

Primjena ubrzane ekstrakcije otapalima u izolaciji fenolnih spojeva iz sjemenki komorača

Peričić, Matea

Undergraduate thesis / Završni 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:159:522214>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij – Prehrambena tehnologija

Matea Peričić

7251/PT

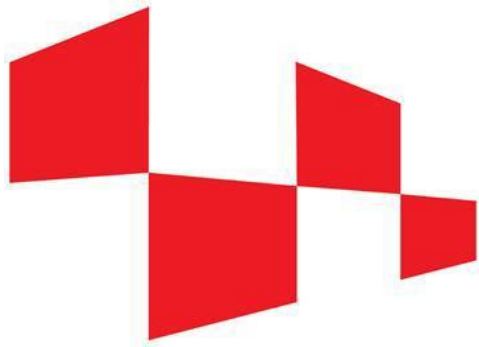
**PRIMJENA UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA U IZOLACIJI FENOLNIH SPOJEVA
IZ SJEMENKI KOMORAČA**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta: Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma (HRZZ PlantBioPower, IP-01-2018-4924)

Mentor: prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac

Zagreb, 2019.



HRZZ

Hrvatska zaklada
za znanost

Ovo istraživanje financirano je sredstvima znanstvenog projekta Hrvatske zaklade za znanost – HRZZ (2018.-2022.), „ Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma (HRZZ PlantBioPower, IP-01-2018-4924)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Primjena ubrzane ekstrakcije otapalima u izolaciji fenolnih spojeva iz sjemenki komorača

Matea Peričić, 0058208983

Sažetak: Komorač je ljekovita i aromatična biljka koja sadrži značajan udio bioaktivnih molekula, među kojima značajno mjesto zauzimaju fenolni spojevi, za čiju ekstrakciju se primjenjuju različite metode. Stoga je cilj ovog istraživanja bio odrediti optimalne uvjete izolacije ukupnih fenola i flavonoida iz sjemenki gorkog komorača s 30%-tnom vodenom otopinom acetona, primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (PLE). Parametri koji su varirani tijekom eksperimenta su: temperatura (75°C i 100°C) i broj ciklusa (1, 2, 3) uz konstantno statičko vrijeme 10 min. Najviše koncentracije ukupnih fenola i flavonoida dobivene su ekstrakcijom 30%-tnom vodenom otopinom acetona pri temperaturi od 100 °C u 3 ciklusa. Također, dokazano je da porast temperature i broja ciklusa prilikom ekstrakcije 30%-tnim acetonom, utječu na povećanje koncentracije ukupnih fenola i flavonoida.

Ključne riječi: Komorač, fenoli, flavonoidi, ubrzana ekstrakcija otapalima

Rad sadrži: 27 stranice, 8 slika, 2 tablica, 46 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac

Datum obrane: rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Food technology Engineering

Laboratory for drying Technologies and monitoring of biologically active compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Application of pressurized liquid extraction for isolation of polyphenols from fennel seeds

Matea Peričić, 0058208983

Abstract: Fennel is a medicinal and aromatic plant with a broad range of bioactive molecules, among which phenols and flavonoids are the most significant. Different methods exist for their extraction. The aim of this study was to determine the optimal conditions for selective isolation of total phenols and flavonoids from minced ground fennel seeds with 30% aqueous acetone solution with pressurized liquid extraction (PLE). Parameters that were adjusted during the experiment were: temperature (75°C and 100°C) and number of cycles (1, 2, 3) with constant static time of 10 min. The highest concentrations of total phenols and flavonoids from fennel seeds were obtained by extraction with a 30% acetone solution at 100 ° C for 3 cycles. Also, it has been shown that with the increasing of temperature and the number of cycles upon extraction with 30% acetone the concentration of total phenols and flavonoids increases.

Keywords: fennel, phenols, flavonoids, pressurized liquid extraction

Thesis contains: 27 pages, 8 figures, 2 tables, 46 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Verica Dragović-Uzelac , Full professor

Defence date: September , 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BOTANIČKA I MORFOLOŠKA SVOJSTVA KOMORAČA	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV	3
2.2.1. Fenolni spojevi komorača	5
2.2.2. Eterična ulja komorača.....	6
2.2.3. Masne kiseline.....	7
2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA	7
2.4. BIOLOŠKA AKTIVNOST KOMORAČA	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. Priprema uzorka sjemenki komorača	11
3.1.2. Aparatura i pribor	11
3.1.3. Kemikalije i standardi.....	12
3.2. METODE RADA.....	13
3.2.1. Izolacija fenolnih spojeva ubrzanom ekstrakcijom otapalima . pri povišenom tlaku	13
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	14
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. UKUPNI FENOLI	18
4.2. UKUPNI FLAVONOIDI	20
5. ZAKLJUČAK.....	22
6. POPIS LITERATURE	23

1. UVOD

Komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) je višegodišnja ljekovita i aromatična biljka iz porodice *Apiaceae* (*Umbelliferae*) koja ima široku primjenu u kulinarstvu i tradicionalnoj medicini. Na našem prostoru još je poznat pod nazivima: koromač, slatki kopar, kopar, morač, janež, divlja mirodija i slatki anis. Plodovi komorača imaju višestruku primjenu, koriste se kao začini te za dobivanje eteričnog ulja koje se koristi u veterini te farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Prema navodima većine autora razlikujemo dvije podvrste komorača - piperitum i vulgare. Podvrsta piperitum ima gorko sjeme, žućkasto-zelenkasto-smeđe je boje, izrazito je aromatično te ima gorak okus. Podvrsta vulgare ima puno veći značaj u organskoj poljoprivredi i i uzgaja se zbog plodova koji imaju slatko sjeme koje se koristi kao aroma u mesnim i ribljim jelima, sladoledima, alkoholnim pićima itd..

Među najznačajnije kemijske sastojke komorača spadaju eterično ulje, fenilpropanoidi, monoterpeni, seskviterpeni, kumarin te masne kiseline. Sadrži i tanine, flavonoide, glikozide, saponine i druge vrste spojeva. Ekstrakt komorača ima antimikrobna, antioksidativna i protuupalna svojstva te sadrži brojne hlapljive spojeve. Osim navedenih spojeva sadrži i značajan udio vitamina i minerala koji dodatno pridonose njegovim ljekovitim svojstvima.

Fenolni spojevi koji su kako je navedeno prisutni i u sjemenkama komorača predstavljaju jednu od najznačajnijih skupina biokativnih molekula koje se međusobno razlikuju prema molekulskim i kemijskim svojstvima. Za njihovu ekstrakciju se primjenjuju različite konvencionalne i napredne tehnike ekstrakcije među koje spada i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *pressurized liquid extraction, PLE*). Navedena tehnika ima određene prednosti kao što su veća učinkovitost ekstrakcije uz smanjen utrošak organskih otapala, veći prinosi u kraćem vremenu te smanjena potrošnja energije. Za dobivanje većih prinosa tijekom ekstrakcije važno je optimirati parametre ekstrakcije kao što su temperatura, broj ciklusa i statičko vrijeme.

