježeg i crnog češnjaka pripremljenih postupkom mikrovalne ekstrakcije. Dok je svježi češnjak poznat svima, posljednjih godina javlja se sve veće zanimanje za crnim češnjakom, najviše zbog njegove neobične arome i blago slatkog okusa.<sup>2</sup>

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Češnjak

Češnjak (slika 1) je biljna vrsta koja potječe iz središnje Azije odakle se proširio po cijelom svijetu. U Republici Hrvatskoj, češnjak se uspješno uzgaja u cijeloj zemlji zahvaljujući svojoj velikoj prilagodljivosti.<sup>3</sup>

Češnjak je povrće iz porodice Alliaceae, a ime je dobio po alicinu, spoju iz skupine sumpornih organskih spojeva. Alicin nije prisutan u cjelovitom češnjaku, već nastaje iz aliina djelovanjem enzima alinaze nakon degradacije strukture ploda, npr. sjeckanja ili drobljenja. Alicin ima dokazana antioksidacijska, antifugalna i antibakterijska svojstva, a odgovoran je i za oštar miris češnjaka.<sup>4</sup> Što se morfoloških i bioloških svojstava tiče, češnjak je biljka koja može narasti do 90 cm. Dio biljke koji se najčešće konzumira je podzemni dio, odnosno lukovica koja se često naziva i glavom češnjaka. Lukovica češnjaka je pretežno spljoštena i sadrži od 12 do 20 češnjeva. Nadzemni dio biljke čini stabljika na čijoj se donjoj polovici nalaze dugački, linearni listovi. Na vrhu stabljike razvija se okruglasti cvat koji čini mali broj cvjetova i 20 do 30 rasplodnih pupova. Nadzemni dijelovi češnjaka se također mogu konzumirati, osobito dok su nezreli.<sup>3,5</sup>

Zahvaljujući visokom udjelu različitih bioloških aktivnih spojeva te njihovom pozitivnom utjecaju na ljudski organizam, češnjak se smatra funkcionalnom hranom. Aktivni sastojci češnjaka mogu se podijeliti u dvije skupine: sumporovi spojevi i aktivne tvari koje ne sadrže sumpor. Uz već spomenute sumporove spojeve aliin i alicin, češnjak još sadrži i ajoen, dialil sulfid i s-alil cistein. Dokazano je da sumporovi spojevi pomažu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, neuroloških bolesti i bolesti jetre te također u prevenciji alergija i artritisa.<sup>6</sup> Skupina aktivnih tvari koje ne sadrže sumpor uključuje vitamine i minerale. Najznačajniji vitamini prisutni u češnjaku su vitamin C, E i vitamini B kompleksa, a od minerala najvažniji su kalij, kalcij i fosfor. Osim vitamina i minerala u češnjaku se nalaze i drugi sastojci poput polisaharida, proteina i lipida, odnosno fosfolipida, glikolipida i masnih kiselina.<sup>7</sup>



**Slika 1.** Češnjak<sup>8</sup>

Među biološki aktivnim sastojcima češnjaka važno je spomenuti i fenolne spojeve, odnosno spojeve iz podgrupa fenolnih kiselina i flavonoida. Antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva pomažu u zaštiti i sprječavanju pojave brojnih kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti, razne vrste karcinoma te neurološke bolesti.<sup>9</sup>

Svi navedeni spojevi pretežno se određuju iz podzemnog dijela biljke, odnosno lukovice dok o njihovoj prisutnosti u ostalim dijelovima biljke (stabljika, listovi, cvijet) postoji mali broj studija.<sup>6</sup>

Sadržaj biološki aktivnih spojeva u češnjaku ovisi o različitim čimbenicima od kojih je potrebno istaknuti ekotip, klimatske uvjete prilikom uzgoja, kakvoću zemlje, način uzgoja, ampelotehničke mjere, itd.<sup>3</sup>

## 1.2. Crni češnjak

Crni češnjak (slika 2) je zapravo prerađevina odnosno proizvod bijelog (svježeg) češnjaka koji je nastao na način da je svježi češnjak određeno vrijeme fermentirao na povišenoj temperaturi uz visoku vlažnost zraka. Procesom fermentacije češnjak postao je taman, slatkog okusa te ljepljive strukture.<sup>2</sup> Način proizvodnje crnog češnjaka uključuje čuvanje svježeg češnjaka u kontroliranim uvjetima temperature koja se obično kreće od 60 do 77 °C te relativne vlažnosti veće od 70 % u vremenskom razdoblju od 60 do 90 dana.<sup>5</sup>

