

Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva

Monika Blekić¹, Anet Režek Jambrak^{1*}, F. Chemat²

¹Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

²Sveučilište u Avignonu, UMR A 408 INRA, 33 Rue Louis Pasteur, 84029 Avignon, Francuska

pregledni rad

Sažetak

Mikrovalna ekstrakcija predstavlja novu tehniku tretiranja i procesiranja prehrambenih proizvoda. U radu su prikazani primjeri mikrovalne ekstrakcije bioaktivnih spojeva. Prikazan je novi inovativni uređaj za mikrovalnu ekstrakciju i hidrodifuziju s gravitacijom. Prikazane su prednosti korištenja ovog uređaja, a to je kraće vrijeme ekstrakcije i ekstrakcija sa ili bez otapala. Nova metoda je uspoređivana sa standardnim metodama ekstrakcije. Mogu se vidjeti pozitivne i negativne strane mikrovalnog tretiranja te njihov utjecaj na razvoj oksidacije u suncokretovom ulju podvrgnutom mikrovalnom grijanju te uporaba mikrovalova kod ekstrakcije eteričnih ulja. Prikazane su i prednosti mikrovalne ekstrakcije eteričnih ulja iz aromatskog bilja bez uporabe otapala u usporedbi sa standardnom ekstrakcijom te određivanje antioksidativnih komponenata u ulju rižinih mekinja ekstrahiranih metodom mikrovalova. Opisana je usporedba mikrovalova i ultrazvuka, te pozitivne i negativne strane kombinacije mikrovalova i ultrazvuka.

Cljučne riječi: mikrovalovi, ekstrakcija, ultrazvuk, bioaktivni spojevi

Uvod

Najjednostavniji primjer korištenja mikrovalova u prehrambenoj industriji je mikrovalna pećnica. Danas su mikrovalne pećnice sve češće sastavni dio kuhinjske opreme i korisna su dopuna pripremanju hrane na klasičan način. Mikrovalovi se koriste u prehrambenoj industriji, ne samo za pečenje, zagrijavanje, sušenje, odmrzavanje, blanširanje, dehidraciju, već i za druge operacije, kao što su pasterizacija i sterilizacija mnogih vrsta namirnica.

Mikrovalovi imaju ograničen energetski potencijal pa ne uzrokuju promjene u strukturi tvari, njihove molekule titraju i međusobno se taru što uzrokuje samo porast temperature, a taj je efekt iskorišten u mikrovalnim pećnicama za kuhanje i sušenje. Mikrovalovi se mogu koristiti i sa svrhom inaktivacije mikroorganizama, što predstavlja mikrovalnu pasterizaciju (Chemat i sur., 2004a). Ona je primijenjena na nekoliko prehrambenih proizvoda, međutim, moguće nejednako zagrijavanje može biti jedna od glavnih prepreka za primjenu mikrovalnog zagrijavanja kod standardne pasterizacije i sterilizacije u prehrambenoj industriji.

U novije vrijeme razvijena je brza i pouzdana analitička metoda ekstrakcije koja također koristi mikrovalove (mikrovalna ekstrakcija). Mikrovalna ekstrakcija se često primjenjuje za analizu tragova organskih spojeva kod krutih uzoraka. Također se primjenjuje za ekstrakciju prirodnih spojeva kao što su flavanoidi i kofein, te polifenolnih spojeva iz čaja i

sjemenki grožđa. Mikrovalnom ekstrakcijom ili ekstrakcijom u kombinaciji ultrazvuka i mikrovalova, moguće je dobiti slične udjele ekstrahiranih tvari kao i standardnim metodama ali uz puno kraće vrijeme, što je energetski i ekonomski isplativo (Abert, 2008). Međutim, potrebno je obratiti pažnju i na negativne učinke primjene mikrovalova i ultrazvuka kao što su povišene temperature što može negativno utjecati na bioaktivne spojeve i kvalitetu ekstrahiranog materijala. Mikrovalna ekstrakcija se smatra kao potencijalna alternativa tradicionalnoj kruto-tekućoj ekstrakciji za ekstrakciju metabolita iz biljaka. Mikrovalna ekstrakcija se koristi za ekstrakciju nutraceutika iz više razloga kao što su smanjenje vremena ekstrakcije, smanjena uporaba otapala i poboljšani ekstrakcijski prinos.

Mikrovalovi

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja frekvencije oko 2450 MHz u frekvencijskom rasponu od 1 GHz do 300 GHz, što ih svrstava u obitelj valova kojima se prenose radijski i televizijski signali. Mikrovalovi su radio valovi od 0,3 do 300 GHz (Wnag i Weller, 2006).

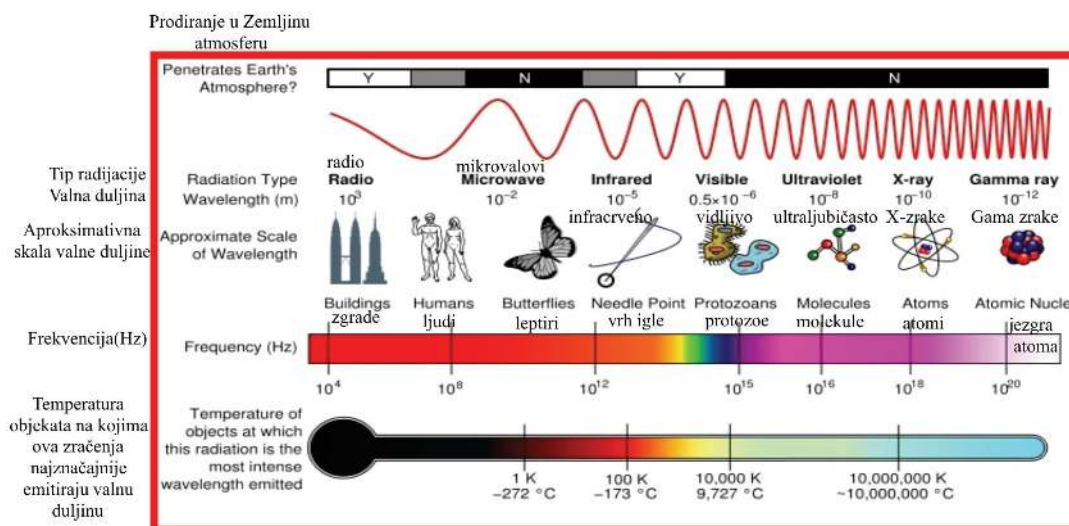
Mikrovalovi se koriste: u radarskoj tehnici, u mobitelima, satelitskoj televiziji itd. Karakteristike mikrovalova su to da se obijaju od metala, prolaze kroz papir, staklo i plastiku te u hrani zagrijavaju vodu. Radiovalovi u rasponu frekvencija od oko 2,5 GHz imaju zanimljivo svojstvo, a to je da ih voda, masti i

*Corresponding author: Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Croatia; tel: +38514605035; fax: +38514605072, arezek@pbf.hr

šećeri konvertiraju direktno u gibanje, a ono se pretvara u toplinu (Gedye i sur., 1986; Giuerre i sur., 1986).

Prema definiciji, elektromagnetsko zračenje zapravo je gibanje energije i nastaje kao fizikalni fenomen protoka električne struje kroz vodič. Elektromagnetski valovi su titraji međusobno povezanog električnog i magnetskog polja, koji se šire prostorom. Protok struje kroz žicu rezultira stvaranjem dva polja, električnog i magnetskog, koja okružuju vodič, a promjena smjera gibanja struje

(elektrona) uzrokuje pulsiranje oba polja i stvaranje elektromagnetskih valova koji se šire okomito na smjer struje koja ih je izazvala (Chemat i sur., 2004a). Mikrovalovi, valovi kojima se prenose audio/video signali, infracrvene zrake i zrake vidljive svjetlosti pripadaju neionizirajućem zračenju, dok se ultraljubičaste, rendgenske, gama i kozmičke zrake svrstavaju u ionizirajuće zračenje koje velikim frekvencijama uzrokuju promjene u strukturi materije pa je izuzetno opasno za zdravlje (Slika 1).



Slika 1. Frekvencija i valna duljina mikrovalova
Fig. 1. Frequency and wavelength of microwaves

Korištenje energije mikrovalova u laboratorijima je opisano prvi puta 1986. godine istodobno kod autora (Gedye i sur., 1986; Giuerre i sur., 1986) za organske sinteze i za ekstrakciju bioloških uzoraka za analizu organskih spojeva (Ganzler i sur., 1986; Lane i Jenkins, 1984).

Mikrovalovi imaju ograničen energetski potencijal pa ne uzrokuju promjene u strukturi tvari -njihove molekule uzrokuju samo porast temperature, a taj je efekt iskorišten u mikrovalnim pećnicama za kuhanje i sušenje.

Mikrovalne pećnice rade na principu energije mikrovalova- elektromagnetskog zračenja koje nastaje kao fizikalni fenomen koji se pojavljuje protokom električne struje kroz vodič. Ubrzo je mikrovalna tehnologija osvojila prehrambenu industriju – zbog visokih temperatura koje postiže, koristili su je pri proizvodnji čipsa, sušenju i prženju kave i kikirikija, a kad se otkrilo da brzo suši papir i kožu, našla je i širu primjenu.

Ekstrakcija

Ekstrakcija je učinkovita i brza metoda razdvajanja i koncentriranja tvari. Ekstrakcija tvari iz homogenih smjesa provodi se na osnovi njene različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Ekstrakcijom dobivamo tvar za čije je izdvajanje u čistom obliku potrebno dobivenu otopinu otpariti ili kristalizirati (Lianfu i Zelong, 2008).

