

# Bioaktivni potencijal sjemenki samoniklog komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.)

---

Ekić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2020

*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:159:355073>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-15**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Sara Ekić

1224/PI

**BIOAKTIVNI POTENCIJAL  
SJEMENKI SAMONIKLOG  
KOMORAČA (*Foeniculum vulgare*  
Mill.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Maje Repajić te uz pomoć Valentine Kruk, mag.ing.techn.aliment.



**Ovaj rad izrađen je u okviru projekta “Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma” (PlantBioPower, IP-01-2018-4924) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.**

## ZAHVALA

*Veliku zahvalnost dugujem svojoj dragoj mentorici doc.dr.sc. Maji Repajić na nesebičnoj pomoći, uloženom vremenu i svakoj lijepoj upućenoj riječi, kako pri pisanju završnog, tako i pri pisanju diplomskog rada.*

*Na pomoći i ugodnoj atmosferi pri izradi eksperimentalnog rada zahvaljujem Valentini Kruk, mag.ing.techn.aliment.*

*Veliko hvala jedinstvenoj osobi koja je sudjelovala u mojem cjelokupnom školovanju.*

*Najveće hvala mojim roditeljima, bratu i najboljoj prijateljici koji su vjerovali u mene i onda kada ja nisam i bili moja najveća podrška na ovome putu. Bez vaše bezuvjetne ljubavi i strpljenja ništa ne bi bilo kako jest.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### BIOAKTIVNI POTENCIJAL SJEMENKI SAMONIKLOG KOMORAČA (*Foeniculum vulgare* Mill.)

*Sara Ekić, 1224/PI*

**Sažetak:** U ovom radu optimirani su uvjeti ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE) za izolaciju fenolnih spojeva i pigmenata iz sjemenki gorkog komorača primjenom 96 %-tnog etanola, pri čemu je ispitan utjecaj temperature (80 i 110 °C), statičkog vremena (5 i 10 min) i broja ciklusa ekstrakcije (1, 2, 3 i 4 ciklusa). Statistička analiza pokazala je da su svi ispitani parametri ekstrakcije imali statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) na masene udjele ispitivanih spojeva, izuzev statičkog vremena na maseni udio ukupnih karotenoida ( $p = 0,11$ ). Najviši prinosi ukupnih fenola i ukupnih klorofila dobiveni su pri 110 °C/10 min/4 ciklusa, a ukupnih karotenoida pri 110 °C/10 min/3 ciklusa. Također, ispitan je bioaktivni potencijal sjemenki samoniklog komorača sakupljenih s više lokacija na području Istre (Republika Hrvatska), gdje su u ekstraktima sjemenki dobivenim primjenom ASE prema prethodno definiranim uvjetima (110 °C/10 min/4 ciklusa) spektrofotometrijski određeni: ukupni fenoli u rasponu 256,12-392,12 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>, klorofil *a* 0,94-4,48 mg 100 g<sup>-1</sup>, klorofil *b* 1,25-3,78 mg 100 g<sup>-1</sup>, ukupni klorofili 2,19-7,55 mg 100 g<sup>-1</sup>, ukupni karotenoidi 2,28-6,48 mg 100 g<sup>-1</sup> te antioksidacijski kapacitet (FRAP) 2,21-3,47 mmol TE 100 g<sup>-1</sup>. Obzirom na lokaciju, statistička analiza pokazala je značajne razlike u zastupljenosti navedenih spojeva u sjemenkama samoniklog komorača.

**Ključne riječi:** *sjemenke komorača, ASE, ukupni fenoli, biljni pigmenti, antioksidacijski kapacitet*

**Rad sadrži:** 63 stranica, 20 slika, 5 tablica, 69 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *doc.dr.sc. Maja Repajić*

**Pomoć pri izradi:** *Valentina Kruk, mag.ing.techn.aliment.*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. *Ivona Elez-Garofulić*
2. Doc.dr.sc. *Maja Repajić*
3. Izv.prof.dr.sc. *Sandra Albino*
4. Prof.dr.sc. *Verica Dragović-Uzelac* (zamjena)

**Datum obrane:** 23. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### BIOACTIVE POTENTIAL OF WILD FENNEL SEEDS (*Foeniculum vulgare* Mill.)