Tijekom navedene toplinske obrade pojedini kemijski spojevi iz svježeg češnjaka pretvaraju se u amadorijeve spojeve, odnosno ključne intermedijarne spojeve u Maillardovim reakcijama. Kvaliteta crnog češnjaka ovisi o načinu proizvodnje, ali provedene studije pokazuju da crni češnjak sadrži više funkcionalnih spojeva od svježeg.<sup>4</sup> U usporedbi sa svježim češnjakom, crni češnjak ne posjeduje snažan i oštar miris koji je jedna od najznačajnijih karakteristika svježeg češnjaka, a uzrok tome je smanjena koncentracija alicina koji se procesom fermentacije pretvara u spojeve poput s-alil cisteina, alkaloida i flavonoidne spojeve. Upravo su promjene fizikalno-kemijskih svojstava glavni razlog pojačane biološke aktivnosti crnog češnjaka u odnosu na svježi. Također, dosadašnje znanstvene studije koje su provedene su pokazale iznimne antioksidacijske, antialergijske, antikancerogene i protuupalne učinke crnog češnjaka.<sup>2</sup>



Slika 2. Crni češnjak<sup>10</sup>



U usporedbi sa svježim češnjakom, crni češnjak je bogatiji magnezijem, kalcijem, flavonoidima, polifenolima te ga odlikuju bolja antioksidacijska svojstva.<sup>11</sup>

**Tablica 1.** Usporedba hranidbene vrijednosti svježeg i crnog češnjaka<sup>12</sup>

Energetska vrijednost	Mjerna jedinica	Češnjak	Crni češnjak
	Kcal	149	219
Voda	g/100 g svježe tvari	58,6	33,6
Bjelančevine		6,4	14,2
Ugljikohidrati		1,0	39,8
Vlakna		2,1	9,8
Kalij	mg/100 g svježe tvari	401	930
Kalcij		181	13
Fosfor		153	44
Magnezij		25	52

### 1.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija je brz i učinkovit postupak razdvajanja i koncentriranja tvari. Ekstrakcija iz homogenih smjesa tvari provodi se na temelju različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Smjesa koja se odijeli se potom najčešće obrađuje otapalom kako bi se iz nje izdvojile komponente od interesa za čije je izdvajanje u čistom obliku potrebno dobivenu otopinu kristalizirati ili ispariti.

Metode ekstrakcije mogu se podijeliti na konvencionalne i nekonvencionalne. U konvencionalne spadaju destilacija (direktna, vodenom parom ili vodom i parom), ekstrakcija otapalima i postupak hladnog prešanja, dok su nekonvencionalne metode turbo-ekstrakcija, ekstrakcija superkričnim kapljevinama, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.<sup>1</sup>

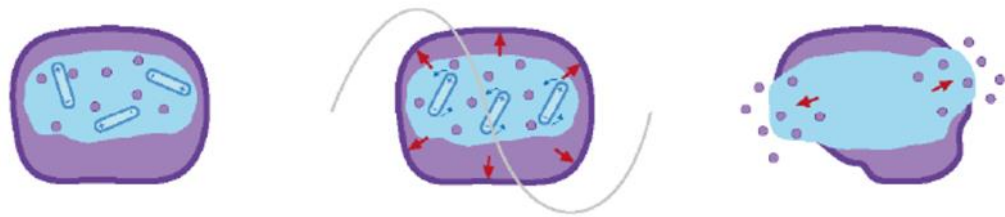
Tri glavna koraka koja odlikuju postupak ekstrakcije su:<sup>13</sup>

- desorpcija s vanjske površine čestice pri konstantnoj brzini supstrata (ravnotežna faza)
- transport mase unutarnjom difuzijom
- difuzija otopljene tekućine u ekstrahirano otapalo (vanjska difuzija).

#### 1.4. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalovi predstavljaju dio elektromagnetskog zračenja valnih duljina u rasponu od 0,1 mm do 30 cm i frekvencija u rasponu od 1 GHz do 300 GHz. Mikrovalovi se primjenjuju u radarskim sustavima, komunikacijskim sustavima, bežičnoj mreži, medicini, prehrambenoj industriji i dr.<sup>14</sup> Za mikrovalove je karakteristično da se odbijaju od metala, a prolaze kroz plastiku, papir i staklo. U hrani djeluju na način da zagrijevaju vodu, a zbog ograničenog energetskog potencijala ne uzrokuju promjene u strukturi tvari, što je temelj principa rada i procesa zagrijavanja u mikrovalnim pećnicama.<sup>15</sup>

Mikrovalna ekstrakcija (engl. *Microwave Assisted Extraction*, MAE) je brza i pouzdana analitička metoda čiji temelj je dielektrično zagrijavanje upotrebom mikrovalova. Dielektrično zagrijavanje ovisi o materijalu i njegovoj sposobnosti da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu. Mikrovalovi istovremeno zagrijevaju cijeli volumen uzorka te oštećuju vodikove veze čime se potiče rotacija dipola (slika 3). Kretanjem otopljenih iona povećava se prodiranje otapala u matriks čime se potiče otapanje.<sup>1</sup> Glavna razlika između konvencionalnih metoda ekstrakcije i mikrovalne ekstrakcije je u tome što se kod mikrovalne ekstrakcije proces grijanja odvija unutar ozračenog medija, dok se kod konvencionalnih metoda toplina prenosi s medija u unutrašnjost uzorka.<sup>13</sup>