Stoga je cilj ovog rada bio odrediti optimalne uvjete izolacije fenolnih spojeva iz odmašćenih sjemenki gorkog komorača sukcesivnim iscrpljivanjem 30 %-tnom vodenom otopinom acetona primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku. Prilikom provođenja ekstrakcije varirani su sljedeći uvjeti: temperatura (75 i 100 °C) i broj ciklusa (1, 2 i 3 ciklusa).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BOTANIČKA I MORFOLOŠKA SVOJSTVA KOMORAČA

Komorač (*Foeniculum vulgare Mill.*) je višegodišnja ljekovita i aromatična biljka (Slika 1) koja pripada carstvu *Plantae*, razredu *Magnoliopsida*, redu *Apiales*, porodici *Apiaceae* i rodu *Foeniculum*.

Prema Milleru razlikujemo tri osnovne podvrste komorača:

- *Foeniculum vulgare var. vulgare*: gorki komorač.
- *Foeniculum vulgare var. dulce*: slatki komorač, koristi se kao ljekovita i začinska biljka.
- *Foeniculum vulgare var. azoricum*: firentinski komorač, koristi se kao povrće.

Šilješ i sur. (1992) navode drugu podjelu podvrsta komorača, na različite kemotipove. Njihova različitost očituje se u razlikama u okusu ploda, i udjelma anetola, fenhona i estragola.

Korijen komorača prljavo je bijele boje, dubok je i vretenast. Iz korijena se razvija veći broj stabiljaka koje su uspravne i vrlo razgranate. Stabiljke su modrozeleno boje i cilindričnog oblika. Listovi su smješteni na dugačkim peteljka, glatki su i mekani, a sastavljeni su od nitastih tamnozelenih nastavaka. Cvjetovi su žutonarančasti, skupljeni u štitaste cvatove. Plod je ovalnog oblika, sive do žuto-zelene boje i sadrži dvije sjemenke. Sjeme komorača ima visoku klijavost (od 90 do 100 %). Zrelost ploda očituje se pojavom sivo-žutih rebara.



Slika 1. Komorač (Anonymous 1)

2.2. KEMIJSKI SASTAV

Sjemenke komorača u prosjeku sadrže: 8.8% vode, 36.6% ugljikohidrata, 15.7% prehrambenih vlakana, 15.8% proteina te 14.9% masti (Tablica 1.). Metodama plinske kromatografije i masene spektrometrije iz komorača je izolirano više od 87 kemijskih spojeva koji pripadaju različitim skupinama bioaktivnih molekula. Najzastupljenije sastavnice komorača su: hlapljive komponente, masne kiseline, flavonoidi, fenilpropanoidi, seskviterpeni, saponini, monoterpeni, kumarini, triterpenoidi, tanini, glikozidi i esencijalne aminokiseline (Weiping i Baokang, 2011).

Tablica 1. Nutritivna vrijednost 100 g suhog ploda komorača, *USDA National Nutrient data base.*

SASTAVNICE	NUTRITIVNA VRIJEDNOST
Energetska vrijednost	31 kcal
Bjelančevine	1.24 g
Masti	0.2 g
Ugljikohidrati	7.3 g
Šećeri	3.93 g
Vlakna	3.1 g
Kalcij	49 mg
Željezo	0.73 mg
Magnezij	17 mg
Kalij	414 mg
Fosfor	50 mg
Natrij	52 mg
Cink	0.2 mg
Tiamin, vitamin B1	0.01 mg
Riboflavin, vitamin B2	0.032 mg
Niacin, vitamin B3	0.64 mg
Vitamin C	12 mg
Piridoksin, vitamin B6	0.047 mg
Folna kiselina	27 µg
Vitamin K	62.8 µg
Vitamin A	48 µg
Vitamin E	0.58 mg
Zasićene masne kiseline	0.09 g
Nezasićene masne kiseline	0.237 g
Izoleucin	0.73 g
Leucin	0.63 g
Fenilalanin	0.45 g
Triptofan	0.53 g
Glicin	0.55 g
Prolin	0.53 g

2.2.1. Fenolni spojevi komorača

Fenolni spojevi predstavljaju najveću skupinu sekundarnih biljnih metabolita koji sadrže hidroksilnu skupinu vezanu za aromatski prsten. Do danas je poznato oko 8 000 fenolnih spojeva koji se razlikuju po broju i položaju hidroksilnih skupina, broju, položaju i vrsti supstituenata te stupnju polimerizacije (Bravo, 1998).

Prisutni su u brojnim biljnim izvorima kao što su voće, povrće, ljekovito bilje i sl., a posebno su značajni zbog antioksidativnih svojstva i potencijalnih zdravstvenih benefita poput zaštite od kardiovaskularnih bolesti, tumorskih oboljenja i dijabetesa. Kao najzastupljenije skupine fenolnih spojeva u komoraču Rahimi i Ardekani (2013) navode flavonoide, fenolne kiseline i hidroksicimetne kiseline. Prema Ghanem i sur. (2012) udio fenolnih spojeva u komoraču iznosi 1.4 %.

Flavonoidi su polifenolni sekundarni metaboliti niske molekulske mase čija se struktura sastoji od ukupno 15 ugljikovih atoma. S obzirom na stupanj nezasićenosti i stupanj oksidacije te broj i položaj hidroksilnih skupina piranskog prstena razlikujemo flavone, flavane, antocijanidine i čalkone. (Kumar i Pandey, 2013).

Flavonoidi su snažni antioksidansi s visokom analgetskom, antibakterijskom i protuupalnom moći (Chen i sur., 1996). U sjemenkama komorača najzastupljeniji flavonoidi su kvercetin (17.1%) i apigenin (12.5%) (Roby i sur., 2013). Nassar i sur. (2010) iz komorača su izolirali i sljedeće flavonoide: eridiktol-7-rutinozid, kvercetin-3-rutinozid, ružmarinska kiselina, kvercetin-3-glukoronid, izokvercetin, kvercetin-3-arabinozid, kamferol-3-glukoronid, kamferol-3-O-rutinozid, kamferol-3-arabinozid, kamferol-3-glukozid, izoharmnetin glukozid, kvercetin-3-O-galaktozid, izoharmnetin 3-O- α -ramnozid i kamferol. Iz ekstrakta komorača ukupno su izolirali oko 12.3 mg/g flavonoida.