*Sara Ekić, 1224/PI*

**Abstract:** In this work, accelerated solvent extraction (ASE) conditions for the isolation of phenolic compounds and pigments from bitter fennel seeds using 96% ethanol were optimized, where the influence of temperature (80 and 110 °C), static time (5 and 10 min) and number of extraction cycles (1, 2, 3 and 4 cycles) was tested. Statistical analysis showed that all examined extraction parameters significantly affected ( $p < 0.01$ ) the mass fractions of the analyzed compounds, except for static time on the mass fraction of total carotenoids. The highest yields of total phenols and total chlorophylls were obtained at 110 °C/10 min/4 cycles and total carotenoids at 110 °C/10 min/3 cycles. Furthermore, the bioactive potential of wild fennel seeds collected from several locations in the Istria (Republic of Croatia) was also examined, where in ASE extracts obtained at previously defined conditions (110 °C/10 min/4 cycles) spectrophotometrically were determined: total phenols in range 256.12-392.12 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>, chlorophyll *a* 0.94-4.48 mg 100 g<sup>-1</sup>, chlorophyll *b* 1.25-3.78 mg 100 g<sup>-1</sup>, total chlorophylls 2.19-7.55 mg 100 g<sup>-1</sup>, total carotenoids 2.28-6.48 mg 100 g<sup>-1</sup> and antioxidant capacity (FRAP) 2,21-3,47 mmol TE 100 g<sup>-1</sup>. Considering the location, statistical analysis showed significant differences in the presence of analyzed compounds in wild fennel seeds.

**Keywords:** *fennel seeds, ASE, total phenols, plant pigments, antioxidant capacity*

**Thesis contains:** 63 pages, 20 figures, 5 tables, 69 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD. Maja Repajić, Assistant professor*

**Technical support and assistance:** *Valentina Kruk, mag.ing.techn.aliment.*

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Ivona Elez-Garofulić*, Assistant professor
2. PhD. *Maja Repajić*, Assistant professor
3. PhD. *Sandra Balbino*, Associate professor
4. PhD. *Verica Dragović-Uzelac*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** September 23<sup>rd</sup> 2020



## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. KOMORAČ.....	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV SJEMENKI KOMORAČA .....	3
2.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI SJEMENKI KOMORAČA .....	4
2.3.1. Fenolni spojevi.....	4
2.3.2. Pigmenti.....	7
2.3.3. Ostali biološki aktivni spojevi.....	9
2.4. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA .....	13
2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE).....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	19
3.1. MATERIJAL .....	19
3.1.1. Sjemenke komorača.....	19
3.1.2. Kemikalije i standardi.....	19
3.1.3. Aparatura i pribor .....	21
3.2. METODE .....	22
3.2.1. ASE .....	22
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola .....	24
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje biljnih pigmenata .....	26
3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	27
3.2.5. Statistička analiza .....	29
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	30
4.1. OPTIMIRANJE ASE UVJETA.....	31
4.1.1. Utjecaj ASE na udio ukupnih fenola u sjemenkama komorača .....	32
4.1.2. Utjecaj ASE na udio klorofila u sjemenkama komorača .....	36
4.1.3. Utjecaj ASE na udio ukupnih karotenoida u sjemenkama komorača.....	42
4.2. BIOAKTIVNI POTENCIJAL SJEMENKI SAMONIKLOG KOMORAČA.....	45
4.2.1. Utjecaj lokacije na udio ukupnih fenola u sjemenkama samoniklog komorača.....	45
4.2.2. Utjecaj lokacije na udio klorofila u sjemenkama samoniklog komorača.....	47
4.2.3. Utjecaj lokacije na udio ukupnih karotenoida u sjemenkama samoniklog komorača .....	50
4.2.4. Utjecaj lokacije na antioksidacijski kapacitet sjemenki samoniklog komorača.....	51

<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>54</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>56</b>

# 1. UVOD

Bioaktivni spojevi danas su nezaobilazan sastojak raznih farmaceutskih, kozmetičkih i prehrambenih proizvoda. Samim time ne čudi strahoviti porast broja znanstvenih istraživanja o njihovoj prisutnosti u različitim biljnim materijalima poput sjemenki komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.). One predstavljaju važan izvor bioaktivnih komponenti od kojih se posebno ističu fenolni spojevi i prisutni biljni pigmenti koji posjeduju snažno antioksidacijsko djelovanje. Zastupljenost bioaktivnih spojeva i antioksidacijski kapacitet zasigurno su direktno povezani s blagotvornim djelovanjem na endokrini, gastrointestinalni i respiratorni sustav, a potom i s nizom znanstveno dokazanih farmakoloških učinaka od kojih prednjače antibakterijski, antikancerogeni, diuretski te protuupalni učinak.

Primjena navedenih bioaktivnih spojeva iz sjemenki komorača iziskuje njihovu optimalnu ekstrakciju koja rezultira dobivanjem ekstrakata s najvišim udjelom bioaktivnih spojeva te smanjenjem eksperimentalnih troškova. U skladu s time, jedna od obećavajućih te ujedno ekološki prihvatljivih metoda je ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE). ASE je jednostavna, učinkovita i automatizirana metoda čije su glavne odlike povećanje ekstrakcijskih prinosa te znatno smanjenje utroška energije i primijenjenog otapala. Trend uporabe ekološki prihvatljivih metoda popraćen je i primjenom ekološki prihvatljivih otapala od kojih veliku važnost, gledano s ekonomskog i toksikološkog stajališta, ima etanol. Shodno tomu, u budućnosti bi etanolni ekstrakti sjemenki komorača dobiveni ASE tehnikom, mogli imati vrlo široku primjenu u prehrambenoj industriji.