Za ekstrakciju se koriste različite konvencionalne metode kao što su: 1. Destilacija: direktna destilacija eteričnih ulja, destilacija vodenom parom ili destilacija vodom i parom; 2. Ekstrakcija otapalima: ekstrakcija otapalom/ima, maceracija, ekstrakcija s uljima; 3. Hladno prešanje; 4. Nekonvencionalne tehnike: ekstrakcija superkritičnim fluidima, Turbo – ekstrakcija, Ekstrakcija s električnom energijom, Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom. Općenito za ekstrakciju vrijedi slijedeće: Kod ekstrakcije čvrstih tvari treba povećati površinu uzajamnog djelovanja među fazama (usitnjavanjem), u sredini treba povećati brzinu gibanja faza, za povećanje količine tvari, treba produljiti vrijeme trajanja ekstrakcije (Eskilsson i Bjorklund, 2000). Ekstrakcija organskih

tvari iz čvrste faze može se izvoditi pri sobnoj temperaturi (maceriranje, perkoliranje) i pri povišenoj temperaturi. Ekstrakcija pri povišenoj temperaturi može se izvesti zagrijavanjem s otapalom u aparaturi s povratnim vodenim hladilom. Druga metoda ekstrakcije pri povišenoj temperaturi je kontinuirana i višekratna i izvodi se u Soxhlet aparatu. Ekstrakcija se može odvijati kao kontinuirana i diskontinuirana, jednostepena, višestepena, višestepena protustrujna, ekstrakcija unakrsnim stupanjem s jednim otapalom.

Mikrovalna ekstrakcija

Upotreba dielektričnog zagrijavanja u laboratorijima, koristeći mikrovalove započela je kasnih 70-tih, te je prvo upotrijebljena u prehrambenoj industriji. Dielektrično zagrijavanje ovisi o sposobnosti materijala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu. Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka simultano i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks te na taj način potiče otapanje (Spar Eskilsson i Bjourklund, 2000).

Postoje dvije vrste komercijalno dostupnih sustava mikrovalne ekstrakcije, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi, te u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku (Kaufmann i Christen, 2002). Sistem mikrovalne ekstrakcije u zatvorenim posudama se općenito koristi za ekstrakciju pri uvjetima niske ili visoke temperature ekstrakcije. Tlak u posudi bitno ovisi o količini i vrelištu otapala (Cravotto i sur., 2008).

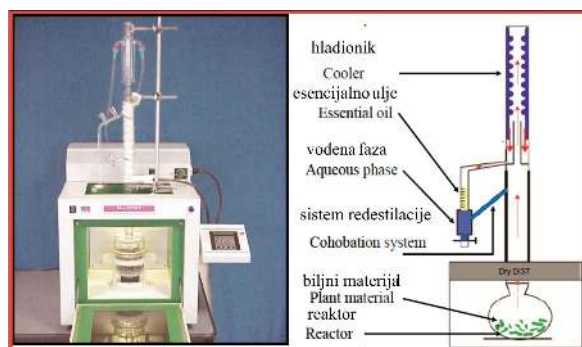
Mikrovalna ekstrakcija se može koristiti za izdvajanje temperaturno osjetljivih spojeva kao što su eterična ulja (Brachet i sur., 2002). Međutim utvrđeno je da je mikrovalna ekstrakcija neučinkovita ukoliko se provodi iz potpuno suhih ili svježih neosušenih materijala uz heksan kao ekstrakcijsko otapalo (Molins i sur., 1997). Veličina čestica i

raspodjela veličina obično imaju značajan utjecaj na učinkovitost mikrovalne ekstrakcije. Veličine čestica ekstrahiranih tvari su obično u rasponu od $100 \mu\text{m}^2$ mm (Spar Eskilsson i Björklund, 2000).

Izbor otapala je u mikrovalnoj ekstrakciji jako važan. Izbor otapala ovisi o topljivosti željenog ekstrakta, o interakciji između otapala i matriksa te o svojstvima otapala određenim dielektričnom konstantom, da upijaju mikrovalove. Obično, izabrano otapalo treba posjedovati visoku dielektričnu konstantu i mogućnost dobrog upijanja energije mikrovalova (Bousbia i sur., 2009). Otapala poput etanola, metanola i vode dovoljno su polarna da bi se mogli zagrijati mikrovalnom energijom (Font, 1998; Brachet i sur., 2002).

Temperatura je još jedan važan faktor za mikrovalnu ekstrakciju, općenito, povišenje temperature rezultira boljim ekstrakcijskim učinkom. Međutim, za ekstrakciju termo-labilnih spojeva, visoke temperature mogu uzrokovati razgradnju ekstrakata. Izabrana snaga mikrovalova tijekom mikrovalne ekstrakcije mora biti pravilno postavljena kako bi se izbjeglo prekoračenje temperature, što dovodi do razgradnje termoosjetljivih supstanci (Font i sur., 1998).

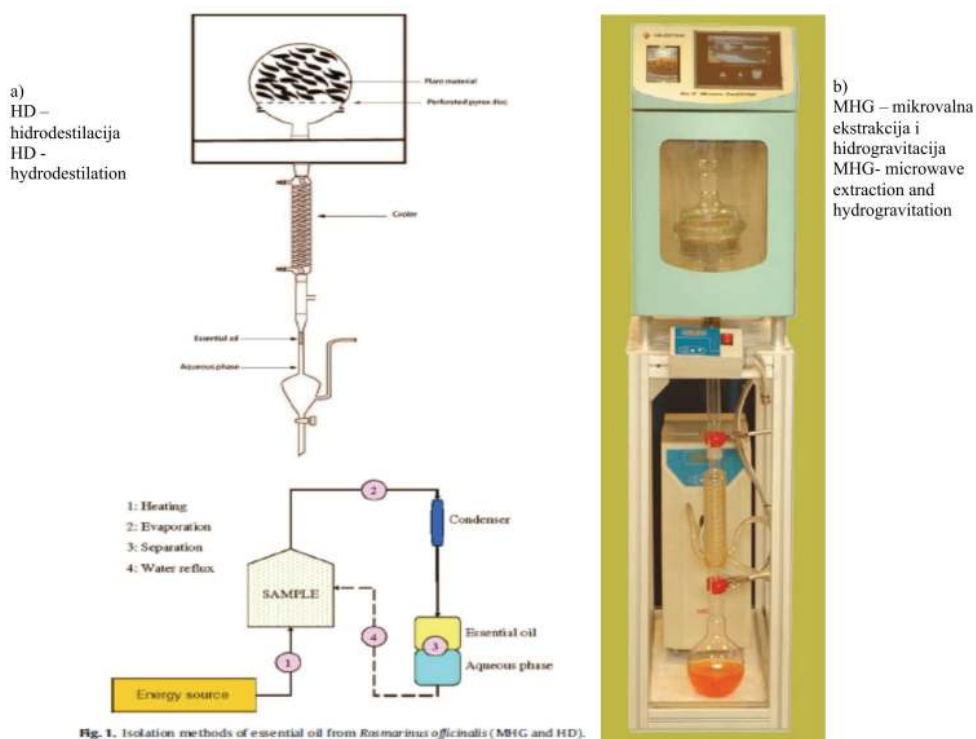
Na Slici 2 prikazan je primjer uređaja za mikrovalnu ekstrakciju, dok je na Slikama 3 i 4 prikazan uređaj za mikrovalnu ekstrakciju s hidrogravitacijom. Uređaj je osmišljen na Sveučilištu u Avignonu kod prof. Farid Chemata koji ga je u suradnji s tvrtkom Milestone Technologies patentirao. Ova dva postupka razlikuju se faktorom kolekcije ekstrahiranih tvari: u prvom slučaju (Slika 2), vrši se kondenzacija s vodenim hladilom za što se mora trošiti energija i vrijeme. S druge strane, (Slike 3 i 4), tu je nova metoda primjene mikrovalne energije u ekstrakciji gdje se kolekcija ekstrahiranog materijala vrši korištenjem sile gravitacije. Znači jednostavnim postupkom bez utroška energije i vremena, ekstrahirana tvar se skuplja na dno uređaja u posudu. Na Slici 4 prikazan je shematski prikaz ekstrakcija korištenjem obje metode (Ferhat i sur., 2007; 2008).



Slika 2. Uređaj za mikrovalne ekstrakcije (Ferhat i sur., 2007)
Fig. 2. Apparatus for microwave extraction (Ferhat et al., 2007)



Slika 3. Uređaj za mikrovalne ekstrakcije i hidrodestilaciju s gravitacijom (Bousbia i sur., 2009) (Zahvaljujući prof. Farid Chematu i Milestone Technologies (EOS-GR, Milestone Tecnologies))
Fig. 3. Apparatus for microwave extraction and hydrodistillation with gravity (Bousbia i sur., 2009) (Thanks to prof. Farid Chemat and Milestone Technologies (EOS-GR, Milestone Tecnologies))



Slika 4. Metode izolacije eteričnih ulja iz biljke *Rosmarinus officinalis*
 ((a) HD – hidrodestilacija te (b) MHG – mikrovalna ekstrakcija i hidrogravitacija)
Fig. 4. Isolation methods of essential oils from herb *Rosmarinus officinalis*
 ((a) HD – hydrodistillation and (b) MHG- microwave extraction and hydrogravitation)

Neki od primjera mikrovalne ekstrakcije prikazani su sažeto u Tablici 1.