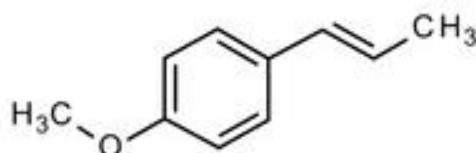
Fenolne kiseline su fenoli koji u svojoj strukturi sadrže karboksilnu grupu. Razlikujemo hidroksicimetne kiseline i hidroksibenzojeve kiseline te njihove derivate (Manach i sur., 2004). U sjemenkama i žitaricama prisutne su u vezanom obliku, dok su u voću i povrću zastupljenije u slobodnom obliku. Roby i sur. (2013) proveli su ekstrakciju sjemenki komorača metanol i utvrdili da sjeme sadrži klorogensku kiselinu u udjelu od 14.9% i ružmarinsku kiselinu u udjelu od 6.8%. Ostale značajne kiseline sadržane u sjemenci komorača su cimetna, galna, kafeinska, vanilinska i taninska kiselina (Singh i sur., 2004).

2.2.2. Eterična ulja komorača

Eterična ulja su smjese hlapivih, biološki aktivnih spojeva koji nastaju kao konačni produkti metabolizma. Jedna od najzastupljenijih organskih tvari u eteričnom ulju komorača je *trans* – anetol (Slika 2.) (Shamkant i sur., 2014). Zbog visokog sadržaja *trans* – anetola, koji je odgovoran za karakterističnu aromu komorača sličnu anisu, eterično ulje prelezi u kruto agregatno stanje pri temperaturi između 5 i 10 °C (Stepanović i sur., 2001).

Eterično ulje gorkog komorača karakterizira relativno visoka koncentracija α -pentena i fenkona i niska koncentracija *trans*-anetola i estragola, za razliku od ulja slatkog komorača. Izolacija hlapljivih spojeva plodova komorača učinkovito se provodi postupcima destilacije vodenom parom, ekstrakcijom klasičnim otapalima, superkritičnim fluidima (SFE) te ekstrakcijom i mikroekstrakcijom na krutoj fazi (*Solid-Phase Microextraction*, SPME) (Damjanović i sur., 2005; Tschiggerl i sur., 2010). Relativni sadržaj eteričnog ulja u plodovima komorača bio je oko 3%. Napoli i sur. (2010) identificirali su 78 spojeva iz plodova komorača pomoću plinske kromatografije i masene spektrometrije, koji čine više od 98% sastojaka ulja.

Eterično ulje komorača ima ljekovito djelovanje kod raznih akutnih i kroničnih oboljenja. Koristi se u farmaceutskoj industriji za prikrivanje neugodnog okusa lijeka te u kozmetičkoj industriji kao dodatak galenskim preparatima (kreme, sapuni, losioni, zubne paste). Također ima široku primjenu u prehrambenoj industriji kao dodatak alkoholnim i ne alkoholnim napitcima, dodatak slatkišima i sladoledu, aromatizira kruh, peciva i kolače.

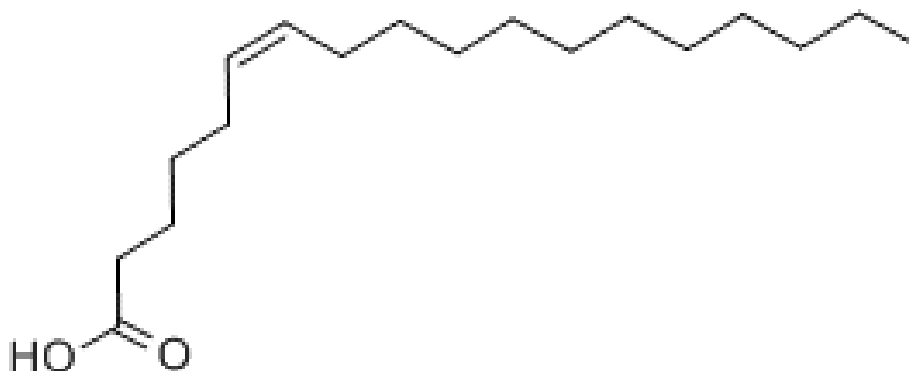


Slika 2. *Trans* – anetol (Anonymous 2)

2.2.3. Masne kiseline

Plodovi komorača sadrže visok udio masnih kiselina. Jedna od najznačajnijih masnih kiselina komorača je petroselinska kiselina. Osobito je karakteristična za ulje komorača, a njezin udio može iznositi od 70 do 80% (Reiter i sur., 1998; Charvet i sur., 1991) (Slika 3.).

Analiza koju su proveli Singh i sur. (2016) pokazala je da su linolna kiselina (54.9%), oleinska kiselina (5.4%) i palmitinska kiselina (5.4%) najzastupljenije komponente u acetonskom ekstraktu komorača. Slatki i gorki komorač pokazuju vrlo sličan sastav masnih kiselina (Cosge i sur., 2008).



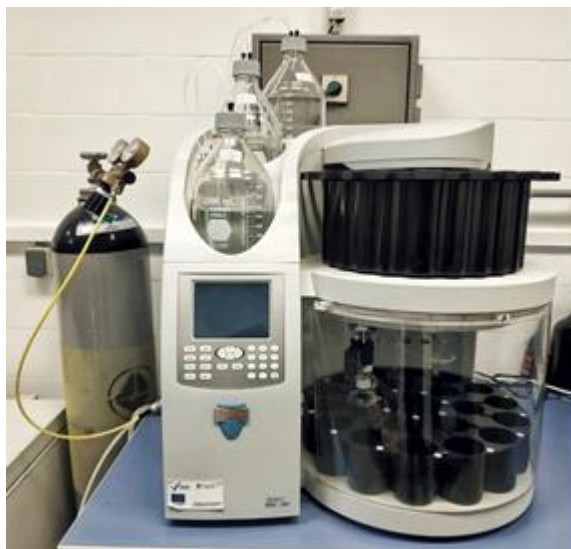
Slika 3. Petroselinska kiselina (Anonymous 3)

2.3. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Zbog razlika u molekulskim kemijskim i fizikalnim svojstvima fenolnih spojeva, polarnosti te broju aromatskih prstena i hidroksilnih skupina važno je provesti optimalnu pripremu uzorka i odabrati učinkovitu metodu ekstrakcije. Prilikom pripreme uzorka za ekstrakciju poželjno je ukloniti balastne tvari koje mogu otežavati postupak ekstrakcije. Poznato je da kompleksi s ugljikohidratima, proteinima i drugim tvarima mogu dodatno otežati potpunu ekstrakciju fenolnih spojeva. Kod uzoraka koji sadrže visok udio lipida važno je prije ekstrakcije provesti postupak odmašćivanja, pri čemu se kao otapalo za odmašćivanje najčešće primjenjuje heksan (Khoddami i sur., 2013). Raznolikost u strukturi spojeva i nedostatak odgovarajućih standarda ponekad ograničavaju mogućnost identifikacije fenolnih spojeva pri provođenju kromatografskih metoda (Huang i sur., 2007). Za izolaciju fenolnih spojeva koriste se brojne

konvencionalne metode koje najčešće zahtijevaju upotrebu većih količina organskih otapala, vremena i energije, te se danas sve više ispituje mogućnost primjene drugih metoda ekstrakcije koje daju veće prinose i omogućavaju veću stabilnost bioaktivnih molekula tijekom ekstrakcije. Neke od najčešćih modernijih metoda su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkritičnim fluidima te ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (Zhang i sur., 2018).