Stoga je prvobitni cilj ovog diplomskog rada bio optimirati ekstrakcijske uvjete, temperaturu (80 i 110 °C), statičko vrijeme (5 i 10 min) i broj ciklusa (1, 2, 3, 4 ciklusa) ASE za izolaciju bioaktivnih spojeva (fenolni spojevi, klorofili, karotenoidi) iz sjemenki komorača primjenom 96 %-tnog etanola. Konačni cilj bio je uz primjenu definiranih ekstrakcijskih uvjeta ASE spektrofotometrijski odrediti udio prethodno navedenih bioaktivnih spojeva i antioksidacijski kapacitet u sjemenkama samoniklog komorača s različitih lokacija na području Istre (Republika Hrvatska).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KOMORAČ

Komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) je kultivirana ili samonikla, aromatična, višegodišnja zeljasta biljka iz obitelji štitarki (*Apiaceae*). *Foeniculum vulgare* Mill. (slika 1) se može opisati kao uspravna, razgranata biljka, slična kopru, koja može narasti i do 2 metra visine, svjetlozelene boje s višestruko razgranatim lišćem koje može narasti i do 40 centimetara. Cvijet komorača je sitan, svjetlozlatne boje, a cvate u srpnju i kolovozu. Sjemenke komorača su lagano zakrivljene, zelenkasto-žute boje.



**Slika 1.** *Foeniculum vulgare* Mill. (Douglas Schneider, 2014)

Komorač potječe s južnog Sredozemlja, a uslijed naturalizacije i kultivacije proširio se po cijeloj sjevernoj, istočnoj i zapadnoj polutki, osobito Aziji, sjevernoj Americi i Europi (Badgujar i sur., 2014). Za kultivaciju komorača pogodna su subtropska i umjerena područja (Javed i sur., 2020) u blizini morskih i riječnih obala (Teimoori-Boghsani i sur., 2018). U Republici Hrvatskoj, komorač je zastupljen pretežito u Dalmaciji, Istri i Primorju gdje je poznat i pod nazivima koromač te morač. U uzgoju komorača prednjače Pakistan, Indija, Italija, Rusija, Sjedinjene Američke Države, Njemačka i Francuska (Javed i sur., 2020).

Pojedini autori navode dvije podvrste komorača, *piperitum* i *vulgare*. Podvrsta *vulgare* dijeli se na dva varijeteta, var. *vulgare*, tj. samonikli komorač, koji je samonikli te var. *dulce*, tj. slatki

komorač, koji se uzgaja. Podvrsta *piperitum* ima gorke, a podvrsta *vulgare* slatke sjemenke (Díaz-Maroto i sur, 2006), no morfološke razlike između ove dvije podvrste nisu uvijek jasno definirane (Anka i sur., 2020).

## 2.2. KEMIJSKI SASTAV SJEMENKI KOMORAČA

U tablici 1 prikazan je kemijski sastav sjemenki komorača. Anka i sur. (2020) navode niže vrijednosti u udjelu vode (6,3 %), proteina (9,5 %), masti (10 %), ugljikohidrata (42,3 %) i vlakana (18,5 %). Također, Saber i Eshra (2019), u svome su istraživanju dobili niže vrijednosti za vodu (8,04 %), proteine (10,18 %), masti (10,71 %), ugljikohidrate (40,19 %) i vlakna (18,01 %) dok je dobivena vrijednost za pepeo (12,87 %) viša od vrijednosti prema USDA (2019) (tablica 1). Uspoređujući mineralni sastav, znatno viša vrijednost zabilježena je u radu Saber i Eshra (2019) za mangan (209,35 mg 100 g<sup>-1</sup>). Komorač se navodi kao jedan od najboljih biljnih izvora fosfora, kalcija, kalija i natrija (Badgular i sur., 2014). Od vitamina su najzastupljeniji vitamin C (21 mg 100 g<sup>-1</sup>), niacin (6,05 mg 100 g<sup>-1</sup>), vitamin B6 (0,47 mg 100 g<sup>-1</sup>), tiamin (0,408 mg 100 g<sup>-1</sup>) i riboflavin (0,353 mg 100 g<sup>-1</sup>) (USDA, 2019). Iz tablice 1 vidljivo je kako su ugljikohidrati najzastupljeniji makronutrijenti, dok su proteini i masti manje zastupljeni.