Primjeri mikrovalne ekstrakcije:

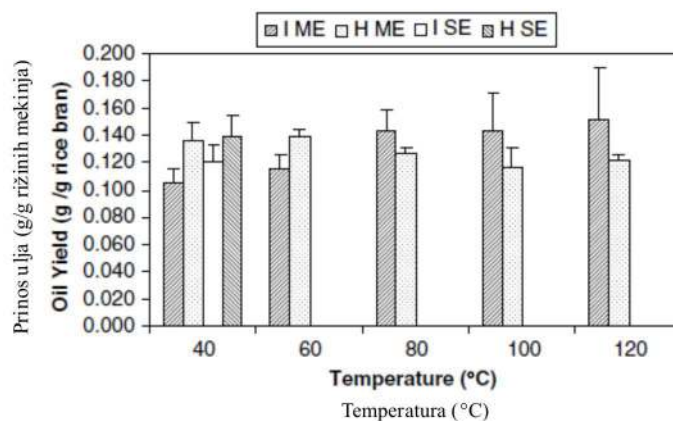
Tablica 1. Primjeri mikrovalne ekstrakcije
Table 1. Examples of microwave extraction

Materijal/ Material	Tretman/ Treatment	Snaga i frekvencija/ Power and frequency	Temperatura/ Temperature	Vrijeme tretmana/ Treatment time	Rezultati/ Results
ulje rižinih mekinja/ oil from rice bran	standardna ekstrakcija/ standard extraction mikrovalna ekstrakcija/ microwave extraction	/ 500 W	40 °C 40, 60, 80, 100, 120 °C	15 minuta/ 15 minutes 15 minuta/ 15 minutes	primjer /example 4.1.1. (Zigoneanu i sur., 2008)
aromatično bilje/ aromatic herbs	hidrodestilacija/ hydrodistillation mikrovalna destilacija bez korištenja otapala/ microwave distillation without usage of solvents	/ 500 W 2455 MHz	nepoznato/ unknown 100 °C	4,5 sati/ 4.5 hours 30 minuta/ 30 minutes	primjer /example 4.1.2. (Lucchesi i sur., 2004)
suncokretovo ulje/ sunflower oil	mikrovalna ekstrakcija/ microwave extraction	2450 MHz	25-100 °C	2,4,6,8 i 10 sata/ 2,4,6,8 and 10 hours	primjer /example 4.1.3. (Erkan i sur., 2009)
eterična ulja/ essential oil	mikrovalna hidrodifuzija/ microwave hydrodiffusion	2,45 GHz 1 W g ⁻¹	nepoznata/ unknown	15 minuta/ 15 minutes	primjer /example 4.1.4. (Bousbia i sur., 2009; Chemat i sur., 2004b; Bousbia i sur., 2009; Bousbia i sur., 2009)

Određivanje antioksidativnih komponenata u ulju rižinih mekinja ekstrahiranih metodom mikrovalova

Ulje rižinih mekinja je ekstrahirano pomoću mikrovalne ekstrakcije sa izopropanolom i heksanom koristeći omjer otapala i rižinih mekinja 3:1 (w/w). Eksperimenti su provedeni u triplicatu pri temperaturama 40, 60, 80, 100 i 120 °C s ukupnim vremenom ekstrakcije 15 min po uzorku. Komponente ulja odvojene su primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije uz uporabu fluorescentnog detektora (HPLC FD). Pokazalo se da je izopropanol najbolje otapalo za ekstrakciju γ -tokoferola i γ -tokotrienola u usporedbi sa heksanom za obje metode (mikrovalnu i standardnu ekstrakciju otapalima) te da je bolji za ekstrakciju pri visokim temperaturama. Uzorci koji su ekstrahirani sa izopropanolom pri visokim temperaturama (120 °C) imali su višu antioksidativnu aktivnost. Tijekom cijelog procesa nisu bile primijećene promjene u prinosu ulja, ukupnih vitamina E i u antioksidativnoj aktivnosti ulja između ove dvije metode (mikrovalna i standardna) na temperaturi 40 °C (Zigoneanu i sur., 2008). Ukupni je prinos ulja rižinih mekinja ekstrahiranih pomoću

izopropanola i heksana standardnom ekstrakcijom na 40 °C i pomoću mikrovalne ekstrakcije na 40, 60, 80, 100, 120 °C prikazan na Slici 5. Prinos ulja pomoću mikrovalne ekstrakcije na 40 °C bio je približno 10 % ulja od svježih rižinih mekinja za izopropanol i približno 14 % ulja za heksan. Kako se povećavala temperatura ekstrakcije na 120 °C, iznos ekstrahiranog ulja je bio 50 % viši kada je izopropanol korišten kao otapalo (Tablica 2). Za heksan, nisu bile primijećene nikakve značajne promjene u količini ekstrahiranog ulja povećanjem temperature ekstrakcije sa 40 na 120 °C (Tablica 2). Standardna ekstrakcija otapalima na 40 °C za izopropanol dala je oko 12 % ulja iz svježih riža mekinja, a to se ne razlikuje značajno od ulja dobivenog mikrovalnom ekstrakcijom pod istim uvjetima. Mikrovalna ekstrakcija je bila usporediva sa standardnom ekstrakcijom otapalom za iste uvjete, 15 min ekstrakcije na 40 °C, pri čemu je dokazano da je mikrovalna ekstrakcija alternativno rješenje za ekstrakciju bioaktivnih spojeva. Predviđeno je da za ekstrakcijsko vrijeme kraće od 15 min, mikrovalna ekstrakcija može biti uspješnija od ekstrakcije otapalom, zbog bržeg zagrijavanja (Zigoneanu i sur., 2008).



Slika 5. Dobivena količina ulja metodom standardne ekstrakcije otapalima i mikrovalnom metodom koristeći izopropanol i heksan kao otapala u ekstrakciji (I = izopropanol, H = heksan, ME = mikrovalna-ekstrakcija, SE = standardna ekstrakcija otapalom) n = 6 (Zigoneanu i sur., 2008)

Fig. 5. Oil yield obtained with standard solvent extraction method and microwave method using isopropanol and hexan as extraction solvents ((I = isopropanol, H = hexan, ME = microwave extraction, SE = standard solvent extraction) n = 6 (Zigoneanu et al., 2008)

Tablica 2. Prinos ulja, ukupnih vitamina E, komponenti vitamina E, određivanje mogućnosti DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) kao funkcije temperature korištenjem mikrovalne ekstrakcije i određenog tipa otapala (Zigoneanu i sur., 2008)

Table 2. Oil yield, yield of total vitamin E, components of vitamin E, determination of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) as a function of temperature with usage of microwave extraction and specific solven type (Zigoneanu i sur., 2008)

Temperatura (°C)	otapalo	ulje ^A	vitamin E ^B	α-tokofero ^B	α- tokotrienol ^B	γ-tokofero ^B	γ- tokotrienol ^B	trolox ekvivalent ^C
Temperature (°C)	Solvent	Oil ^A	Vitamin E ^B	α-Tocopherol ^B	α-Tocotrienol ^B	γ-Tocopherol ^B	γ-Tocotrienol ^B	Trolox equivalent ^C
40	I	0.10 ± 0.01 ^a	95.41 ± 2.38 ^{a,b,c}	43.89 ± 2.23 ^{a,b}	8.19 ± 0.19 ^a	5.37 ± 0.16 ^{b,c,d}	37.96 ± 1.21 ^{c,d}	33.61 ± 7.35 ^a
60	I	0.12 ± 0.01 ^{a,b}	97.46 ± 1.76 ^{a,b,c}	43.83 ± 2.30 ^{a,b}	8.27 ± 0.66 ^a	5.44 ± 0.09 ^{b,c,d,e}	39.93 ± 0.50 ^{c,d}	34.40 ± 1.80 ^a
80	I	0.14 ± 0.0 ^{c,d}	124.56 ± 13.26 ^{a,b,c}	59.16 ± 12.67 ^b	15.31 ± 1.72 ^a	6.33 ± 0.07 ^{c,d,e}	43.76 ± 1.47 ^d	45.49 ± 6.13 ^{a,b,c}
100	I	0.14 ± 0.03 ^{c,d}	137.80 ± 15.47 ^{b,c}	64.69 ± 9.26 ^b	22.74 ± 0.99 ^a	6.90 ± 0.98 ^{d,e}	43.48 ± 5.34 ^d	51.11 ± 3.75 ^{b,c}
120	I	0.15 ± 0.04 ^d	152.31 ± 11.35 ^c	47.79 ± 3.83 ^{a,b}	54.50 ± 4.17 ^a	7.29 ± 0.50 ^e	42.73 ± 3.68 ^d	59.85 ± 6.41 ^c
40	H	0.14 ± 0.01 ^{b,c,d}	56.22 ± 28.15 ^a	26.54 ± 15.23 ^a	9.07 ± 3.11 ^a	3.25 ± 1.11 ^a	17.36 ± 8.74 ^a	41.38 ± 3.93 ^{a,b}
60	H	0.14 ± 0.01 ^{b,c,d}	81.49 ± 7.62 ^{a,b,c}	34.86 ± 6.28 ^a	12.90 ± 1.25 ^a	4.42 ± 0.17 ^{a,b}	29.31 ± 0.67 ^{b,c}	42.58 ± 1.45 ^{a,b}
80	H	0.13 ± 0.00 ^{a,b,c,d}	66.40 ± 10.67 ^{a,b}	26.04 ± 4.45 ^a	14.90 ± 2.18 ^a	3.44 ± 0.75 ^a	22.01 ± 3.62 ^{a,b}	38.84 ± 9.45 ^{a,b}
100	H	0.12 ± 0.01 ^{a,b}	98.19 ± 14.80 ^{a,b,c}	27.49 ± 7.20 ^a	45.99 ± 5.44 ^a	3.71 ± 1.03 ^{a,b}	21.00 ± 4.64 ^{a,b}	39.02 ± 4.64 ^{a,b}
120	H	0.12 ± 0.00 ^{a,b,c}	248.50 ± 78.11 ^d	35.49 ± 3.62 ^a	183.76 ± 72.70 ^b	4.77 ± 0.41 ^{a,b,c}	24.49 ± 3.10 ^{a,b}	43.55 ± 2.73 ^{a,b}

I = Izopropanol; H = heksan.

^A Prinos ulja iz zrna izražen kao g g⁻¹ svježih rižinih mekinja.

^B Ukupni vitamin E i komponente vitamina E su izražene kao μ g g⁻¹ svježih rižinih mekinja.

^C antioksidacijski kapacitet izražen kao μmol Trolox ekvivalenta g⁻¹ svježih rižinih mekinja. Statistički značajno različite vrijednosti (p <0,05) ulja, vitamina E, komponenti vitamina E, određivanja DPPH sposobnosti u istom stupcu označene su različitim slovima^{a, b, c, d, e} n = 3.

I = Isopropanol; H = hexane.

^A Oil yield expressed as g g⁻¹ of fresh rise bran.

^B Total vitamin E and vitamin E components expressed as μ g g⁻¹ fresh rise bran.