Slika 3. Selektivno djelovanje mikrovalova<sup>13</sup>

Glavni koraci kojima se može opisati postupak mikrovalne ekstrakcije koja se provodi s otapalom su:<sup>13</sup>

- prodiranje otapala u čvrstu tvar
- solubilizacija i/ili razgradnja komponenti
- transport otapala unutarnjom difuzijom

- migracija ekstrahirane topline s površine čvrste tvari u rasutu otopinu vanjskom difuzijom
- kretanje ekstrakta u odnosu na čvrstu tvar
- odvajanje i ispuštanje ekstrakta i čvrste tvari.

Postoje dvije vrste sustava mikrovalne ekstrakcije:<sup>16</sup>

- ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranoj temperaturi i tlaku
- ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku.

Učinkovitost mikrovalne ekstrakcije ovisi o različitim parametrima kao što su izbor otapala, temperatura, veličina čestica i raspodjela veličina, vrijeme ekstrakcije, primijenjena snaga mikrovalova i dr.<sup>1</sup>

Veličine čestica ekstrahiranih tvari najčešće su u rasponu od 100 µm do 2 mm, a veća kontaktna površina omogućuje veću učinkovitost ekstrakcije jer se na taj način ostvaruje bolji kontakt između otapala i materijala. Ipak, nedostatak u korištenju čestica malih dimenzija je otežano odvajanje otapala i biljnog materijala nakon postupka ekstrakcije.<sup>1</sup> Pri izboru otapala važno je voditi računa o topljivosti željenog ekstrakta, o svojstvima otapala da upijaju mikrovalove te o potencijalnoj interakciji između matriksa i otapala. Otapalo koje se koristi treba dobro upijati energiju mikrovalova te imati visoku dielektričnu konstantu, kao na primjer metanol, etanol i voda.<sup>17</sup> Iako se učinkovitost ekstrakcije povećava povećanjem temperature, u slučaju termolabilnih spojeva može doći do njihove razgradnje pa treba voditi računa o snazi mikrovalova koja se primjenjuje.<sup>18</sup> Vrijeme predstavlja još jedan važan parametar ekstrakcije, a ovisi o karakteristikama uzorka te svojstvima otapala. Ekstrakcija najčešće traje od 15 do 20 minuta.<sup>13</sup> Na slici 4 je prikazan uređaj za mikrovalnu ekstrakciju.



**Slika 4.** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju<sup>13</sup>

#### **1.4.1. Prednosti korištenja mikrovalne ekstrakcije**

Mikrovalna ekstrakcija je bolja, učinkovitija i pouzdanija metoda ekstrakcije od konvencionalnih metoda zbog kraćeg vremena trajanja ekstrakcije, znatno manjeg rizika od termičke degradacije spojeva prisutnih u matriksu, znatno niže potrebe za otapalom i samim time povećane prevencije od onečišćenja. Ukoliko se mikrovalnu ekstrakciju usporedi s uobičajenom Soxhlet ekstrakcijom, koja se u svrhu izolacije fitokemikalija najčešće upotrebljava posljednjih godina, mikrovalna ekstrakcija ima značajne prednosti. Postupak ekstrakcije Soxhletom traje izrazito dugo (8-24 h) što zahtijeva veliki utrošak energije. S druge strane, zagrijavanje kod mikrovalne ekstrakcije događa se na selektivan način u zatvorenom sustavu te ne dolazi do gubitka energije što znatno skraćuje vrijeme ekstrakcije (30 minuta). Još jedna prednost mikrovalne ekstrakcije je mogućnost izdvajanja malih količina sastojaka koji su u materijalu prisutni u tragovima (npr. teški metali, pesticidi, itd.).<sup>1</sup> Također, mikrovalna ekstrakcija omogućuje korištenje polarnih i nepolarnih otapala.<sup>13</sup>

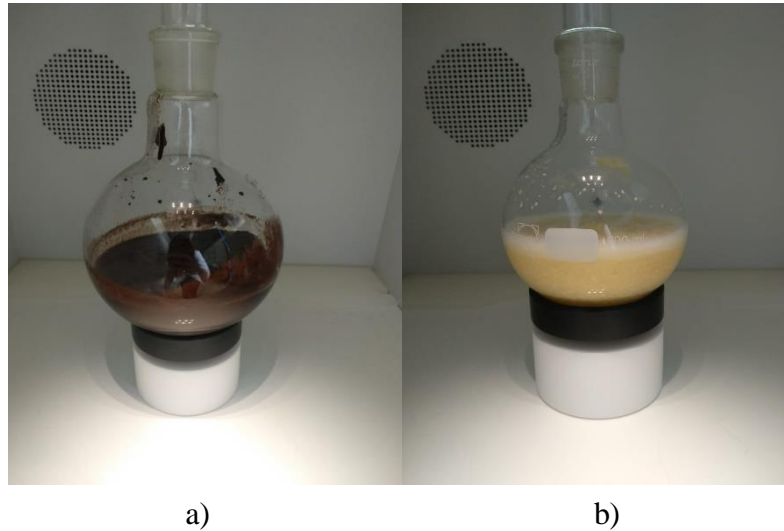
## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Biljni materijal i postupak ekstrakcije