**Tablica 1.** Kemijski sastav sjemenki komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) (USDA, 2019)

<i>Hranjive tvari</i>	<i>Maseni udio (g 100 g<sup>-1</sup>)</i>	<i>Minerali</i>	<i>Maseni udio (mg 100 g<sup>-1</sup>)</i>
<i>Voda</i>	8,81	<i>Kalcij, Ca</i>	1196
<i>Proteini</i>	15,8	<i>Željezo, Fe</i>	18,54
<i>Masti</i>	14,87	<i>Magnezij, Mg</i>	385
<i>Ugljikohidrati</i>	52,29	<i>Fosfor, P</i>	487
<i>Vlakna</i>	39,8	<i>Kalij, K</i>	1694
<i>Pepeo</i>	8,22	<i>Natrij, Na</i>	88
		<i>Cink, Zn</i>	3,7
		<i>Bakar, Cu</i>	1,067
		<i>Mangan, Mn</i>	6,533

## 2.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI SJEMENKI KOMORAČA

### 2.3.1. Fenolni spojevi

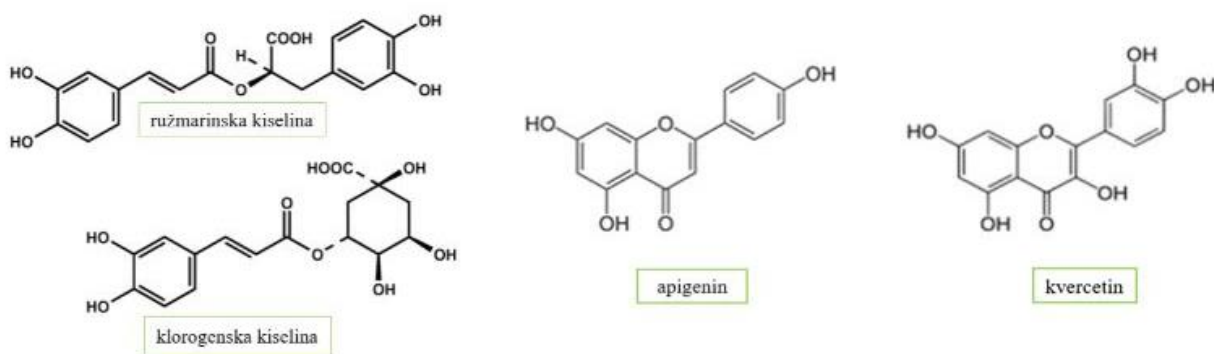
Fenolni spojevi su jedna od najbrojnijih skupina sekundarnih biljnih metabolita u prirodi, a uključuju fenolne kiseline, flavonoide, kumarine, lignane, stilbene i tanine. Navedeni spojevi međusobno se razlikuju po kemijskoj strukturi koja u osnovi uključuje aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Strukturno se mogu podijeliti u dvije skupine ovisno o broju aromatskih prstenova u molekuli, a to su monofenoli (fenolne kiseline i njihovi derivati te jednostavni fenoli) i polifenoli (flavonoidi). Osobito zastupljeni fenolni spojevi su fenolne kiseline koje se dijele na derivate hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, a koji se međusobno razlikuju ovisno o stupnju hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena. Flavonoidi se dijele na antocijanidine, izoflavone, flavanole (katehini), flavanone, flavone, flavonole i međusobno razlikuju ovisno o konjugaciji između prstenova te položaju hidroksilnih i glikozidnih skupina.

Među raznim spojevima koji se nalaze u ekstraktu komorača, fenolni spojevi smatraju se najvažnijim i najaktivnijim spojevima (Kooti i sur., 2015). *F. vulgare* sadrži fenolne spojeve poput flavonoida, fenolnih kiselina, kumarina i tanina (Kooti i sur., 2015).

Fenolne kiseline uključuju: 3-*O*-kafeoilkinu kiselinu, 4-*O*-kafeoilkinu kiselinu, 5-*O*-kafeoilkinu kiselinu, 1,3-*O*-di-kafeoilkinu kiselinu, 1,4-*O*-di-kafeoilkinu kiselinu, 1,5-*O*-di-kafeoilkinu kiselinu, ružmarinsku kiselinu (Faudale i sur., 2008; Kooti i sur., 2015; Rather i sur., 2016; Anka i sur., 2020; Javed i sur., 2020) i *p*-kumarinsku kiselinu (Kalleli i sur., 2019). Uz navedene, Javed i sur. (2020), u sjemenkama komorača ističu i prisustvo klorogenske kiseline, kao i flavonoidne spojeve apigenin i kvercetin. Flavonoidi uključuju i eriodiktiol-7-rutinozid i kvercetin-3-rutinozid (Faudale i sur., 2008). U vodenom ekstraktu sjemenki komorača identificirani su još: kvercetin-3-*O*-galaktozid, kemferol-3-*O*-rutinozid, kemferol-3-*O*-glukozid (Rather i sur., 2016; Anka i sur., 2020; Javed i sur., 2020), kvercetin-3-*O*-glukuronid, kemferol-3-*O*-glukuronid, izokvercetin i izoramnetin-3-*O*-glukozid (Parejo i sur., 2004). Trimeri diglukozidnih stilbena i derivati benzoizofuranona također su izolirani iz sjemenki *F. vulgare* zajedno s *cis*-mijabenolom C, *trans*-mijabenolom C, *trans*-resveratrol-3-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozidom, sinapil glikozidom, siringin-4-*O*- $\beta$ -glukozidom, oleanolinskom kiselinom, 7 $\alpha$ -hidroksikampesterolom, (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,22*E*) 5,8-