^C DPPH scavenger ability expressed as Trolox equivalent in μ mol g⁻¹ as fresh rise bran. Statistically significant values (p<0.05) of oil yield, vitamin E, vitamin E components yield, determination of DPPH ability in same column are denoted with different letters^{a, b, c, d, e} n = 3.

Ukupni vitamin E je izražen kao suma svih četiri analiziranih komponenata vitamina E (α- tokoferola, α- tokotrienola, γ-tokoferola, γ- tokotrienola). Utjecaj temperature, tip otapala i ekstrakcijske metode na komponente vitamina E u ulju rižinih mekinja nema značajne razlike između standardne metode i metode ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, bez obzira

koje smo otapalo koristili. Ukupni vitamin E dobiven standardnom ekstrakcijom otapalima; izopropanolom pri temperaturi 40 °C iznosio je 87,46 μg g⁻¹ svježih mekinja riže i 52,64 μg g⁻¹ kod ekstrakcije gdje je korišten heksan, a slični su rezultati dobiveni i za metodu ekstrakcije potpomognutu mikrovalovima (Zigoneanu i sur., 2008).

Promjena u udjelu za pojedine komponente vitamina E sa temperaturom za mikrovalnu ekstrakciju je prikazana u Tablici 2 te za standardnu ekstrakciju otapalima u Tablici 3. Možemo zaključiti da se primjenom mikrovalne ekstrakcije, uz heksan kao otapalo, pri visokim temperaturama postiže bolja ekstrakcija α -tokotrienola. Za izopropanol se

općenito, povećanjem temperature poboljšava ekstrakcija i α -tokotrienola i γ -tokoferola (Tablica 3). Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da primjenjene metode ekstrakcije (mikrovalne i standardne) ne utječu značajno na promjenu u strukturi ekstrahiranih spojeva (Zigoneanu i sur., 2008).

Tablica 3. Prinos ulja, ukupni vitamin E, komponente vitamina E, određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) u ovisnosti o vrsti otapala pomoću mikrovalne ekstrakcije i standardne ekstrakcije otapalom na 40 °C (Zigoneanu i sur., 2008)

Table 3. Oil yield, yield of total vitamin E, components of vitamin E, determination of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenger ability versus solvent type using microwave extraction with solvent at 40 °C (Zigoneanu i sur., 2008)

	Otapalo	metoda	ulje ^A	vitamin E ^B	α -tokoferol ^B	α -tokotrienol ^B	γ -tokoferol ^B	γ -tokotrienol ^B	trolox ekvivalent ^C
	Solvent	Method	Oil ^A	Vitamin E ^B	α -Tocopherol ^B	α -Tocotrienol ^B	γ -Tocopherol ^B	γ -Tocotrienol ^B	Trolox equivalent ^C
Izopropanol	Isopropanol	ME	0.10 ± 0.01 ^a	95.41 ± 2.38 ^a	43.89 ± 2.23 ^a	8.19 ± 0.19 ^a	5.37 ± 0.16 ^{a,b}	37.96 ± 1.21 ^a	33.61 ± 7.35 ^a
Heksan	Hexane	ME	0.14 ± 0.01 ^b	56.22 ± 28.15 ^{a,b}	26.54 ± 15.23 ^a	9.07 ± 3.11 ^a	3.25 ± 1.11 ^c	17.36 ± 8.74 ^b	41.38 ± 3.93 ^a
Izopropanol	Isopropanol	SE	0.12 ± 0.01 ^{a,b}	87.46 ± 7.41 ^{a,b}	32.50 ± 5.03 ^a	8.48 ± 0.45 ^a	5.94 ± 0.13 ^a	40.54 ± 1.89 ^a	33.86 ± 3.52 ^a
Heksan	Hexane	SE	0.14 ± 0.02 ^b	52.64 ± 9.08 ^b	20.73 ± 7.30 ^a	8.31 ± 0.99 ^a	3.93 ± 0.64 ^{b,c}	19.68 ± 3.30 ^b	41.64 ± 5.04 ^a

^A Prinos ulja iz zrna je izražen kao g g⁻¹ svježih rižinih mekinja.

^B Ukupni vitamin E i komponente vitamina E su izražene kao μ g g⁻¹ svježih rižinih mekinja.

^C Antioksidacijski kapacitet izražen kao μ mol Trolox ekvivalenta g⁻¹ svježih rižinih mekinja. Statistički značajno različite vrijednosti (p < 0,05) ulja, vitamina E, komponenti vitamina E, određivanja DPPH sposobnosti u istom stupcu označene su različitim slovima^{a, b, c}. n = 3.

^A Oil yield expressed as g g⁻¹ of fresh rise bran.

^B Total vitamin E and vitamin E components expressed as μ g g⁻¹ fresh rise bran.

^C DPPH scavenger ability expressed as Trolox equivalent in μ mol g⁻¹ as fresh rise bran. Statistically significant values (p < 0.05) of oil yield, vitamin E, vitamin E components yield, determination of DPPH ability in same column are denoted with different letters^{a, b, c, d, e}. n = 3.

Proučavanjem degradacije α -tokoferola djelovanjem mikrovalne ekstrakcije pri povišenoj temperaturi nisu primijećene nikakve značajne promjene. Najvažniji faktor kod standardne ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima je bio povećanje temperature, a rezultati su pokazali da tokom trajanja cijelog procesa ekstrakcije α -tokoferol nije bio uništen. Iz toga svega možemo izvesti zaključak da se za mikrovalnu ekstrakciju pri visokim temperaturama, heksan pokazao kao najbolje otapalo. Niska dielektrična konstanta otapala kao što je heksan koji ne apsorbira mikrovalnu energiju i stoga se ne zagrijava, koristi se kao način da se spriječi razgradnja termolabilne komponente. Nisu uočene značajne promjene u prinosu ulja, ukupnih vitamina E i antioksidativne aktivnosti ulja iz mekinja riže između ove dvije ekstrakcijske metode, standardne ekstrakcije otapalima i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Međutim, zbog skraćenog vremena, ekstrakcija mikrovalovima se pokazala kao brža i bolja metoda, te nije došlo do oštećenja spoja. Možemo sa sigurnošću reći da je učinkovitost i preciznost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, usporediva ili čak i bolja od one standardne ekstrakcije. Mikrovalnom ekstrakcijom moguće je

provesti ekstrakcije iz popuno svježeg uzorka, bez korištenja vode, što obično zahtjeva prilagodbe u standardnoj ekstrakciji (Zigoneanu i sur., 2008).

Mikrovalna ekstrakcija eteričnih ulja iz aromatskog bilja bez uporabe otapala u usporedbi sa standardnom hidrodestilacijom

Mikrovalna ekstrakcija bez korištenja otapala (SFME- Solvent-free microwave extraction) je kombinacija mikrovalnog zagrijavanja i suhe destilacije, provodi se pri atmosferskom tlaku, bez dodavanja otapala ili vode. Izolacija i koncentriranje hlapljivih spojeva obavljaju se u jednom stupnju. SFME je uspoređena s konvencionalnom tehnikom i hidrodestilacijom (HD- hydro-destilation), za ekstrakciju eteričnog ulja iz tri aromatična bilja: bosiljak (*Ocimum basilicum* L.), vrtna metvica (*Mentha crispa* L.), i majčina dušica (*Thymus vulgaris* L.). Eterična su ulja ekstrahirana SFME metodom kroz 30 min te su kvantitativno (prinos) i kvalitativno (aromatski oblici) kao i ona dobivena konvencionalnom ekstrakcijom i hidrodestilacijom u trajanju 4,5 sata. SFME metodom dobiva se eterično ulje s većom količinom vrijednih oksidiranih spojeva, a

uz to omogućuje znatne vremena, energije i biljnog materijala. SFME je "zelena tehnologija" te se uzima kao dobar izbor za ekstrakciju eteričnih ulja aromatičnih biljaka (Lucchesi i sur., 2004).

Kada je eterično ulje ekstrahirano ono se može odmah podvrgnuti analizi plinskom kromatografijom bez dodatnog pročišćavanja ili uparivanja otapala.

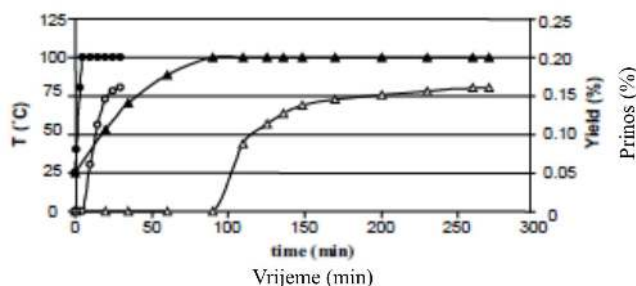
Prednost SFME metode je brzina. Kao što možemo vidjeti na Slici 6, vrijeme ekstrakcije potrebno za SFME metodu je 30 minuta i dobije se prinos ulja usporediv sa prinosom dobivenim hidrodestilacijom koja je trajala 4,5 sati. Prinos ulja dobivenih metodom SFME za bosiljak, vrtnu metvicu i majčinu dušicu su slični, čak malo i veći nego prinosi dobiveni hidrodestilacijom (Lucchesi i sur., 2004).

Gledajući sastav eteričnih ulja, prisutne su znatno veće količine oksidiranih spojeva i prisutni su manji udjeli ugljikovodika u eteričnim uljima aromatičnog bilja ekstrahiranih SFME u odnosu na HD. Veći udio oksidiranih spojeva, dobivenih SFME metodom iz eteričnih ulja, je vjerojatno zbog smanjenja toplinskih i hidrolitičkih efekata, u usporedbi s hidrodestilacijom koja koristi veliku količinu vode, vremena i energije (Lucchesi i sur., 2004). Najveća razlika između kromatograma dobivenih za ove dvije metode su kod bosiljka, kao što je prikazano Slikom 7. Linalol i eugenol su glavne komponente eteričnih ulja ekstrahiranih iz bosiljka. Relativni iznosi se razlikuju za ove dvije metode ekstrakcije. Eugenol je komponenta u najvećem udjelu kod SFME ekstrakta (43 %), a linalol kao druga komponenta u udjelu (25 %). Kod HD ekstrakcije, dominirao je prvo linalol (39 %), a zatim eugenol (11 %). Eterična ulja iz bosiljka ekstrahiranih hidrodestilacijom i eterična ulja iz majčine dušice ekstrahiranih SFME metodom su najbogatiji u smislu broja organskih spojeva. Relativno mali broj novih spojeva je pronađen kao rezultat SFME ekstrakcije, ali oni su bili prisutni u vrlo malim količinama (Lucchesi i sur., 2004).