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *accelerated solvent extraction, ASE*) jedna je od novijih tehnika ekstrakcije koja se koristi za izolaciju bioaktivnih molekula iz različitih vrsta biljnog materijala, čvrstih i polučvrstih uzoraka. Metoda se bazira na provođenju ekstrakcije pri temperaturama višim od temperature vrenja otapala, što zahtijeva da tlak unutar ćelije bude visok (~ 10 MPa) kako bi se otapalo održalo u tekućem stanju. Visoka temperatura (do 200 °C) doprinosi većoj topljivosti i većoj brzini difuzije otopljenih tvari u otapalu (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001; Dean, 1998). Prednosti provođenja ovakvog tipa ekstrakcije su u tome što omogućava istovremeno ekstrahiranje 24 uzorka čije mase mogu biti u rasponu od 1 do 100 grama. Ova tehnika je slična Soxhlet ekstrakciji, ali ipak ima velik broj prednosti. ASE omogućava kraće vrijeme ekstrakcije, dobivaju se veći prinosi (uglavnom), veća je učinkovitost ekstrakcije, smanjena je potrošnja energije te količina organskih otapala koja se koristi za ekstrakciju, a samim time je smanjena i količina stvaranja otpadnih tvari (Raut i sur., 2015).



Slika 4. Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku Dionex™ ASE™ 350
(fotografija Ana-Marija Medved)

2.4. BIOLOŠKA AKTIVNOST KOMORAČA

Biološki aktivni sastojci hrane su fiziološki aktivne komponente u hrani koje potječu iz biljnih i životinjskih izvora te imaju funkcionalna svojstva u organizmu i djeluju na mnogobrojne organske sustave u cilju prevencije i liječenja bolesti (Jašić, 2010). Međutim, neumjerena konzumacija određenih sastojka hrane može imati i negativne učinke na zdravlje. Zbog toga se za većinu biološki aktivnih tvari određuje preporučeni (*Recommended Dietary Allowances*, RDA) i referentni (*Dietary Reference Intake*, DRI) dnevni unosi te maksimalne granice unosa (*Tolerable Upper Intake Level*, UL).

Komorač je poznat kao izvrstan izvor prirodnih antioksidansa koji pridonosi svakodnevnoj antioksidativnoj prehrani (Shahat i sur., 2011). Fenolni spojevi komorača poput kafoilkinske kiseline, ružmarinske kiseline, kvercetin-3-O-galaktozid i kaempferol-3-O-glukozid imaju antioksidacijsko djelovanje. (Parejo i sur., 2004). Za divlji komorač je dokazano da ima učinak na hvatanje slobodnih radikala zbog više koncentracije fenola i flavonoida nego medicinski i jestivi komorač. Vodeni ekstrakti komorača pokazali su manja antioksidacijska svojstva u usporedbi s eteričnim uljem (Diaz-Maroto i sur., 2015)

Eterično ulje koromača moglo bi se koristiti za inhibiranje akutnog tetraklor ugljikom (CCl₄) izazvanog oštećenja jetre smanjenjem koncentracije aspartat-aminotransferaze (AST),

alanin-aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP) i bilirubina. Ovaj učinak pripisuje se D-limonenu i β -mircenu (Ozbek i sur., 2003).

Eterična ulja iz plodova komorača pokazala su značajno antibakterijsko djelovanje na *Escherichiu colli* i *Bacillus megaterium* (Araque i sur., 2007; El-Adly i sur., 2007). Mogu biti korisni prirodni baktericidi za suzbijanje bakterijskih bolesti biljaka. Kloroform iz stabljike koji je topljiv u vodi ima snažno djelovanje na bakterije i gljivice (Kwon i sur., 2002). Također, eterična ulja su pokazala antifungalno djelovanje protiv *Candide albicans* stoga bi se ona mogla iskoristiti za stvaranje novog antifungalnog sredstva protiv kandidijaze i drugih gljivičnih bolesti (Park i sur., 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Priprema uzorka sjemenki komorača

U ovom istraživanju korištene su suhe sjemenke gorkog komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) koje su nabavljene u suradnji s tvrtkom SUBAN d.o.o. (Samobor, Hrvatska). Prije ekstrakcije, sjemenke komorača usitnjene su pomoću kuhinjskog električnog mlinca te se tako dobiveni prah koristio za ekstrakciju ukupnih fenola i flavonoida.

3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern, Njemačka)
- Analitička vaga (AX224, Ohaus, SAD)
- Sustav za ubranu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku (Dionex ASE 350, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Električni mlinac (GT11, Tefal, Francuska)
- Ultrazvučna kupelj (DT 512 H, Bandelin, Njemačka)
- Vortex (MS 2 Minishaker, Ika, SAD)
- Kupelj od rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)
- Spektrofotometar (UV/VIS UNICAM HELIOS β, Velika Britanija)

Pribor:

- Celulozni filteri za ekstrakciju
- Čelije za ekstrakciju od nehrđajućeg čelika volumena 34 ml
- Odmjerne tikvice (50 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL)
- Menzure (50 mL, 100 mL, 500 mL)
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL, 200 mL)
- Stakleni lijevci
- Falkonice volumena 50 mL i 15 mL
- Mikropipete Eppendorf (100 μL, 1000 μL, 5000 μL)
- Staklene epruvete, stalak za epruvete, staklene kivete

3.1.3. Kemikalije i standardi

- Heksan, 95 %-tni
- Etanol, 96 %-tni
- Metanol, 100 %-tni
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)
- 30 % vodena otopina acetona (v/v)
Priprema: U odmjernu tikvicu od 1 L doda se 300 mL 100 %-tnog acetona i razrijedi do oznake destiliranom vodom.
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)
- Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.
- Standard galne kiseline (500 mg/L)
- Priprema: odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 % - tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom vremenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- Standard kvercetina (100 mg/L)
- Priprema: Odvaži se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom. Iz alikvotne otopine prirede se redom razrijeđenja od 10, 25, 50 i 75 mg/L.
- Aluminijev klorid, 10 %-tni
- Priprema: 1 g aluminijeva klorida (aluminj-klorid–heksahidrat, p.a.) otopi se u 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- Kalijev acetat, 1 M
- Priprema: 9,845 g kalijeva acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- Dijatomejska zemlja
- Destilirana voda

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izolacija fenolnih spojeva ubrzanom ekstrakcijom otapalima pri povišenom tlaku

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz samljevenih sjemenki gorkog komorača provedena je primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (PLE) na ASE uređaju (Dionex ASE 350) prema planu pokusa prikazanom u Tablici 2. Najprije je provedena ekstrakcija nepolarnim otapalom heksanom radi uklanjanja uljnih komponenti koje sadrže sjemenke. Kao otapalo pri ekstrakciji fenolnih spojeva korišten je 30 %-tni aceton. Parametri koji su varirani tijekom eksperimenta su: temperatura (75 °C i 100 °C) i broj ciklusa (1, 2, 3) uz statičko vrijeme 10 min jednako za sve uzorke.