epidioksi-ergosta-6,22-dien-3-olom i 2,3-dihidropropilheptadeka-5-enoatom (De Marino i sur., 2007).

Roby i sur. (2012) dokazali su kako su glavni fenolni spojevi prisutni u metanolnom ekstraktu sjemenki komorača, ružmarinska i klorogenska kiselina, dok su kvercetin i apigenin glavni flavonoidi (slika 2). Kalleli i sur. (2019) identificirali su u kultivarima komorača 12 fenolnih kiselina, 5 flavanola, 5 flavona i 2 flavanona. Dva spoja prvi su put izolirana i identificirana iz samoniklog komorača, 3,4-dihidroksi-feniletil-6-*O*-kafeoil- $\beta$ -D-glukopiranozid i 3', 8'-binaringenin (Badgular i sur., 2014).



**Slika 2.** Kemijska struktura ružmarinske i klorogenske kiseline (Abdullah i sur., 2008) te apigenina i kvercetina (Jangdey i sur., 2018)

Udio fenolnih spojeva razlikuje se ovisno o dijelu biljke komorača (cvijet, korijen, plod, stabljika) i agroekološkim uvjetima u kojima komorač uspijeva. Rezultati istraživanja u kojem su korišteni metanolni ekstrakti različitih dijelova komorača pokazuju visoki fenolni udio u cvatovima, listovima, izdancima i stabljikama, dok su flavonoidi detektirani samo u izdancima (Sayed-Ahmad i sur., 2017). Prema istraživanju Teimoori-Boghsani i sur. (2018) ukupni fenolni udio viši je u cvjetovima i lišću u fazi cvjetanja u odnosu na druge dijelove biljke. Ukupni udio fenola značajno se razlikuje i među kultivarima uzgajanim pod istim agroekološkim uvjetima (Kalleli i sur., 2019). Ukupni fenolni i flavonoidni udio kod samoniklog komorača niži je u odnosu na kultivirani komorač (Ghanem i sur., 2012). Ferioli i sur. (2017) također navode kako na sastav cvijeta komorača utječu vrijeme žetve i lokacija. No, na temelju dobivenih rezultata svoga istraživanja nisu mogli utvrditi da li je utjecaj lokacije (uzorci s mediteranskih i kontinentalnih lokaliteta)

posljedica klimatskih razlika ili različitog karaktera lokalno prilagođene populacije. Također, na prinos ekstrakcije fenolnih spojeva znatan utjecaj imaju i organska otapala, njihova vrsta i polarnost. Obično se najviši prinosi bilježe primjenom etanola i metanola. Upotrijebiti se mogu i otapala poput acetona i etil acetata, kao i smjese prethodno navedenih otapala s vodom. Hidroetanolne smjese (EtOH > 50 %), zakiseljene ili nezakiseljene, preferirana su otapala za ekstrakciju polifenola. Raspon temperature kreće se obično između 40-60 °C za termolabilne i 75-220 °C za termostabilne fenolne spojeve (Alvarez-Rivera i sur., 2020). Angelov i Boyadzhieva (2016) uspoređivali su utjecaj dvaju otapala, vode i smjese etanola i vode. Polarnost navedene smjese varirala je ovisno o udjelu sastojaka što može biti povoljno za ekstrakciju fenolnih spojeva s različitim polarnošću. Rezultati su također pokazali kako ekstrakcija provedena vodom daje koncentriranije ekstrakte koji sadrže više polifenola i flavonoida, a s time u skladu imaju i viši antioksidacijski kapacitet.