U ovom su radu korišteni uzorci svježeg i crnog češnjaka koji su kupljeni od OPG Kralj (Zagreb, Hrvatska). Za postupak ekstrakcije je homogenizirano u mikseru po 100 g svježeg češnjaka i 185 g crnog češnjaka te su uzorci potom preneseni u tikvicu s okruglim dnom i dodana im je destilirana voda tako da je u konačnici omjer biljnog materijala i vode bio 1:1. Tako homogenizirani uzorci podvrgnuti su postupku MAE u uređaju prikazanom na slici 5.



**Slika 5.** Korišteni uređaj za mikrovalnu ekstrakciju Ethos X (Milestone Srl, Italy)



**Slika 6.** Pripremljeni uzorci crnog (a) i svježeg (b) češnjaka

U svrhu bržeg vremena ekstrakcije te boljeg ekstrakcijskog prinosa iz biljnog materijala korištena je metoda ekstrakcije pod utjecajem mikrovalova. Dio aparature prikazan na slici 5. je gornji dio aparature koji predstavlja sustav za destilaciju (engl. *fragrance*) pomoću kojeg se prikupljalo eterično ulje koje nije bilo predmet ovog rada, već je u ovom istraživanju korišten ekstrakt zaostao u tikvici s okruglim dnom dobiven nakon tretmana mikrovalovima (slika 6).

Parametri ekstrakcije bili su sljedeći: snaga mikrovalova 500 W, vrijeme trajanja ekstrakcije 30 minuta te temperatura 94 °C. Homogenizirani biljni materijal stavljen je u stakleni reaktor u mikrovalnoj pećnici, a zatim sastavljen ostatak gornjeg sustava za hvatanje hlapljivih komponenti. Nakon završene ekstrakcije vodeni ekstrakt koji je zaostao u staklenoj tikvici s okruglim dnom (reaktoru) je profiltriran i kao takav čuvan na +4°C do analiza.

## 2.2. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom

Folin-Ciocalteu metoda se temelji na oksidaciji fenolnih grupa do kinona dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa (smjese molibdofosfatnih i volframofosfatnih aniona) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Metoda je spektrofotometrijska pa se određivanjem absorbancije pri 765 nm mjeri intenzitet obojenja i samim time udio fenolnih spojeva u uzorku.<sup>19</sup>

### Reagensi:

- Zasićena otopina natrijevog karbonata; w ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) = 20 %
- Folin-Ciocalteu reagens

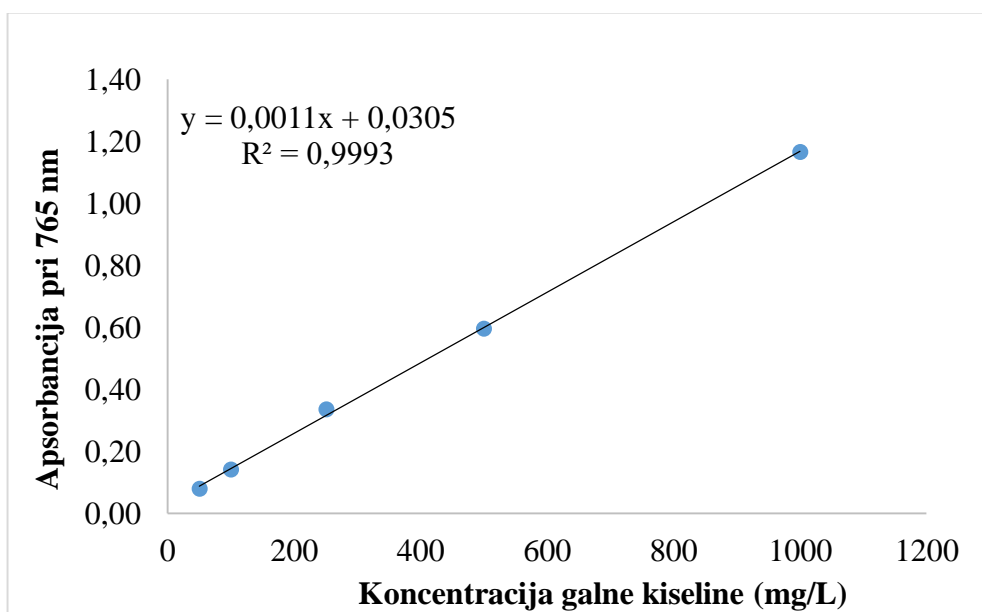
### Postupak određivanja:

U kivetu se otpipetira 0,25 mL uzorka, 1,975 mL destilirane vode i 1,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa. Otopina se potom promiješa i nakon 1 minute se doda 3,75 mL otopine natrijevog karbonata, a nakon što ista odstoji 2 sata na sobnoj temperaturi očita joj se absorbancija pri 765 nm.