Tablica 2. Plan pokusa ekstrakcije fenolnih spojeva ubrzanom ekstrakcijom otapalima pri povišenom tlaku

Vrsta otapala	Statičko vrijeme	Temperatura (°C)	Broj ciklusa	Šifra uzorka
30% aceton	10 min	75	1	A
			2	B
			3	C
		100	1	D
			2	E
			3	F

Postupak ekstrakcije:

Na analitičkoj vagi, u plastičnoj čašici, odvaži se približno 8 g ($\pm 0,0001$) uzorka usitnjenih sjemenki komorača te se potom doda mjerica dijatomejske zemlje ($\sim 2,0$ g) radi bolje ekstrakcijske učinkovitosti. U ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika postave se dva filter

papir, a potom uzorak s dijatomejskom zemljom. Ekstrakcijska ćelija se ručno zatvori i postavi na uređaj ASE Dionex 350®. Pripremljeni uzorci prvo su podvrgnuti ekstrakciji s 95 %-tnim heksanom kako bi se uklonile uljne komponente. Nakon toga, provedena je ekstrakcija istih uzoraka 30 %-tnom vodenom otopinom acetona. Po završetku ekstrakcije, ekstrakti su sakupljeni u staklene bočice za sakupljanje i nakon toga se kvantitativno prenesu u odmjerne tikvice od 50 mL te se iste nadopune do oznake ekstrakcijskim otapalom. Ekstrakti su potom prenesu u plastične kivete volumena 50 mL te se skladište u hladnjaku na temperaturi (-20°C) do provođenja spektrofotometrijskih analiza.

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip metode:

Određivanje ukupnih fenola provodi se u acetonskom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom (smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline). Pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima fosforwolframova i fosfomolibdenska kiselina se reducira u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Mjeri se nastali intenzitet obojenja pri valnoj duljini 765 nm (Shortle i sur., 2014).

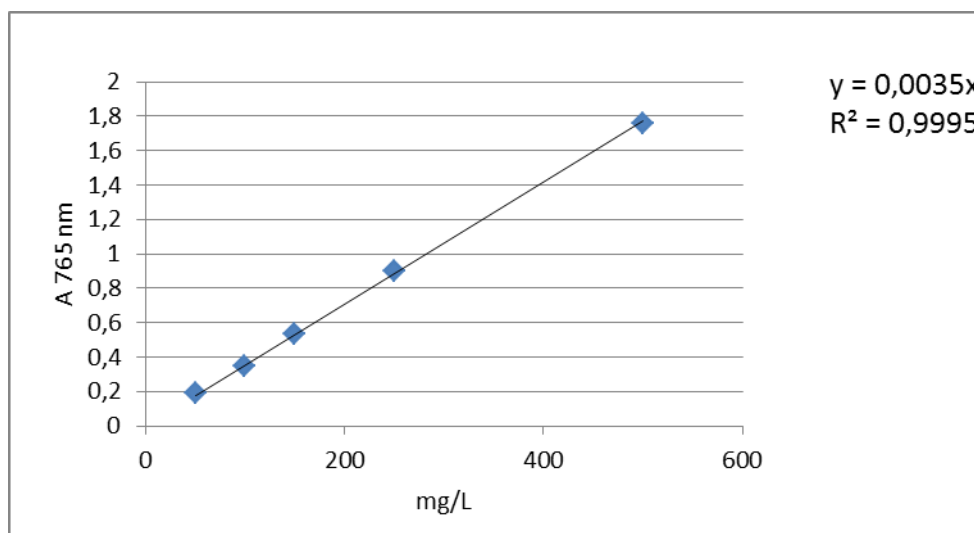
Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 µL ekstrakta (razrijeđen 5x), 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Slijepa proba pripremi se na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodaje otapalo korišteno za ekstrakciju. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa, a potom se uzorci postave u vodenu kupelj gdje se termostatiraju 25 minuta pri temperaturi 50 °C. Nakon toga provodi se mjerenje apsorbancije (optičke gustoće otopine) pri valnoj duljini 765 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca, potrebno je odvagati 0,5 g galne kiseline koja se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL te nadopuniti tikvicu do oznake destiliranom vodom. Razrijeđenja se rade na način da se u svaku tikvicu od 100 mL otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota pripremljene standardne otopine galne kiseline i nakon toga se tikvice nadopune destiliranom vodom do oznake. Pripadne koncentracije galne

kiseline u pripremljenim razrijeđenjima iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 µL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 µL Folin Ciocalteu reagesna i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrij karbonata. Slijepa proba priprema se dodatkom 100 µL destilirane vode umjesto otopine standarda. Sadržaj staklene epruvete promiješa se pomoću Vortexa te se uzorci termostatiraju u vodenoj kupelji pri temperaturi od 50 °C 25 minuta. Nakon termostatiranja, mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm, a iz izmjerenih vrijednosti izrađuje se baždarni pravac u programu Microsoft Excel. Na apscisu se nanose koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu izmjerene pripadajuće apsorbancije pri 765 nm. Dobivena jednadžba pravca koristi se za izračunavanje koncentracije ukupnih fenola.



Slika 5. Baždarni pravac za galnu kiselinu

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi: $Y = 0,0035X$

Y- apsorbancija pri 765 nm

X- koncentracija galne kiseline (mg/L).

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih flavonoida

Princip metode:

Određivanje ukupnih flavonoida provodi se u acetonskom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijskim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0,5 mL ekstrakta, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijskog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju te se umjesto 10%-tnog aluminijskog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

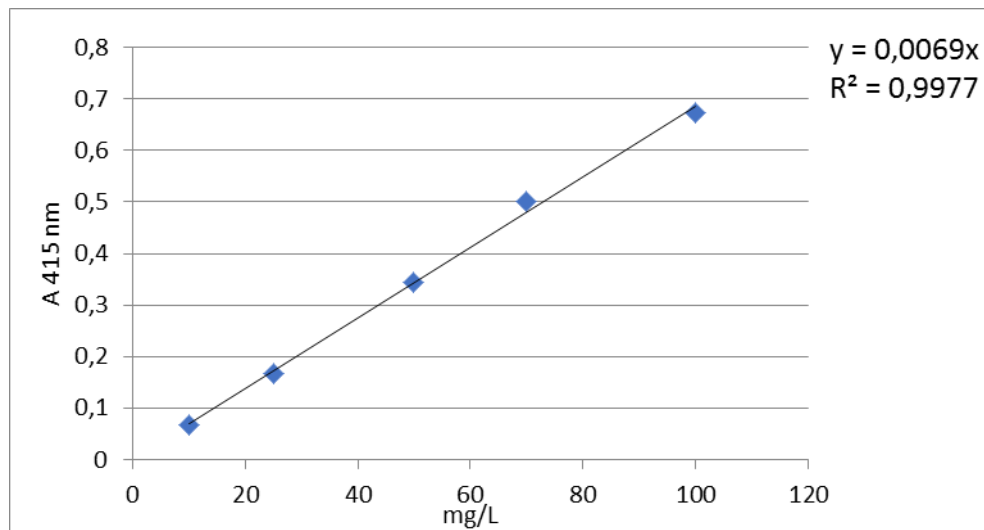
Izrada baždarnog pravca:

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 100 mg/L. Od te otopine standarda rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom 1, 2.5, 5 i 7.5 mL alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake 100%-tnim metanolom. Koncentracije kvercetina u tim tikvicama iznose 10, 25, 50 i 75 mg/L. Također se za analizu uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg/L.