Gubitak nekih spojeva u SFME u usporedbi s HD nije zbog toga da ti spojevi nisu ekstrahirani, nego da smanjenje ekstrakcijskog vremena i količina vode u SFME metodi smanjuje razgradnju spojeva hidrolizom, trans-esterifikacijom odnosno oksidacijom.

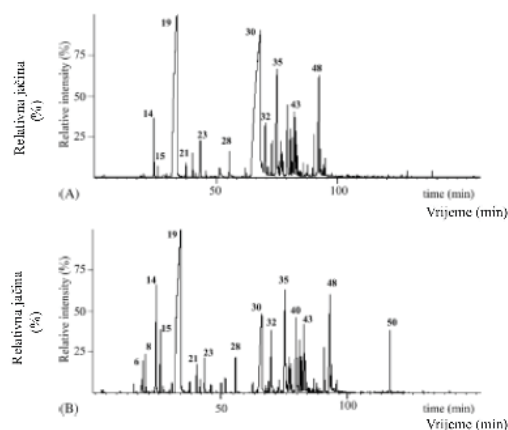
U prilog SFME metodi ide to što ima manji utrošak energije i materijala, te je količina otpuštenog CO₂ u atmosferu značajno manja nego kod hidrodestilacije. Korištenjem SFME dobivamo više vrijednijih eteričnih ulja, a uz to imamo i uštedu na energiji. Uz to, još je prednost takve metode naspram standardnoj i to što ima skraćeno vrijeme ekstrakcije (s 4,5 sata na 30 minuta). Prema tome, sve ove prednosti ukazuju na to da je SFME metoda bolja nego

standardna hidrodestilacija za ekstrakciju eteričnih ulja iz aromatskog bilja (Lucchesi i sur., 2004).



Slika 6. Temperaturni učinci (● SFME ▲ HD) i prinosi (○ SFME △ HD) kao funkcija vremena za SFME i HD ekstrakciju eteričnih ulja za majčinu dušicu (Lucchesi i sur., 2004)

Fig. 6. Temperature effects (● SFME ▲ HD) and yields (○ SFME △ HD) as a function of time for SFME and HD (Lucchesi et al., 2004)



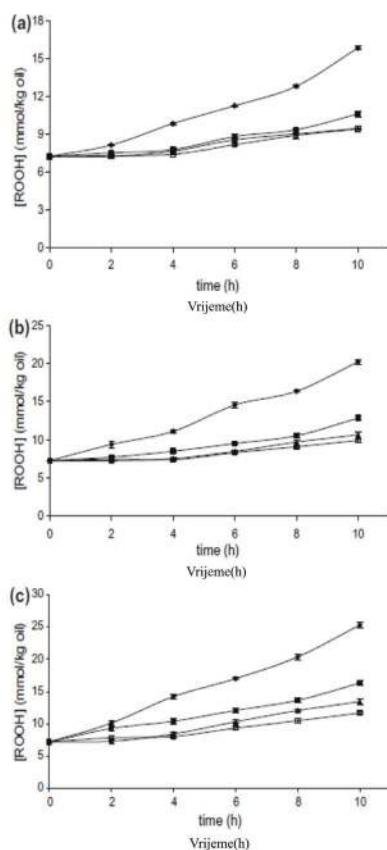
Slika 7. Usporedba plinske kromatografije za eterično ulje bosiljka dobiveno SFME (A) i HD (B) (Lucchesi i sur., 2004)

Fig.7. Comparison of gas chromatography for essential oil of basilica obtained by SFME (A) and HD (B) (Lucchesi et al., 2004)

Kinetička istraživanja o razvoju oksidacije u suncokretovom ulju podvrgnuto mikrovalnom grijanju: efekt prirodnih oksidansa

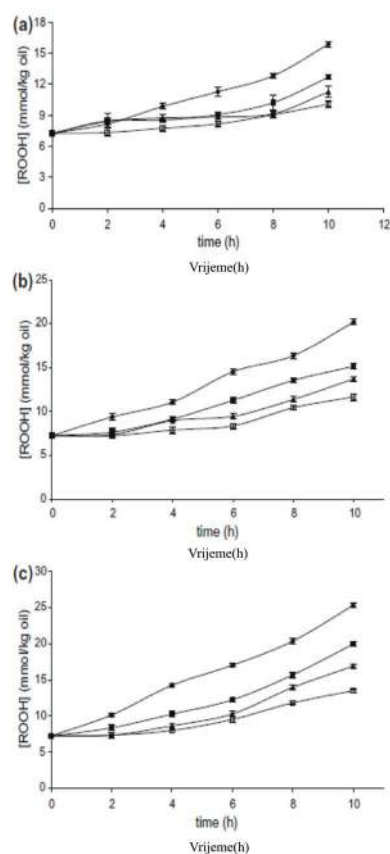
Antioksidativni učinci karnozinske kiseline i sezamola na suncokretovo ulje pod utjecajem mikrovalova kao funkcija temperature i vremena. Koncentracije konjugiranog dien-hidroperoksida i p-anisidina određene su spektrofotometrijski, kao mjere oksidacije, tijekom mikrovalnog grijanja suncokretova ulja sa ili bez dodanih antioksidanasa na 40 °C, 60 °C i 80 °C.

Udjeli dodanih antioksidansa koji se nalaze u suncokretovom ulju poslije mikrovalnog tretmana na različitim temperaturama određeni su HPLC-DAD. Dokazano je da je karnozinska kiselina učinkovitiji antioksidans od sezamola za suncokretovo ulje (Erkan i sur., 2009). Stvaranje konjugiranog diena hiperoksida, oksidacijom pročišćenog suncokretovog ulja grijanog samog, te u prisutnosti karnozinske kiseline i sezamola dodanog u koncentracijama od 0,005 g na 100 g, 0,01 g na 100 g ili 0,02 g na 100 g u temperaturno kontroliranoj mikrovalnoj pećnici na 40, 60 i 80 °C praćeno je svaka 2,4,6,8 i 10 h perioda zagrijavanja. Analiza konjugiranog diena hidroperoksida određena je apsorbancijom putem UVspektrofotometra (spektroskopijom) pri valnoj duljini od 234 nm (Erkan i sur., 2009). Rezultati su prikazani na Slici 8 za karnozinsku kiselinu i na Slici 9 za sezamol.



Slika 8. Koncentracije konjugiranih diena u uzorku koji ne sadrži karnozinsku kiselinu (◆); 0.005g/100g karnozinske kiseline (■); 0.01g/100g karnozinske kiseline (▲); 0.02g/100g karnozinske kiseline (□) kao funkcija vremena na (a) 40 °C (b) 60 °C i (c) 80 °C (Erkan i sur., 2009)

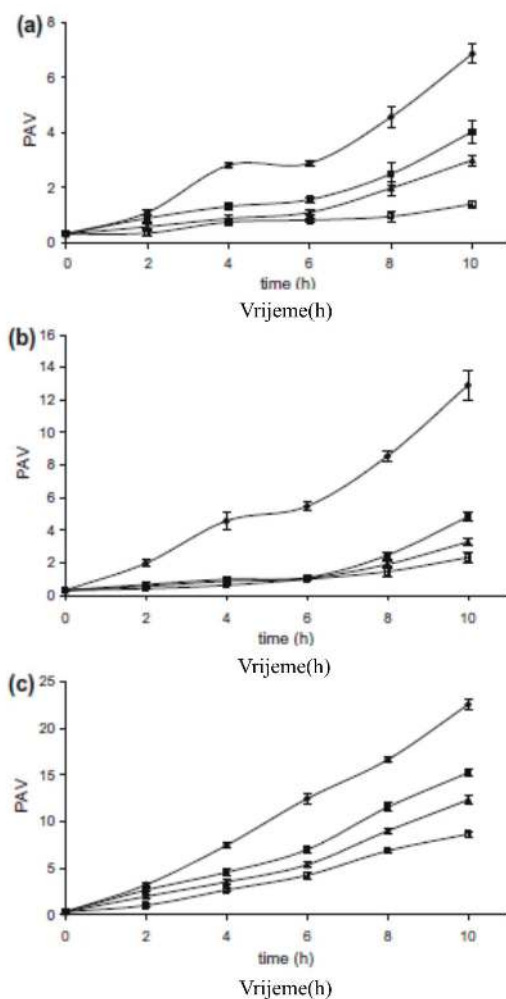
Fig. 8. Concentration of conjugated diens in sample that do not contains carnosic acid (◆); 0.005g/100g carnosic acid (■); 0.01g/100g carnosic acid (▲); 0.02g/100g carnosic acid (□) as a function of time at (a) 40 °C (b) 60 °C and (c) 80 °C (Erkan et al., 2009)



Slika 9. Koncentracija konjugiranih diena hidroperoksida u uzorku ulja koji ne sadrži sezamol (◆); 0.005g/100g sezamola (■); 0.01g/100g sezamola (▲); 0.02g/100g sezamola (□) kao funkcija vremena na (a) 40 °C (b) 60 °C i (c) 80 °C (Erkan i sur., 2009)

Fig. 9. Concentration of conjugated diens of hydroperoxide in oil sample that do not contains sesamol (◆); 0.005g/100g sesamol (■); 0.01g/100g sesamol (▲); 0.02g/100g sesamol (□) as a function of time at (a) 40 °C (b) 60 °C and (c) 80 °C (Erkan et al., 2009)