Sadržaj ukupnih fenola računa se preko jednadžbe umjernog pravca dobivene za otopine galne kiseline (slika 7), a konačni rezultati se izražavaju u ekvivalentima galne kiseline (GAE) po 1 L ekstrakta.

**Tablica 2.** Koncentracije galne kiseline i očitane absorbancije reakcijske smjese pri 765 nm korištene za izradu umjernog pravca za određivanje ukupnih fenola

Koncentracija galne kiseline (mg/L)	Absorbancija (765 nm)
50	0,08 ± 0,00
100	0,14 ± 0,00
250	0,33 ± 0,01
500	0,59 ± 0,00
1000	1,17 ± 0,01



**Slika 7.** Umjerni pravac galne kiseline za određivanje ukupnih fenola



## 2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

### 2.3.1. DPPH metoda

DPPH metoda je jedna od najkorištenijih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti koja se temelji na redukciji stabilnog, slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil koji u prisutnosti elektron donora, tj. antioksidansa, mijenja boju iz ljubičaste u žutu, što se prati pri valnoj duljini od 517 nm.<sup>20</sup>

#### Reagensi:

- Etanolna otopina DPPH radikala absorbancije  $1,2 \pm 0,05$ .

#### Postupak određivanja:

U kivetu se doda 2 mL otopine DPPH reagensa te se očita absorbancija otopine pri 517 nm ( $A_{C(0)}$ ), nakon čega se u kivetu doda 50  $\mu$ L uzorka. Nakon jednog sata ponovno se mjeri absorbancija uzorka ( $A_{A(t)}$ ), a postotak inhibicije DPPH radikala računa se prema sljedećem izrazu:

$$\text{Inhibicija (\%)} = [(A_{C(0)} - A_{A(t)})/A_{C(0)}] \times 100$$

gdje je,

$A_{C(0)}$  - absorbancija otopine DPPH radikala kod vremena  $t=0$  minuta

$A_{A(t)}$  - absorbancija reakcijske smjese nakon nekog vremena  $t$ .

### 2.3.2. Briggs-Rauscher oscilacijska metoda

Oscilacijska Briggs-Rauscher metoda temelji se na praćenju vremena inhibicije oscilacija u sustavu nakon dodatka antioksidansa. Do prekida oscilacija dolazi prilikom reakcije antioksidansa s hidroperoksil radikalom, a vrijeme inhibicije je u linearnoj ovisnosti s koncentracijom dodanog uzorka.<sup>21</sup>

#### Reagensi:

- Otopina A (sumporna kiselina, kalijev jodat)
- Otopina B (malonska kiselina, škrob, manganov sulfat)
- Otopina vodikova peroksida,  $w(\text{H}_2\text{O}_2)=15\%$

#### Postupak određivanja:

U čašu se otpipetira 1 mL otopine A i 1 mL otopine B, a oscilacijska reakcija koja je vidljiva promjenom boje otopine iz bezbojne preko žute u plavu pokreće se dodatkom 1 mL otopine peroksida. S pojavom trećeg plavog obojenja u smjesu se doda 100  $\mu\text{L}$  uzorka što uzrokuje obezbojenje otopine, odnosno zaustavljanje oscilacija. Kod ove metode mjeri se vrijeme inhibicije, odnosno vrijeme do ponovne pojave oscilacija koje je mjera antioksidacijske aktivnosti uzorka.

### 2.3.3. FRAP metoda

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metodom određuje se sposobnost uzorka, tj. antioksidansa da reducira  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ . Nastali ioni reagiraju s TPTZ reagensom (2,4,6- tripiridil-*s*-triazin) prilikom čega dolazi do redukcije žuto obojenog kompleksa u plavi što se prati pri 593 nm.<sup>20</sup>

#### Reagensi:

- Acetatni pufer, c ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ )=300 mmol/L, pH= 3,6.
- Otopina klorovodične kiseline, c (HCl)=40 mmol/L.
- Otopina 2,4,6-tripiridil-*s*-tirazin (TPTZ) u 40 mmol/L HCl
- Otopina željezovog(III) klorida, c ( $\text{FeCl}_3$ )=20 mol/L.