Iz svake tikvice otpipetira se redom 0,5 mL otopine standarda, 1,5 mL 96%-tnog etanola, 0,1 mL 10%-tnog aluminijskog klorida, 0,1 mL 1 M kalijevog acetata i 2,8 mL destilirane vode. Na isti se način pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol te se umjesto 10%-tnog aluminijskog klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini 415 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati

izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 6. Baždarni pravac za kvercetin

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi: $Y = 0,0069X + 0,0002$

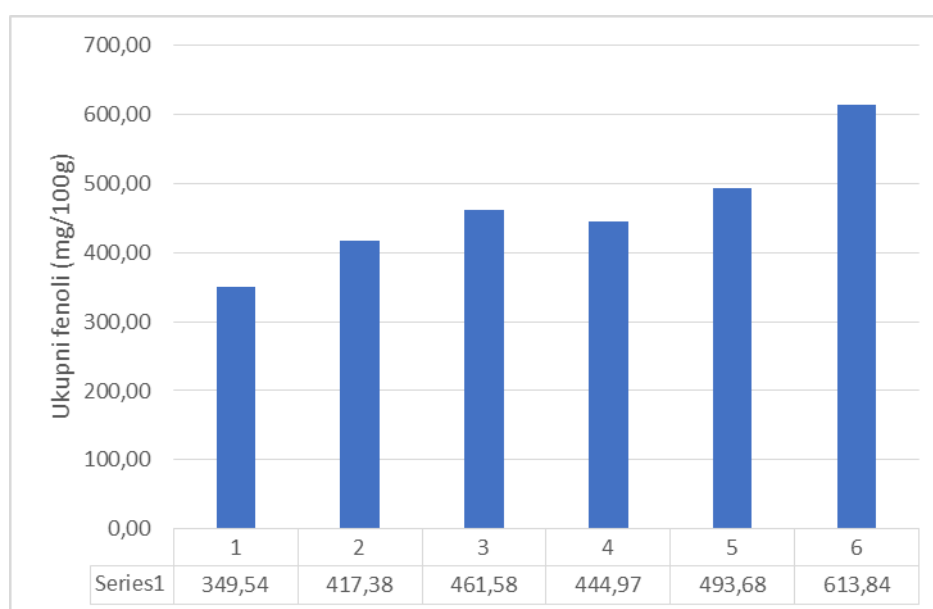
Y – apsorbancija pri 415 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima sjemenki gorkog komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.). Uzorci su dobiveni ekstrakcijom s 30%-tnom vodenom otopinom acetona, primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (PLE) na ASE uređaju. Cilj ovog eksperimenta bio je odrediti optimalnu temperaturu i broj ciklusa uz statičko vrijeme od 10 minuta za izolaciju ukupnih fenolna i flavonoida iz samljevenih i prethodno heksanom odmašćenih sjemenki gorkog komorača.

4.1. UKUPNI FENOLI



Slika 7. Udio ukupnih fenola u ekstraktima sjemenki gorkog komorača dobivenih ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona

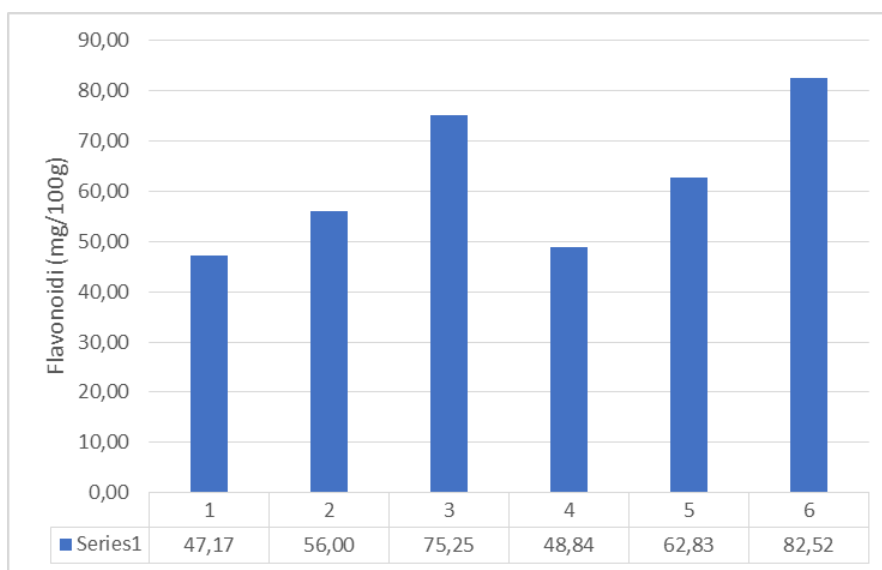
Slika 7 prikazuje udio ukupnih fenola u acetonском ekstraktu sjemenki gorkog komorača izraženih kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja. Raspon ukupnih fenola u acetonским ekstraktima sjemenki gorkog komorača kreće se između 349,54 i 613,84 mg/100 g suhih sjemenki. Najviša koncentracija dobivena je u uzorku F koji je dobiven ekstrakcijom pri 100 °C u tri ciklusa. Najniža koncentracija određena je u uzorku A koji je dobiven ekstrakcijom pri 75 °C u jednom ciklusu. Goswami i Chatterjee (2014) proveli su postupak Soxhlet ekstrakcije fenolnih spojeva iz sjemenki komorača uz aceton kao ekstrakcijsko

otapalo kroz vrijeme od 6 sati pri sobnoj temperaturi. U dobivenom ekstraktu određeno je 364 mg ukupnih fenola/kg suhe tvari što je podjednako kao i najniža vrijednost ukupnih fenola u našem istraživanju.

Prema dobivenim podacima, temperatura značajno utječe na udio ukupnih fenola u acetonskom ekstraktu sjemenki gorkog komorača. Uzorci koji su dobiveni ekstrakcijom s 30%-tnim acetonom pri temperaturi od 100 °C sadrže više koncentracije ukupnih fenola, nego oni dobiveni ekstrakcijom pri temperaturi od 75 °C. Povećanjem temperature otapala raste kapacitet otapala za otapanje analita, zbog veće brzine difuzije i smanjenja viskoznosti, što olakšava otapalu prodiranje u pore matrice. Također, visoka temperatura uzrokuje pucanje veza između otopljene tvari i matrice što uzrokuje izdvajanje otopljene tvari iz matrice. Većina ekstrakcija izvodi se pri 75-125 °C, a najčešće se primjenjuje temperatura od 100 °C (Mottaleb i Sarker, 2012).