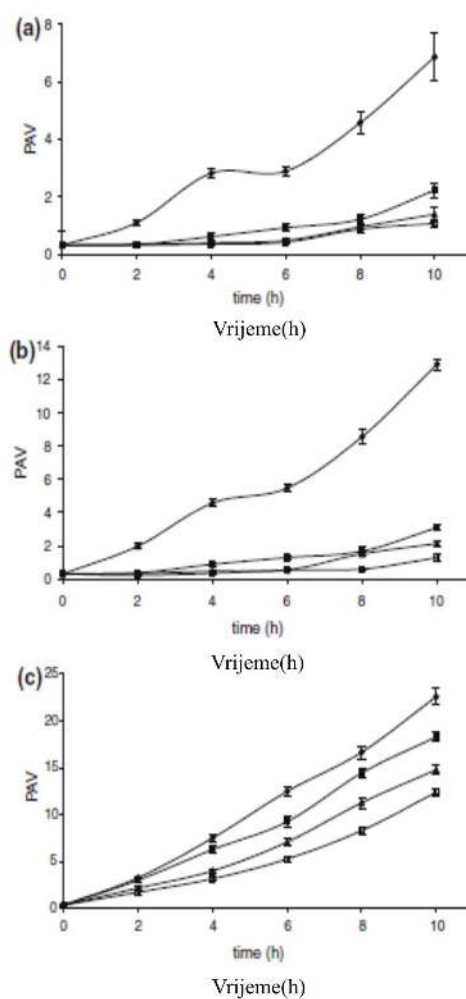
Jasno se vidi iz Slika 8 i 9 da se koncentracije hidroperoksida smanjuju kako se koncentracije, karnozinska kiseline ili sezamola dodane u uzorak ulja, povećavaju. Učinak povećane koncentracije karnozinske kiseline ili sezamola rezultira smanjenjem koncentracije hidroperoksida. To možemo najjasnije vidjeti na 80 °C. Nadalje, vidi se da karnozinska kiselina ima višu aktivnost od sezamola jer daje nižu stopu oksidacije, na sve tri temperature. Druga mjera stupnja oksidacije u biljnim uljima je vrijednost p-anisidina (PAV). Sekundarni produkti lipidne oksidacije su aldehidi, ketoni i laktoni koji su pronađeni u većini oksidiranih supstrata. Slike 10 i 11 pokazuju PAV za p-anisidinsku reaktivnu tvar, koja je formirana kroz oksidaciju suncokretovog ulja na 40, 60 i 80 °C, uz prisutnost karnozinske kiseline i sezamola.



Slika 10. PAV (vrijednost p-anisidina) za p-anisidin reaktivnu supstancu formiranu kroz oksidaciju tijekom mikrovalnog grijanja suncokretovog ulja koji sadrži (◆) bez karnozinske kiseline; (■) 0.005g/100g karnozinske kiseline; (▲) 0.01g/100g karnozinske kiseline i (□) 0.02g/100g karnozinske kiseline na (a) 40 °C i (b) 60 °C i (c) 80 °C (Erkan i sur., 2009)

Fig. 10. PAV (p-anisidine value) for p-anisidine reactive compound formed through oxidation during microwave heating of sunflower oil that contains (◆) without carnosic acid; (■) 0.005g/100g carnosic acid; (▲) 0.01g/100g carnosic acid and (□) 0.02g/100g carnosic acid at (a) 40 °C (b) 60 °C or (c) 80 °C (Erkan et al., 2009)

Oba su antioksidansa uspješna u smanjivanju stvaranja p-anisidinske reaktivne tvari na svim koncentracijama, a pokazalo se da su najučinkovitiji na koncentraciji 0,02 g na 100 g uzorka. Možemo zaključiti da je uobičajeno smanjenje u PAV sa povećanjem koncentracije antioksidansa u svim periodima grijanja najvidljivije na 80 °C (Erkan i sur., 2009).



Slika 11. PAV za p-anisidin reaktivnu supstancu formiranu kroz oksidaciju tijekom mikrovalnog grijanja suncokretovog ulja koji sadrži (◆) bez sezamola; (■) 0.005g/100g sezamola; (▲) 0.01g/100g sezamola i (□) 0.02g/100g sezamola na (a) 40°C i (b) 60 i (c) 80°C (Erkan i sur., 2009)

Fig. 11. PAV (p-anisidine value) for p-anisidine reactive compound formed through oxidation during microwave heating of sunflower oil that contains (◆) without sesamol ; (■) 0.005g/100g sesamol; (▲) 0.01g/100g sesamol and (□) 0.02g/100g sesamol at (a) 40°C (b) 60 or (c) 80°C (Erkan et al., 2009)

Porastom temperature, gubitak oba antioksidansa u svakom razdoblju mikrovalnog zagrijavanja, raste. Koncentracija karnozinske kiseline smanjuje se brže nego koncentracija sezamola tijekom mikrovalnog zagrijavanja uzoraka suncokretova ulja koji imaju istu koncentraciju antioksidansa (karnozinske kiselina ili sezamol). Karnozinska kiselina razgrađuje se više od sezamola tijekom mikrovalnog

zagrijavanja uzoraka koje sadrže oba antioksidansa u smjesi (Erkan i sur., 2009).

Karnozinska kiselina i sezamol korišteni su da bi smanjili stvaranje hidroperoksida tijekom mikrovalnog zagrijavanja suncokretovog ulja. Pokazalo se da su oba antioksidansa učinkovita u smanjenju stupnja oksidacije suncokretovog ulja pri mikrovalnom zagrijavanju; premda je karnozinska kiselina nešto učinkovitija od sezamola. Količine karnozinske kiseline i sezamola koje su ostale u suncokretovom ulju, nakon različitih perioda mikrovalnog grijanja pokazale su da se karnozinska kiselina troši brže nego sezamol. Razlog tome je njen djelomičan raspad pri mikrovalnom zagrijavanju, te njezina potrošnja kada djeluje kao antioksidans.

Mikrovalna hidrodifuzija i gravimetrija, nova tehnika ekstrakcije eteričnih ulja

Mikrovalna hidrodifuzija i gravimetrija (MHG-Microwave hydrodiffusion and gravity) je kombinacija mikrovalova za hidrodifuziju eteričnih ulja iz bioloških materijala i gravimetrije za skupljanje i odvajanje komponenti. MHG se izvodi pri atmosferskom tlaku, bez dodavanja otapala ili vode. MHG je uspoređen sa standardnom tehnikom, hidrodifuzije (HD-hydrodiffusion), za ekstrakciju eteričnog ulja iz: zelene metvice (*Mentha spicata* L.) i mirisne metvice (*Mentha pulegium* L.) koje pripadaju obitelji *Labiatae*. Eterična ulja ekstrahirana MHG kroz 15 minuta, bila su kvantitativno (prinos) i kvalitativno (aromatski oblici) slična onima dobivenim standardnom hidrodifuzijom tijekom 90 min. U Tablici 4 su prikazani ekstrakcijski prinosi eteričnih ulja zelene metvice i mirisne metvice izoliranih primjenom navedenih metoda. Nisu videne nikakve neuobičajene razlike u prinosu ulja između

primjenjenih metoda ekstrakcije (Bousbia i sur., 2009).

Kao što možemo vidjeti na Slici 12, ekstrakcijsko vrijeme od 20 min, koje je potrebno da bi se izvršila ekstrakcija mikrovalovima, daje prinos ulja usporediv onome koje se dobije standardnom hidrodifuzijom za vrijeme trajanja od 90 min. Prinos ulja dobiven za obje ispitivane vrste (zelena metvica i mirisna metvica), je približno jednak, a čak se mikrovalnom ekstrakcijom dobio neznatno veći prinos.

Eterična ulja, iz *M.spicata* L. i *M. pulegium* L., ekstrahirana pomoću MHG i HD imaju jednak sastav. Karvon i kisikov monoterpen su glavne komponente u eteričnom ulju ekstrahiranog iz *M. spicata* L. s jednakim prinosima za obje metode ekstrakcije (40,5 % za HD i 45,5 % za MHG). Lemonen i ugljikovodikov monoterpen su prisutni u iznosu od 10,3 % za MHG i 10,6 % za HD. Linalool i kisikov monoterpen su prisutni u iznosu 3,3 % za HD i u tragovima za MHG (Bousbia i sur., 2009).

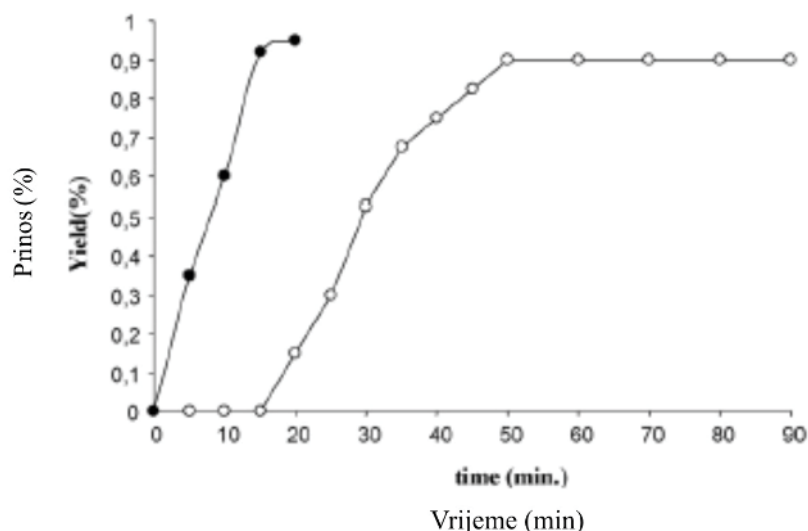
Mikrovalno zračenje dovodi do ubrzanja procesa ekstrakcije, ali bez nanošenja znatne promjene u sastavu hlapljivih ulja. Uzimajući u obzir trošak, energiju, vrijeme i zagađenje okoliša možemo reći da je upravo to jedna od prednosti MHG pred HD. Energija koja je potrebna da bi se provela HD metoda, je 3 kWh, a za MHG 0,2 kWh. Gledajući zagađenje okoliša vidimo da je MHG također bolji izbor metode jer se za HD metodu 2400 g CO₂ ispusti u atmosferu, a za MHG 160 g CO₂ (Chemat i sur., 2004b; Bousbia i sur., 2009; Ferhat i sur., 2008).