FRAP reagens: 25 mL acetatnog pufera i po 2,5 mL otopine  $\text{FeCl}_3$  i TPTZ-a

#### Postupak određivanja:

U kivetu se otpipetira 3 mL FRAP reagensa te se očita absorbancija reagensa pri 593 nm. Zatim se doda 100  $\mu\text{L}$  uzorka koji uzrokuje pojavu plavog obojenja koje se očita nakon četiri minute. Razlika između konačne vrijednosti i vrijednosti absorbancije očitane prije dodatka uzorka predstavlja promjenu absorbancije pomoću koje se računa FRAP vrijednost uzorka.

Rezultati FRAP vrijednosti računaju se preko jednadžbe umjernog pravca ( $y=0,0007x+0,0037$ ) dobivene testiranjem otopina  $\text{Fe(II)}$  iona i izraženih kao  $\mu\text{M}$  ekvivalenata  $\text{Fe(II)}$ .

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog završnog rada bilo je istražiti razliku u antioksidacijskoj aktivnosti i sadržaju ukupnih fenola između ekstrakata svježeg i crnog češnjaka pripremljenih postupkom mikrovalne ekstrakcije. U radu su analizirani sljedeći uzorci:

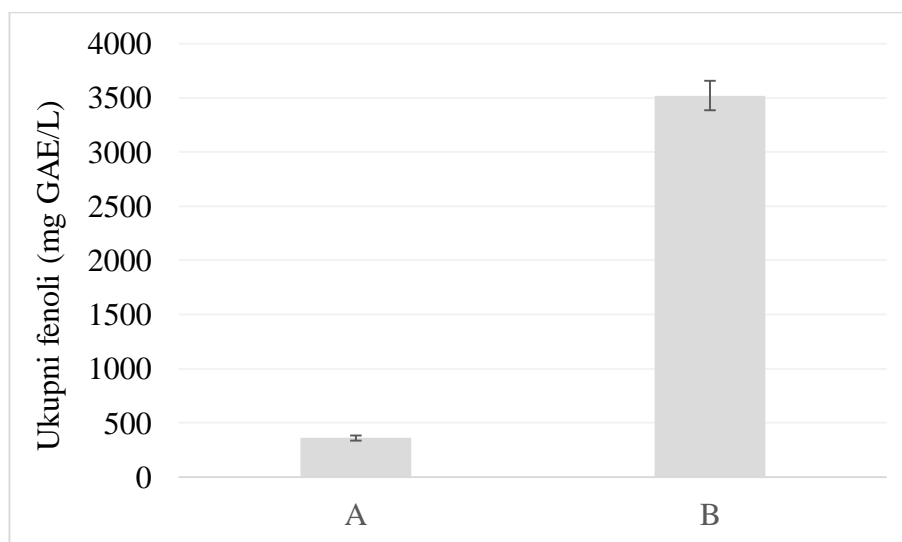
**A** – vodeni ekstrakt svježeg češnjaka

**B** – vodeni ekstrakt crnog češnjaka

Za određivanje ukupnih fenola korištena je Folin-Ciocalteu metoda, a za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištene su tri metode: metoda DPPH, Briggs-Rauscher metoda i FRAP metoda.

#### 3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola

Na slici 8 prikazani su rezultati određivanja ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom izraženi u mg GAE/L ekstrakta i kao što je vidljivo postoji značajna razlika u koncentraciji fenola između uzoraka. Koncentracija fenola u ekstraktu svježeg češnjaka iznosi 361 mg GAE/L, dok je kod crnog češnjaka ona 3520 mg GAE/L, što je 9,8 puta veća vrijednost.



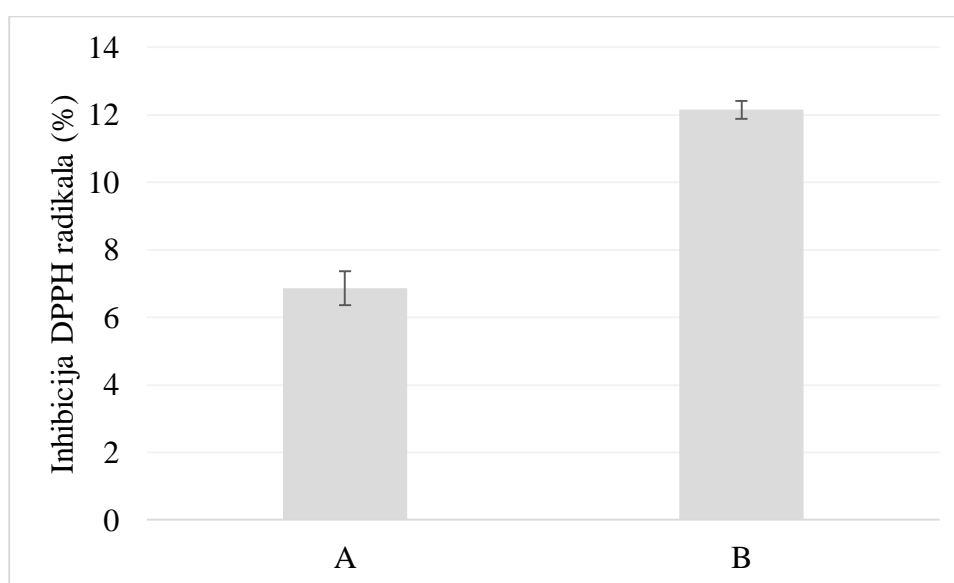
mg GAE/L– miligrami ekvivalenta galne kiseline po 1 L uzorka