Smatra se kako komorač može inhibirati slobodne radikale uslijed visokog udjela polifenola i flavonoida (Kooti i sur., 2015). Fenolni spojevi komorača, poput derivata kafeinske kiseline, ružmarinske kiseline, eriodiktiol-7-*O*-rutinozida, kvercetin-3-*O*-galaktozida i kemferol-3-*O*-glukozida pokazuju antioksidacijsku aktivnost (Kooti i sur., 2015). Doprinos fenolnih spojeva antioksidacijskom djelovanju dokazali su Angelov i Boyadzhieva (2016) te Teimoori-Boghsani i sur. (2018), pokazavši kako ekstrakti s višom koncentracijom ciljanih spojeva (polifenoli, flavonoidi) imaju viši antioksidacijski kapacitet. Teimoori-Boghsani i sur. (2018) uočili su i kako uzorak (ekstrakt cvijeta komorača) s najvišim udjelom fenola i flavonoida, osim najvišeg antioksidacijskog kapaciteta, pokazuje i najviši ksantin oksidaza inhibirajući efekt. Inhibirajući efekt može se povezati i sa svojom interakcijom fenolnih spojeva s proteinima. Moguće je da je inhibitorni učinak mnogih fenolnih spojeva na aktivnost ksantin oksidaze uzrokovan njihovim sličnim strukturama ili nekompetitivnom inhibicijom (Teimoori-Boghsani i sur., 2018).

Oktay i sur. (2003) navode kako su sjemenke komorača potencijalni i lako dostupni izvor prirodnih antioksidansa jer su svi ispitivani vodeni i etanolni ekstrakti sjemenki komorača pokazali viši antioksidacijski kapacitet od 100 mg  $\alpha$ -tokoferola. No, u istom istraživanju navodi se i kako ne postoji poveznica između antioksidacijskog kapaciteta i udjela ukupnih fenola. Činjenica je da antioksidacijskom kapacitetu pridonose prisutne hidroksilne skupine u molekuli fenola koje su



dobri proton donori te mogu reagirati s reaktivnim dušikom odnosno kisikom i tako spriječiti nastajanje novih slobodnih radikala.

Utjecaj na antioksidacijska svojstva mogu imati različiti postupci hidroksilacije i glikozilacije (Teimoori-Boghsani i sur., 2018), kao i faza razvoja ploda. Ekstrakti od različitih osušenih dijelova komorača pokazuju najviši antioksidacijski kapacitet tijekom rane faze razvoja ploda, koja je karakterizirana najmanjim udjelom flavonoida i najvišim udjelom fenolnih kiselina (Faudale i sur., 2008). Osim antioksidacijskog kapaciteta usporedivog sa sintetskim komponentama kao što su butilirani hidroksianizol (BHA) i butilirani hidroksitoluen (BHT), Ferioli i sur. (2017) navode i značajnu sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala. U skladu s time, važno je ispitati i pigmente prisutne u sjemenkama komorača koji također doprinose antioksidacijskom kapacitetu.

### 2.3.2. Pigmenti

Fotosintetski pigmenti, klorofili i karotenoidi, spojevi su različite kemijske strukture koji imaju ulogu u apsorpciji i prijenosu svjetlosti tijekom fotosinteze te su zajedno s proteinima ugrađeni u tilakoidne membrane kloroplasta. Netopljivi su u vodi i staničnom soku, a topljivi u mastima i nekim organskim otapalima. Klorofili *a*, *b*, *c*, *d* i *e* su svjetlozeleni pigmenti zastupljeni u višim fotosintetskim biljkama, algama i skupini fotosintetskih bakterija. Osnovnu strukturu klorofila čine četiri pirolna prstena međusobno povezana ugljikovim mostom. U središtu porfirinskoga prstena, nalazi se atom magnezija. Najzastupljeniji klorofili, *a* i *b*, međusobno se strukturno razlikuju. Klorofil *a* (modrozelen) na drugom pirolnom prstenu ima metilnu skupinu (-CH<sub>3</sub>), a klorofil *b* (žutozelen) aldehidnu skupinu (-CHO). Kvantitativni odnos klorofila *a* i *b* otprilike iznosi 3:1. Antioksidacijsko djelovanje klorofila, povezano s njihovom hidrofobnošću i kemijskom strukturom, jedno je od njihovih najznačajnijih djelovanja.

Strukturno gledano, karotenoidi su tetraterpeni koji se sastoje od 40 C atoma i velikog broja konjugiranih dvostrukih veza odgovornih za apsorpciju svjetlosti. Dijeleg se na neoksigenirane karotene i oksigenirane ksantofile. Najčešći karoteni su  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten,  $\gamma$ -karoten i likopen, a najčešći ksantofili su astaksantin,  $\beta$ -kriptoksantin, lutein i zeaksantin. Odgovorni su za žutu (ksantofili), narančastu (karoteni) i crvenu (likopeni) boju cvijeća, lišća, povrća, voća i žitarica. Navodi se kako udio karotenoida u povrću i voću varira ovisno o genetskoj raznolikosti, stadiju

zrelosti, metodi i vremenu žetve, načinu pakiranja i skladištenja te pripremi (Britton i Khachik, 2009). Jedan od najpoznatijih karotenoida jest  $\beta$ -karoten koji je ujedno i prekursor vitamina A. Karotenoidi se također povezuju s poboljšanjem imunološkog sustava ljudi i smanjenjem rizika od degenerativnih bolesti, kao što su rak, kardiovaskularne bolesti, dobna degeneracija makule i stvaranje katarakte (Britton i Khachik, 2009).