U eksperimentu je praćen i utjecaj broja ciklusa ekstrakcije pri čemu su uzorci dobiveni ekstrakcijom s 30%-tnim acetonom u tri ciklusa pri 75 °C i 100 °C sadržavali višu koncentraciju ukupnih fenola nego oni dobiveni u jednom ili dva ciklusa. Kombinacija više temperature i većeg broja ciklusa prilikom ekstrakcije 30%-tnim acetonom rezultirala je s najvišim koncentracijama ukupnih fenola. Optimalni uvjeti pri kojima se dobiva najviša koncentracija ukupnih fenola iz sjemenki komorača dobivena ekstrakcijom 30%-tnom vodenom otopinom acetona su pri temperaturi od 100 °C dobiveni u 3 ciklusa.

4.2. UKUPNI FLAVONOIDI



Slika 8. Udio flavonoida u ekstraktima sjemenki gorkog komorača dobivenih ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona

Na slici 8. prikazan je udio ukupnih flavonoida u ekstraktima sjemenki komorača koji su dobiveni uzastopnim ekstrakcijama uz primjenu 30%-tne vodene otopine acetona i izraženi kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja. Koncentracije flavonoida u acetonskim ekstraktima kreću se u rasponu od 47,17 do 82,52 mg/100 g. Najviša koncentracija izmjerena je u uzorku F koji je dobiven ekstrakcijom pri 100 °C u tri ciklusa. Najniža koncentracija određena je u uzorku A koji je dobiven ekstrakcijom pri 75 °C u jednom ciklusu.

Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti da temperatura kao i kod ukupnih fenola ima značajan utjecaj na udio flavonoida u acetonskom ekstraktu sjemenki gorkog komorača. Uzorci dobiveni ekstrakcijom s 30%-tnim acetonom pri temperaturi od 100 °C sadrže više koncentracije flavonoida, nego oni dobiveni ekstrakcijom pri temperaturi od pri 75 °C. Prilikom praćenja utjecaja broja ciklusa ekstrakcije na koncentraciju flavonoida rezultati su pokazali da uzorci dobiveni ekstrakcijom s 30 %-tnim acetonom u tri ciklusa pri 75 °C i 100 °C sadržavaju višu koncentraciju flavonoida nego oni dobiveni u jednom ili dva ciklusa. Može se primijetiti da se porastom temperature i broja ciklusa prilikom ekstrakcije 30%-tnim acetonom, koncentracija flavonoida povećava. Prema dobivenim rezultatima, optimalni uvjeti

ekstrakcije flavonoida u sjemenkama gorkog komorača pri statičkom vremenu od 10 minuta uz 30%-tnom vodenom otopinom acetona su pri temperaturi od 100 °C te 3 ciklusa.

Dua i sur. (2013) ekstrahirali su suhe sjemenke komorača 80%-tnim metanolom tijekom 4 sata te zatim ekstrahirali ostatak uzorka 80%-tnim metanolom idućih 2 sata. Dobivene koncentracije flavonoida iznosile su 9,325 mg/g suhe tvari što je znatno niže od vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju.

Nassar i sur. (2010) iz komorača su izolirali sljedeće flavonoide: eridiktol-7-rutinozid, kvercetin-3-rutinozid, ružmarinsku kiselinu, kvercetin-3-glukoronid, izokvercetin, kvercetin-3-arabinozid, izoharmnetin 3-O- α -ramnozid, kamferol-3-glukoronid, izoharmnetin glukozid, kvercetin-3-O-galaktozid, kamferol-3-arabinozid, kamferol-3-O-rutinozid, kamferol-3-glukozid, kvercetin i kamferol. Ghanem i sur. (2012.) proveli su ekstrakciju divljeg i kultiviranog komorača s 80%-tnim metanolnim ekstraktom pri čemu je sadržaj flavonoida u divljem komoraču iznosio je 1,2%, a u kultiviranom 1,6%.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih analiza i obrađenih rezultata može se zaključiti:

1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku učinkovita je metoda ekstrakcije fenolnih spojeva iz odmašćenih sjemenki komorača, a raspon koncentracija ukupnih fenola u acetonskim ekstraktima sjemenki gorkog komorača kretao se između 349,54 i 613,84 mg/100 g te ukupnih flavonoida u rasponu od 47,17 do 82,52 mg/100 g.
2. Optimalni uvjeti pri kojima se dobiva najviša koncentracija ukupnih fenola (613,84 mg/100g) i ukupnih flavonoida (82,52 mg/100 g) iz sjemenki komorača uz 30 %-tnu vodenu otopinu acetona kao ekstrakcijsko otapalo su: temperatura od 100 °C i 3 ciklusa.

6. POPIS LITERATURE

- Anonymous 1,
<https://en.wikipedia.org/wiki/Fennel#/media/File:Foeniculum_vulgare_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-148.jpg>
Pristupljeno 9. rujna 2019.
- Anonymous 2, < http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/trans-Anethole,MDA_CHEM800429?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
> Pristupljeno 10. rujna 2019.
- Anonymous 3,
<https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB5355794.aspx>
Pristupljeno 10. rujna 2019.
- Araque M., Rojas L. B., Usubillaga A. (2007) Antibacterial activity of essential oil of *F. vulgare* Miller against multiresistant Gram-negative bacilli from nosocomial infections. *Science* **15(3)**: 366 - 370.
- Badgujar S. B., Patel V. V., Bandivdekar A. H. (2014) *Foeniculum vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology Shamkant. *BioMed Research International* **2014**: 1 - 32.
- Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56(11)**: 317 - 333.
- Charvet A. S., Commeau L. C., Gaydon E. M. (1991) New preparation of pure petroselinic acid from fennel oil. *J Am Oil Chem Soc* **68(6)**: 604 - 607.
- Chen Z. Y., Chan P. T., Ho K. Y., Fung K. P., Wang J. (1996) Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem Phys Lipids* **79(2)**: 157 – 163.
- Cheng S., Liu J., Tsai K., Chen W., Chang S. (2004) Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. *J Agric Food Chem* **52**: 4395 - 4400.
- Choi E.M., Hwang J.K. (2004) Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia* **75(6)**: 557 - 565.