**Slika 8.** Usporedni prikaz rezultata određivanja ukupnih fenola u ekstraktima svježeg i crnog češnjaka

### 3.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti

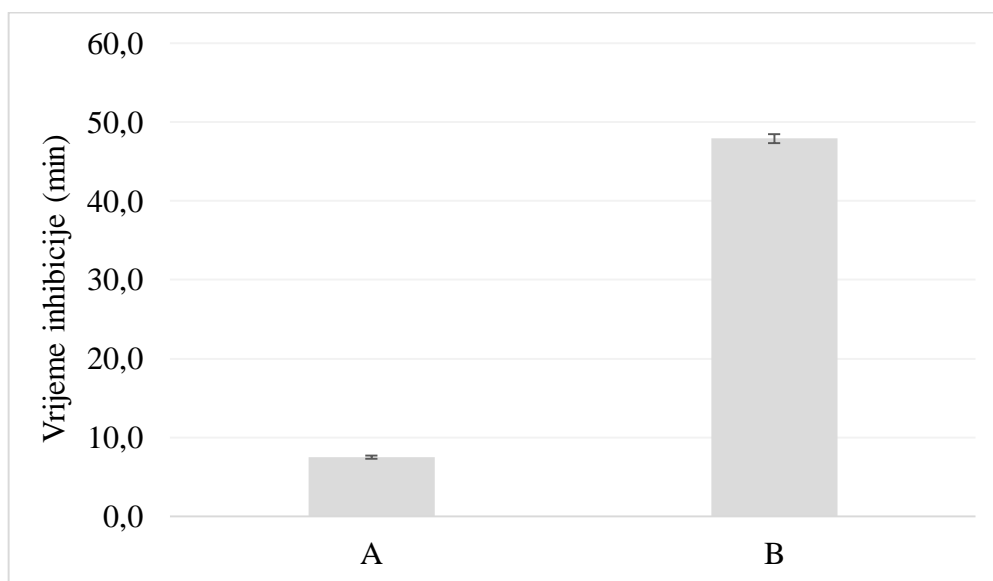
Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka DPPH metodom korišteni su ekstrakti razrijeđeni 100 puta, a dobiveni rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom izraženi su u vidu inhibicije DPPH radikala (u postotcima).

Na slici 9 vidljivo je da je antioksidacijska aktivnost crnog češnjaka približno 2 puta veća u odnosu na svježi češnjak jer je dobiveni postotak inhibicije DPPH radikala za svježi češnjak iznosio 6,87 %, a za crni češnjak 12,15 %.



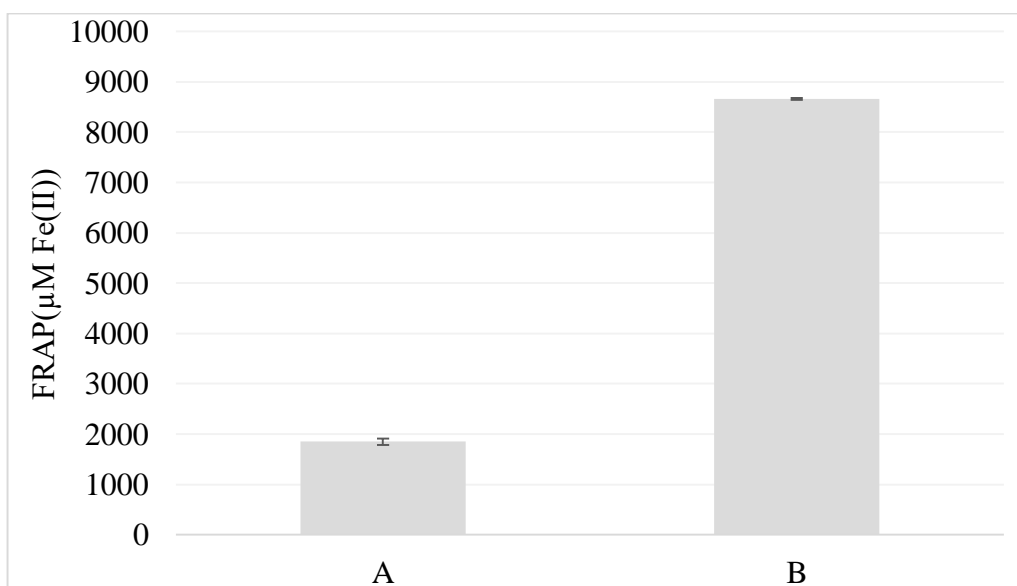
**Slika 9.** Usporedni prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom u ekstraktima svježeg i crnog češnjaka

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti Briggs-Rauscher metodom korišteni su ekstrakti razrijeđeni dva puta, a rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti u ovom su slučaju izraženi kao vrijeme inhibicije oscilacijskih reakcija (u minutama). Dobiveni rezultati ukazuju na to da kod svježeg češnjaka vrijeme inhibicije iznosi 7,5 minuta, dok je kod crnog češnjaka ono 47,9 minuta (slika 10). Rezultati stoga pokazuju približno 6,5 puta veću antioksidacijsku aktivnost crnog češnjaka od onog svježeg.