Parmoon i sur. (2018) proučavali su učinak biljnih regulatora rasta (putrescin, 24-epibrazinolid, metil jasmonat) na fotosintetske pigmente i rast komorača. Rezultati istraživanja pokazali su značajan učinak primjene 0.5 mM putrescina na povećanje udjela klorofila *a* (62,5 %), *b* (104,6 %), ukupnih klorofila (72,5 %) i karotenoida (50,8 %), dok je primjena 0.1  $\mu$ M 24-epibrazinolida dovela je do znatnog porasta klorofila *a* (133,3 %), ukupnih klorofila (153,6 %) i karotenoida (42,9 %). Komorač tretiran s 50  $\mu$ M metil jasmonata pokazao je više koncentracije klorofila *a* (91,0 %), ukupnih klorofila (95,1 %) i karotenoida (58,8 %).

Poznato je kako je cink jedan od esencijalnih mikronutrijenta biljaka, potreban u optimalnoj koncentraciji za rast i razvoj biljke. Također, cink je kofaktor, zadužen za funkciju i strukturu različitih proteina (enzima, transkripcijskih faktora) nužnih za zaštitu integriteta i propusnosti plazma membrane. Povećana koncentracija cinka u biljkama može rezultirati starenjem i smrću biljke uslijed inhibicije fotosinteze i rasta biljke. Tako su Majdoub i sur. (2017) istraživali koliko sposobnost akumulacije cinka u komoraču i drugim ljekovitim biljkama (anis i kopar) utječe na morfofiziološka svojstva komorača, a između ostalog i na fotosintetske pigmente. Udio pigmenata dvaju različitih kultivara slatkog komorača bio je viši prije tretmana cinkom nego nakon tretmana (tablica 2). Nadalje, rezultati ovog istraživanja pokazuju znatno smanjenje udjela karotenoida uslijed povećane koncentracije cinka (tablica 2). Autori kao moguća objašnjenja za rezultate dobivene nakon tretmana cinkom navode degradaciju tilakoida, inhibiciju enzimskih aktivnosti uključenih u biosintezu klorofila, naprednu peroksidaciju lipida u membrani kloroplasta reaktivnim kisikovim radikalima (ROS), nedostatak željeza, uklanjanje magnezija iz klorofila i sl.

**Tablica 2.** Utjecaj cinka na fotosintetske pigmente komorača (Majdoub i sur., 2017)

<i>Pigment (mg g<sup>-1</sup> svježje mase)</i>	<i>Kultivar</i>	<i>Prije tretmana cinkom</i>	<i>Nakon tretmana cinkom</i>
<i>Klorofil a</i>	1	0,98	0,66
	2	1,12	0,80
<i>Klorofil b</i>	1	0,68	0,40
	2	0,84	0,59
<i>Ukupni klorofil (a+b)</i>	1	1,67	1,06
	2	1,97	1,39
<i>Karotenoidi</i>	1	0,48	0,08
	2	0,49	0,01

### 2.3.3. Ostali biološki aktivni spojevi

Badgubar i sur. (2014) navode kako je oko dvadeset i jedna masna kiselina identificirana i kvantificirana iz različitih dijelova komorača. Pri tome, jedni autori smatraju kako su polinezasićene masne kiseline (PUFA) glavna skupina masnih kiselina prisutna u svim dijelovima komorača, dok drugi smatraju kako su to ipak mononezasićene masne kiseline (MUFA). U prilog drugoj skupini autora ide i podatak da je u sjemenkama komorača, 9,91 g mononezasićenih (18:1), a svega 1,69 g polinezasićenih (18:2) i 0,48 g zasićenih (16:0) masnih kiselina (USDA, 2019). Osobita pozornost danas se posvećuje fitosterolima koji sve češće pronalaze svoju primjenu u farmaceutskim, kozmetičkim i prehrambenim proizvodima. Sayed-Ahmad i sur. (2017) navode kako se uljne sjemenke iz obitelji *Apiaceae* smatraju dobrim izvorom fitosterola, pri čemu su  $\beta$ -sitosterol i stigmasterol uglavnom najzastupljeniji, a  $\Delta^5$ -avenasterol, lanosterol, brasikasterol i kampesterol manje zastupljeni spojevi. Stoga su, u uzorku sjemenki komorača određene količine  $\beta$ -sitosterola (48,8 mg 100 g<sup>-1</sup>), stigmasterola (57,6 mg 100 g<sup>-1</sup>),  $\Delta^5$ -avenasterola (40,9 mg 100 g<sup>-1</sup>) i kampesterola (9 mg 100 g<sup>-1</sup>) (Islam i sur., 2017). Također, važno je spomenuti kako su u sjemenkama komorača zastupljene i esencijalne aminokiseline poput leucina (0,996 g), lizina (0,758 g) i valina (0,915 g) (USDA, 2019). Mallik i sur. (2020) dokazali su kako su u komoraču prisutni alkaloidi, flavonoidi, kumarini, saponini, steroidi i tanini. Osim navedenih spojeva, važno

je napomenuti kako su brojna ranija fitokemijska istraživanja dokazala prisutnost biološki vrijednih spojeva kao što su hlapljivi spojevi.