Ovakvom novom tehnologijom (MHG) možemo dobiti koncentrirana eterična ulja, bez bilo kakvog zaostalog otapala ili nekog drugog zagađenja. Prednosti takve ekstrakcije su u prinosu i odvajanju ulja, boljem ekstrakcijskom vremenu, boljem sastavu eteričnih ulja, a i u tome što ne zagađuje okoliš.

Tablica 4. Mikrovalna hidrodifuzija i gravimetrija naspram standardne hidrodifuzije (Bousbia i sur., 2009)

Table 4. Microwave hydrodiffusion and gravimetry versus standard hydrodiffusion (Bousbia et al., 2009)

		Mentha spicata L.		Mentha pulegium L.	
		MHG	HD	MHG	HD
		<i>Mentha spicata</i> L.		<i>Mentha pulegium</i> L.	
		MHG	HD	MHG	HD
Vrijeme ekstrakcije(min)	Extraction time (min)	20	90	20	90
Prinos (%)	Yield (%)	0.60	0.59	0.95	0.90
Utjecaj na okoliš (otpušteni g CO ₂)	Environmental impact (g CO ₂ rejected)	160	2400	160	2400



Slika 12. Prikaz prinosa kod mirisne metvice u eteričnom ulju dobivenom MGD (●) i HD (○) kao funkcija ekstrakcijskog vremena (Bousbia i sur., 2009)

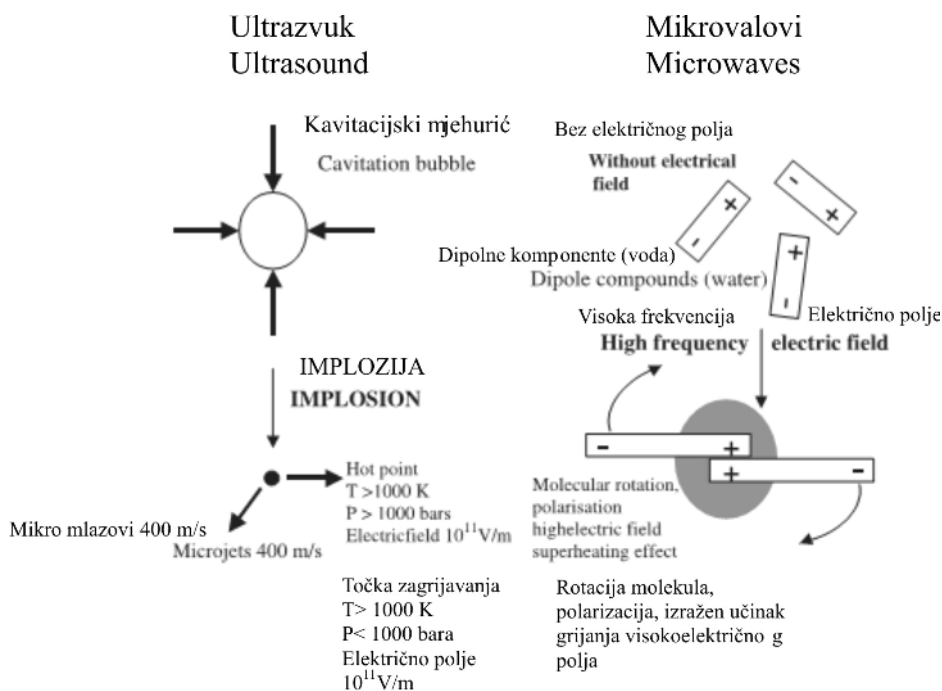
Fig. 12. Yield of essential oil from *Mentha crisper* L. obtained from MGD (●) and HD (○) as function of extractive time (Bousbia et al., 2009)

Kombinacija primjene mikrovalova i ultrazvuka

Usporedba mikrovalnog i ultrazvučnog djelovanja

Primjena ultrazvuka visoke snage kreće se u rasponu frekvencija između 20 kHz i 1 MHz. Ultrazvuk možemo podijeliti u dvije grupe. Dijagnostički ultrazvuk gdje su ultrazvučni valovi niskog intenziteta, niske snage i visoke frekvencije, te ne uzrokuje fizička i kemijska oštećenja materijala kroz koji val prolazi. Koristi se u analitičke svrhe za određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane. S druge strane, ultrazvuk visoke snage gdje su ultrazvučni valovi visokog intenziteta, niske frekvencije i visoke snage (Chemat i sur., 2004b; Krešić i sur., 2008; Drmić i Režek Jambrak, 2011). Uzrokuje fizička oštećenja tkiva, te određene kemijske reakcije, ubrzavanje reakcija, povećanje brzine difuzije, dispergiranje agregata, uništenje enzima i mikroorganizama (Režek Jambrak i sur., 2008; 2009a; 2009b; 2009c). Upotreba ultrazvuka rezultira značajnim poboljšanjem ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim tehnikama kao što su Soxhlet

ekstrakcija zbog manje upotrebe otapala, kraćeg vremena tretmana. Korisna je kod upotrebe kod nižih frekvencija, kod kojih dominiraju mehanički učinci fenomena kavitacije kao turbulencije i strujanja tekućine. Ultrazvuk se može koristiti i u kombinaciji s mikrovalnim zračenjem s ciljem povećavanja stupnja iskorištenja (Chemat i sur., 2004b). Kombinacijom ova dva tipa novih metoda, elektromagnetsko zračenje (2,45 GHz) i mehaničko tretiranje (20 kHz) te njihova uporaba u fizikalnim procesima kao što je razgradnja, otapanje, ekstrakcija čini se dosta zanimljiva. No, ne zna se kako se istovremeno mikrovalno i ultrazvučno zračenje odnosi na fizikalni učinak na tretirani materijal. Stoga, očekuje se, uz to što bi se povećala kinetika razgradnje vjerojatno bi se pojavio i neki novi učinak. Na primjer, visok energetski nivo mjehurića kavitacije pod ultrazvukom može izazvati fragmentaciju čestica i pobuđivanje molekula, a mikrovalna polarizacija može potaknuti dielektrično zagrijavanje volumena i selektivno zagrijavanje čvrstih čestica (Chemat, i sur., 2004b). Sličnost između ultrazvučne kavitacije i mikrovalnog zagrijavanja prikazana je na Slici 13.



Slika 13. Sličnost između ultrazvučne kavitacije i mikrovalnog zagrijavanja (Chemat i sur., 2004b)
Fig. 13. Similarity between ultrasound cavitation and microwave heating (Chemat et al., 2004b)

Ultrazvukom potpomognuta mikrovalna razgradnja

Istodobno djelovanje mikrovalnog zračenja i ultrazvuka je prikazano kao nova tehnika razgradnje krutih i tekućih uzoraka pogodnih za analizu u kemijskoj i prehrambenoj industriji. Takva primjena u analitičkoj kemiji je prikazana kao smanjenje vremena razgradnje u određivanju bakra u jestivim uljima i ukupnog dušika Kjeldahl metodom. Mikrovalovi i ultrazvuk su korišteni da bi se poboljšali neki važni faktori standardnih metoda, kao što su: smanjenje vremena razgradnje, smanjenje količine reagensa, smanjenje onečišćenja, ukupna automatizacija i više sigurnosti. Usporedno je proučavana razgradnja jestivog ulja, analiziran udio bakra i ukupni dušik metodom po Kjeldahl-u.

Tablica 5 prikazuje usporedne vrijednosti ukupnog dušika određenog primjenom klasične standardne metode, mikrovalne metode i kombinacijom mikrovalova i ultrazvuka. Obnovljeni dušik je uspoređen korištenjem triju razgradnih metoda: klasična standardna metoda AFNOR (AFNOR, norme NF V03-050, Paris, 1970), metoda mikrovalovima ili kombinirana metoda ultrazvuka i mikrovalova. Može se primijetiti da su mikrovalna metoda i metoda kombinacije ultrazvuka i mikrovalova dovoljno dobre i pouzdane kao i standardna metoda. Nadalje, ultrazvučno-mikrovalna razgradnja je završena u roku od 10 minuta, dok bi razgradnja klasičnom standardnom metodom trajala više od 3 h. Ultrazvukom i mikrovalovima potpomognuta Kjeldahl metoda čini se kao povoljna za tekućine te viskozne i čvrste proizvode.

Tablica 5. Usporedna određivanja dušika Kjeldahl metodom u hrani i poljoprivrednim proizvodima između mikrovalne i klasične standardne metode (Chemat i sur., 2004a)

Table 5. Comparison of nitrogen determination in food and agricultural products, with Kjeldahl method, microwave and classical standard method (Chemat et al., 2004a)

Hranjivi proizvodi Food products	Klasični Kjeldahl		Kjeldahl pod utjecajem mikrovalova		Kjeldahl u kombinaciji s UZ -MW	
	g %N	t (min)	g %N	t (min)	g %N	t (min)
Cow's milk	0.5	180	0.48	30	0.45	10
Rice	1.04	180	1.18	30	1.1	10
Corn	1.12	180	1.09	30	1.19	10
Flour	1.57	180	1.72	30	1.62	10
Beef	2.67	180	2.81	30	2.91	10
Corned beef	3.69	180	3.61	30	3.53	10
Chickpea	3.20	180	3.35	30	3.55	10
Powdered milk	4.75	180	4.82	30	4.63	10

Prisutnost metala u ulju je nepoželjno, zbog toga što metali mogu ubrzati oksidacijsku razgradnju ulja i smanjiti njegovu trajnost. Učinkovitost zajedničkog

djelovanja ultrazvukom i mikrovalovima na vrijeme razgradnje pokazano je u Tablici 6.