**Slika 10.** Usporedni prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti Briggs-Rauscher metodom u ekstraktima svježeg i crnog češnjaka

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom korišteni su ekstrakti razrijeđeni 10 puta. Antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom iskazuje se u vidu  $\mu\text{M Fe(II)}$  te za uzorak svježeg češnjaka iznosi  $1850,7 \mu\text{M Fe(II)}$ , a za uzorak crnog češnjaka  $8657,9 \mu\text{M Fe(II)}$  (slika 11). Ponovno se uočava skoro 5 puta bolja antioksidacijska (redukcijska) aktivnost crnog češnjaka u odnosu na svježi češnjak.



**Slika 11.** Usporedni prikaz rezultata određivanja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom u ekstraktima svježeg i crnog češnjaka

#### **4. ZAKLJUČAK**

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da crni češnjak nedvojbeno ima znatno bolju antioksidacijsku aktivnost i veću koncentraciju ukupnih fenola u odnosu na svježi češnjak što potvrđuje rezultate dosadašnjih istraživanja te činjenicu da u postupku prerade tj. tijekom fermentacije češnjaka dolazi do fizikalno-kemijskih promjena u kojima nastaju komponente koje imaju snažniju biološku aktivnost.



## 5. LITERATURA

1. Eskilsson S, Bjorklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction, *J Chrom A*. 2000;902:227–250.
2. Yuan H, Sun L, Chen M, Wang J. The comparison of the contents of sugar, Amadori, and Heyns compounds in fresh and black garlic. *J Food Sci*. 2016;81:C1662-8.
3. Lešić R, Borošić J, Buturac I, Ćustić M, Poljak M, Romić D. (2004). *Povrćarstvo, Zrinski d.d., Čakovec, 2004.*
4. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components. *J Agric Food Chem*. 2001;31 (3s):955S-9562S
5. URL:<https://en.wikipedia.org/wiki/Garlic> Pristupljeno: 08.08.2019.
6. Yun HM, Ban JO, Park KR, Lee CK, Jeong HS, Han SB, Hong JT. Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic. *Pharmacol. Ther.* 2014;142(2):183–195.
7. Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr*. 2006;36(3):716S–725S.
8. URL:<https://www.farmartghana.com/wp-content/uploads/2016/03/garlic1.jpg> Pristupljeno: 08.08.2019.
9. Hollman P, Arts I. Flavonols, flavones and flavanols- nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*. 2002;80(7),1081-1093.
10. URL:<https://5.imimg.com/data5/YG/XR/MY-32475102/fermented-garlic-500x500.jpeg> Pristupljeno: 08.08.2019.
11. Choi S, Cha HS, Lee YS. Physicochemical and antioxidant properties of black garlic. *Molecules* 2014;19:16811-23.
12. URL:<http://www.blackgarlichasarrived.com/nutrition-facts-and-mineral-content> Pristupljeno: 09.08.2019.
13. Ethos X application reports. Microwave Green Extraction of Natural Products, 2017. str.1-4
14. Gedye RN, Smith FE, Westaway KC, Ali H, Baldisera L, Laberge L, Roussel J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis, *Tetrahedron Letters* 1986;27:279.

15. Puharić I. Mikrovalovi i njihove primjene. Završni rad. Odjel za fiziku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. 2016 (na hrvatskom jeziku).
16. Kaufmann B, Christen P. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction, *Phytochem. Anal.* 2002;13:105–113.
17. Bousbia N, Vian AM, Ferhat MA, Petitcolas E, Meklati BY, Chemat F. (2009): Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity, *Food Chem.* 2009;114:355–362.
18. Font N, Hernandez F, Hogendoorn EA, Baumann RA, van Zoonen P. Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography–UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *J Chrom A.* 1998;798:179–186.
19. Amerine MA, Ough CS. *Methods for Analysis of Musts and Wines.* New York: John Wiley & Sons, 1980.
20. Lončar R. Biološka aktivnost ekstrakta petrovca (*Crithmum maritimum* L.) u različitim periodima vegetacije. Završni rad. Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu; 2016 (na hrvatskom jeziku).
21. Mihajlovski M. Utjecaj perioda branja na fenolni profil i antioksidacijska svojstva petrovca. Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu; 2016 (na hrvatskom jeziku).