- Cosge B., Kiralan B., Gurbuz B. (2008) Characteristics of fatty acids and essential oil from sweet fennel (*F. vulgare* Mill. var. *dulce*) and bitter fennel fruits (*F. vulgare* Mill. var. *vulgare*) growing in Turkey. *Nat Prod Res* **22(12)**: 1011 - 1016.
- Damjanović B., Lepojević Z., Živković V., Tolić A. (2005) Extraction of fennel (*F. vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO₂: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem* **92(1)**: 143 - 149.
- Díaz-Maroto M., Díaz-Maroto Hidalgo I., Sánchez Palomo E., Pérez Coello M. (2005) Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation extraction and supercritical fluid extraction. *J Agr Food Chem* **53(13)**: 5385 – 5389.
- Dua A., Garg G., Mahajan R. (2013) Polyphenols, flavonoids and antimicrobial properties of methanolic extract of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). *European Journal of Experimental Biology* **3(4)**: 203 - 208.
- El-Adly A., Abada E. A., Gharib F. A. (2007) Antibacterial effects of low power laser light and volatile oil of fennel (*F. vulgare* var. *dulce*) on Grampositive and Gram-negative bacteria. *Int J Agric Biol* **9(1)**: 22 - 26.
- Ghanem M., Radwan H., Mahdy E., Elkholy Y., Hassanein H., Shahat A. (2012) Phenolic compounds from *Foeniculum vulgare* (Subsp. *Piperitum*), (*Apiaceae*) herb and evaluation of hepatoprotective antioxidant activity. *Pharmacognosy Research*. **4(2)**: 104–108.
- Giergielewicz-Możajska H., Dąbrowski Ł., Namieśnik J. (2001) Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples — Some Aspects of Theory and Practice. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31(3)**: 149 – 165.
- Goswami N., Chatterjee S. (2014) Assessment of free radical scavenging potential and oxidative DNA damage preventive activity of *Trachyspermum ammi* L.(carom) and *Foeniculum vulgare* Mill.(fennel) seed extracts. *BioMed Research International* **2014**: 1 – 8.
- He, W., & Huang, B. (2011). A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice: *Foeniculum vulgare*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5(16)**, 3595-3600.

- Huang Z., Wang B., Eaves D. H., Shikany J. M., Pace R. D. (2007) Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African Americans in the southeast United States. *Food Chemistry* **103(4)**: 1395 - 1402.
- Jašić, M. (2010). Uvod u biološki aktivne komponente hrane. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Tuzli, Tuzla, Bosna i Hercegovina. Str 35-37.
- Joshi H. (2006) Cholinergic basis of memory-strengthening effect of *F. vulgare* Linn. *J Food Med* **9(3)**: 413 - 417.
- Khoddami A., Wilkes M., Roberts T. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18(2)**: 2328 – 2375.
- Kumar S., Pandey A. K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* **2013**: 1 - 16.
- Kwon Y. S., Choi W. G., Kim W. J., Kim W. K., Kim M. J., Kang W. H., Kim C. M. (2002) Antimicrobial constituents of *Foeniculum vulgare*. *Arch Pharm Res* **25**: 154 - 157.
- Lee H. S. (2004) Acaricidal activity of constituents identified in *F. Vulgare* fruit oil against *De Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. The American journal of clinical nutrition, 79(5), 727-747.* *matophagoides spp. (Acari: Pyroglyphidae). J Agric Food Chem* **52**: 2887 - 2889.
- Medved A. M. (2019) Izolacija frakcija fenolnih spojeva iz sjemenki komorača primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku, Repozitorij završnih radova Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Zagreb. str. 8.
- Mimica-Dukić N., Kujundžić S., Soković M., Couladis M. (2003) Essential oils composition and antifungal activity of *F. vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytother Res* **17(4)**: 368 - 371.
- Mottaleb M. A., Sarker S. D. (2012) Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation. U: Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology , 3. izd., (Sarker S. D., Nahar L., ured.), Springer, New York/ Dordrecht/ Heidelberg/ London, str. 75-87.

- Napoli E. M., Curcuruto G., Ruberto G. (2010) Screening the essential oil composition of wild Sicilian fennel. *Biochem Syst Ecol* **38(2)**: 213 - 223.
- Nassar M., Aboutabl E., Makled Y., El Khisy E., Osman A. (2010) Secondary metabolites and pharmacology of *Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *Piperitum*. *Revista Latinoamericana de Química* **38(2)**: 103–112.
- Ozbek H., Ugras S., Dulger H., Bayram I., Tuncer I., Ozturk G., Öztürk A. (2003) Hepatoprotective effect of *F. vulgare* essential oil. *Fitoterapia* **74**: 317 - 319.
- Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Schmeda-Hirschman G., Burillo J., Codina C. (2004) Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*F. vulgare* Mill.) waste. *J Agric Food Chem* **52**: 1890 - 1897.
- Park S. H., Seong I. (2010) Antifungal effects of the extracts and essential oils from *F. vulgare* and *Illicium verum* against *Candida albicans*. *Korean J Med Mycol* **15(4)**: 157 - 164.
- Rahimi R., Ardekani M. R. S. (2013) Medicinal properties of *Foeniculum vulgare* Mill. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy. *Chin J Integr Med* **19(1)**: 73 – 79.
- Raut P., Bhosle D., Janghel A., Deo S., Verma C., Kumar S. S., Agrawal M., Amit N., Sharma M, Giri T., Tripathi D. K., Ajazuddin , Alexander A. (2015) Emerging Pressurized Liquid Extraction (PLE) Techniques as an Innovative Green Technologies for the Effective Extraction of the Active Phytopharmaceuticals. *Research Journal of Pharmacy and Technology* **8(6)**: 801 – 812.
- Reiter M., Brandt W. (1985) Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arznei-Forschung* **35(1A)**: 408 – 414.
- Roby M. H. H., Sarhan M. A., Selim K. A. H., Khalel K. I. (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Ind Crop Prod* (**44**): 437 - 445.
- Ruberto G., Baratta M. T., Deans S. G., Dorman H. J. (2000) Antioxidant and antimicrobial activity of *F. vulgare* and *C. maritimum* essential oils. *Planta Med* **66(8)**: 689 - 693.

- Shahat A. A., Ibrahim A. Y., Hendawy S. F., Omer E. A., Hammouda F. M., Abdel-Rahman F. H., Saleh M. A. (2011) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules* **16(2)**: 1366 - 1377.
- Shortle E., O'Grady M.N., Gilroy D., Furey A., Quinn N., Kerry J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98(4)**: 828 - 834.
- Shukla H. S., Dubey P., Chaturvedi R. V. (1988) Antiviral properties of essential oils of *F. vulgare* and *Pimpinella anisum* L. *Agronomie* **9(3)**: 277 - 279.
- Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M. P., & Catalan, C. (2006). Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food control*, **17(9)**, 745-752.
- Stepanović, B., Radanović, D., Šumatić, N., Pržulj, N., Todorović, J., Komljenović, I., & Marković, M. (2001). Tehnologija proizvodnje ljekovitih, aromatičnih i začinskih biljaka. *Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Srpsko Sarajevo*, **1(2)**, 3.
- Šilješ I., Grozdanić Đ., Grgesina, I. (1992) Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja, Školska knjiga, Zagreb. str 53 - 58.
- Zhang Q.-W., Lin L.-G., Ye W.-C. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* **13(1)**: 1 – 26.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Matea Perčić

ime i prezime studenta