Tablica 6. Učinkovitost zajedničkog djelovanja ultrazvuka i mikrovalova na vrijeme razgradnje (Chemat i sur., 2004a)
Table 6. Efficiency of combined ultrasound and microwave treatment on digestion time (Chemat et al., 2004a)

	Sistem zagrijavanja	Vrijeme razgradnje suncokretovog ulja (min) (prinos > 90%)	Vrijeme razgradnje sezamova ulja (min) (prinos > 90%)
	Heating system	Digestion of sunflower oil time (min) (Yield > 90%)	Digestion of sesame oil time (min) (Yield > 90%)
(1) Mikrovalovi	(1) Microwave	40	50
(2) Standardna	(2) Classical	50	70
(3) Mikrovalovi i ultrazvuk	(3) Microwave and ultrasound	25	35
Učinkovitost (3/2)	Efficiency (3/2)	2	2

Mikrovalna razgradnja (1) je napravljena sa dušičnom kiselinom i vodikovim peroksidom pod mikrovalnim zagrijavanjem. Snaga mikrovalova je bila 180 W, a vrijeme tretiranja je iznosilo 27 min. Klasična razgradnja (2) je provedena u obliku klasičnog grijanja. Primijenjeni su isti uvjeti kao i za razgradnju (1). Razgradnja (3) je izvedena pomoću mikrovalova i ultrazvuka u kombinaciji. Također su primijenjeni uvjeti kao i kod (1) i snaga ultrazvuka je bila 150 W. U kombinaciji mikrovalova i ultrazvuka, ukupni bakar unutar jestivih ulja se razgradio u samo 30 minuta, dok je, klasičnom i mikrovalnom metoda trajalo 40 odnosno 60 min.

Iz dobivenih rezultata analize kombinacija ultrazvuka i mikrovalova se pokazala kao učinkovita metoda te kao nova tehnika za razgradnju (pri atmosferskom tlaku) čvrstih i tekućih uzoraka i pogodna je za kemijsku i prehrambenu analizu. S obzirom na povoljan utjecaj, kratko vrijeme trajanja tretiranja nekog proizvoda i dobivenih dobrih rezultata očekuje se da bi sadašnje metode mogle otvoriti novo istraživačko polje "ultrazvukom potpomognuta mikrovalna razgradnja".

Zaključak

Mikrovalno zagrijavanje hrane je toplinska obrada koja nudi mnoge prednosti u proizvodnji, uključujući brže grijanje, bolji energetski učinak, smanjenje vremena zagrijavanja, preciznu kontrolu procesa, selektivno grijanje gotovih proizvoda itd. U proteklih desetljećima mikrovalno zagrijavanje je zauzelo važno mjesto u analitičkoj i organskoj laboratorijskoj praksi kao jedna jako učinkovita metoda i metoda koja ne onečišćuje okoliš. Razvijena je brza i pouzdana analitička metoda ekstrakcije koja također koristi

mikrovalove. Mikrovalna ekstrakcija je relativno nova metoda koja se može koristiti kao alternativna metoda standardnim metodama za ekstrakciju. Dokazano je da je mikrovalna ekstrakcija korisna u ekstrakciji pesticida, fenola, metala, nekih polimera, jestivih ulja, masti i drugih prirodnih proizvoda. Prednosti takve ekstrakcije su u tome da može biti završena u samo nekoliko minuta, mogu biti korištena i polarna i nepolarna otapala, korištenje manje količine otapala i poboljšanje učinkovitosti i preciznosti ekstrakcije. Štoviše, mikrovalna ekstrakcija se može primijeniti na više uzoraka istovremeno, dakle vrijeme ekstrakcije se može značajno smanjiti. Za djelovanje mikrovalovima na neku namirnicu važno je odabrati odgovarajuću snagu mikrovalova kako bi se omogućila vrlo brza ekstrakcija ali snaga ne smije biti previsoka zbog gubitka hlapljivih spojeva. Uz mikrovalnu ekstrakciju značajna je još i mikrovalna degradacija, sterilizacija te pasterizacija. Također je moguća kombinirana upotreba ultrazvuka i mikrovalova u metodama ekstrakcije zbog poboljšanja nekih važnih faktora oba procesa u odnosu na standardne metode, kao što su smanjenje vremena razgradnje, smanjenje količine reagensa, smanjenje onečišćenja, ukupna automatizacija i više sigurnosti.

Literatura

- Anonymus 1, <http://mikrovalna.blogspot.com/2009/05/pravilno-koristenje-mikrovalne-pecnice.html>; <pristupljeno; 15.04.2011>
- Abert, V. M., Fernandez, X., Visinoni, F., Chemat F. (2008): Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils, *J. Chrom. A*, 1190, 14-17.
- AFNOR. (1970): norme NF V03-050, Paris.

- Bousbia, N., Vian, A., M., Ferhat, M.A., Petitcolas, E., Meklati, B.Y., Chemat, F. (2009): Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity, *Food Chem.* 114, 355-362.
- Brachet, A., Christen, P., Veuthey, J. L. (2002): Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves, *Phytochem. Anal.* 13, 162-169
- Chemat, S., Lagha, A., Amar, H. A., Chemat F. (2004a): Ultrasound assisted microwave digestion, *Ultrason. Sonochem.* 11, 5-8
- Chemat, S., Lagha, A., AitAmar, H., Bartels, P.V., Chemat, F. (2004b): Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds, *Flavour Fragr. J.* 19, 188-195.
- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P. (2008): Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves, *Ultrason. Sonochem.* 15, 898-902.
- Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010): Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva (Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds). *Cro. J. Food Sci. Techn.*, 2 (2), 22-33.
- Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. (2009): A kinetic study of oxidation development in sunflower oil under microwave heating: Effect of natural antioxidants, *Food Res. Int.* 42, 1171-1177.
- Esilsson, S., Bjorklund E. (2000): Analytical-scale microwave-assisted extraction, *J. Chrom. A.* 902, 227-250.
- Ferhat, M. A., Meklati, B.Y., Visinoni, F., Vian, M.A., Chemat, F. (2008): Solvent free microwave extraction of essential oils, Green chemistry in the teaching laboratory, *Chimica Oggi* 21-23.
- Ferhat M.A., Tigrine-Kordjani, N., Chemat, S., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2007): Rapid extraction of volatile compounds using a new simultaneous microwave distillation: Solvent extraction device, *Chromatographia* 65, 217-222.
- Font, N., Hernandez, F., Hogendoorn, E. A., Baumann, R. A., & van Zoonen, P. (1998): Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography-UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides, *J. Chrom. A.* 798, 179-186.
- Ganzler, K., Salgo, A., Valko, K. (1986): Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography, *J. Chrom.* 371, 299.
- Gedye, R. N., Smith, F. E., Westaway, K.C., Ali, H., Baldisera, L., Laberge, L., Roussel, J. (1986): The use of microwave ovens for rapid organic synthesis, *Tetrahedron Letters* 27, 279.
- Giguere, R.J., Bray, T.L., Duncan, S.M., Majetich, G. (1986): Application of commercial microwave ovens to organic synthesis, *Tetrahedron Letters* 27, 4945-4948.
- González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A., García-Viguera, C. (2010): Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51, 327-345.
- Kaufmann, B., Christen, P. (2002): Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction, *Phytochem. Anal.* 13, 105-113.
- Lane, D., Jenkins, S.W.D. (1984): Presented at the 9th International Symposium on Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Columbus, OH, Abstracts, p.437
- Lianfu, Z., Zelong, L. (2008): Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes, *Ultrason. Sonochem.* 15, 731-737.
- Lucchesi Marie E., Chemat, F., Smadja, J. (2004): Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation, *J. Chrom. A.* 1043, 323-327.
- Molins C., Hogendoorn E. A., Heusinkveld H. A. G., Van Zoonen P., Baumann R. A. (1997): Microwave assisted solvent extraction (MASE) of organochlorine pesticides from soil samples, *Int. J. Envir. Anal. Chem.* 68, 155-169.
- Režek Jambrak, A., Mason, T.J., Lelas, V., Herceg, Z., Ljubić Herceg, I. (2008): Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions, *J. Food Eng.* 86 (2), 281-287.
- Krešić, G., Lelas, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z., Rimac Brnčić, S. (2008): Influences of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins, *J. Food Eng.* 87, 64-73.
- Režek Jambrak, A., Lelas, V., Mason, T.J., Krešić, G., Badanjak, M. (2009a): Physical properties of ultrasound treated soy proteins, *J. Food Eng.* 93, 386-393.
- Režek Jambrak, A., Mason, T.J., Lelas, V., Krešić, G. (2009b): Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin, *LWT-Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie- Food Science and Technology.* 43, 254-262.
- Režek Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Batur, V., Muža, M. (2009c): Prednosti i nedostaci primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji, *Mljekarstvo* 59 (4), 267-281
- Robards, K. (2003): Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J. Chrom. A.* 1000, 657-691.
- Zigoneanu, I.G., Williams, L., Xu, Z., Sabliov, C.M. (2008): Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method, *Biores. Tech.* 99, 4910-4918.

Received: April 4, 2011

Accepted: June 30, 2011

Microwave extraction of bioactive compounds

Monika Blekić¹, Anet Režek Jambrak¹, F. Chemat²

¹University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Croatia

²University of Avignon, UMR A 408 INRA, 33 Rue Louis Pasteur, 84029 Avignon, France

review

Summary

Microwave extraction presents novel extraction and treatment method for food processing. In paper, several examples of microwave extraction of bioactive compounds are presented. Also, novel innovative equipment for microwave extraction and hydrodiffusion with gravitation is presented. Advantage of using novel equipment for microwave extraction is shown, and it include, shorter treatment time, less usage or without any solvent use. Novel method is compared to standard extraction methods. Some positive and negative aspects of microwave heating can be observed, and also its influence on development of oxidation in sunflower oil subjected to microwave heating. Also, use of microwaves for the extraction of essential oils is shown. One can also see the advantages of solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs in comparison with the standard extraction, and determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method. Comparison of microwave and ultrasound extraction, as well as positive and negative aspects of the combination of microwaves and ultrasound is described.

Keywords: microwaves, extraction, ultrasound, bioactive compounds