Hlapljivi spojevi najvećim su dijelom prisutni u eteričnom ulju komorača (slika 3). Badgujar i sur. (2014) navode kako je više od 87 hlapljivih komponenata prisutno u eteričnom ulju komorača. Najzastupljenije komponente eteričnog ulja sjemenki komorača su: *trans*-anetol, estragol (metil kavikol), fenhon i d-limonen (Sayed-Ahmad i sur., 2017; Kalleli i sur., 2019), a prisutni su i  $\alpha$ -pinen te kamfen (Javed i sur., 2020).



**Slika 3.** Eterično ulje komorača (TradeIndia, 2020)

Koncentracija navedenih komponenata je promjenjiva i ovisi o nekoliko različitih faktora: sorti sjemena (Sayed-Ahmad i sur., 2017), uvjetima uzgoja (Javed i sur., 2020), okolišnim uvjetima (Sayed-Ahmad i sur., 2017), prinosu (Belabdelli i sur., 2020), geografskom podrijetlu (Anka i sur., 2020), metodama ekstrakcije (Anka i sur., 2020; Belabdelli i sur., 2020) te akumulaciji hlapljivih komponenata unutar biljke (Díaz-Maroto i sur., 2006). Također, važan faktor je i vegetativno stanje biljke, gdje Anka i sur. (2020) navode da se udio eteričnog ulja smanjuje sa zrelošću sjemenki. Udio pojedinih komponenti, ovisan je i o vrsti eteričnog ulja komorača. Smatra se kako eterično ulje slatkog komorača sadrži viši udio *trans*-anetola i estragola (Belabdelli i sur., 2020) tj. da je *trans*-anetol najzastupljeniji u var. *dulce* (Kalleli i sur., 2019), dok eterično ulje gorkog komorača sadrži više estragola, fenhona,  $\alpha$ -pinena i limonena (Belabdelli i sur., 2020), odnosno da je estragol najzastupljeniji u var. *vulgare* (Kalleli i sur., 2019). Spomenuti estragol, danas je sve češći predmet istraživanja znanstvenika diljem svijeta jer je strukturno sličan metil eugenolu koji je nedavno proglašen potencijalno kancerogenim (Anka i sur., 2020). Poznato je kako je estragol

potencijalno kancerogen za glodavce, no ne i za ljude. U prilog tomu idu i nedavno objavljena istraživanja koja ne navode njegovu direktnu kancerogenu aktivnost (Anka i sur., 2020). Ipak, Europska unija odlučila je ograničiti njegov udio u bezalkoholnim napitcima na 10 mg kg<sup>-1</sup> (Zeller i Rychlik, 2006), a Europska agencija za lijekove (EMA) aktivno izvještava o primjeni biljnih medicinskih proizvoda koji sadrže estragol, s posebnim interesom za komorač (sjemenke, eterično ulje) i anis (sjemenke) te je preporučila dnevne doze za djecu i odrasle. Kancerogena aktivnost estragola povezuje se s njegovom metaboličkom aktivacijom koja dovodi do stvaranja nestabilnih molekula i aktivnih radikala koji tvore adukte s nukleinskim kiselinama i na taj način oštećuju DNK (Anka i sur., 2020). Biotransformacija estragola, samim time i brojnost mutagenih metabolita proporcionalno se povećava s dozom. Jasno je kako se biotransformacije tvari razlikuju kod životinja i ljudi pa se onda samim time postavlja i pitanje kolika je doista mogućnost formiranja mutagenih metabolita estragola kod ljudi. Odgovor na to pitanje dao je Akbar (2020) rekavši da je rizik od opažene kancerogenosti estragola kod glodavaca precijenjen i da ga nije moguće ekstrapolirati na ljude.

Estragol i *trans*-anetol, koriste se u farmaceutskoj, parfemskoj i prehrambenoj industriji. Primjena u prehrambenoj industriji, osobito je karakteristična za *trans*-anetol koji uvelike pridonosi slatkom mirisu i okusu komorača. Ukupna količina *trans*-anetola u komoraču je 2090 mg kg<sup>-1</sup> (Kooti i sur., 2015). *Trans*-anetol i estragol smatraju se odgovornima za karakteristični miris anisa kod sjemenki komorača što ih čini pogodnima za aromatiziranje hrane i napitaka (Sayed-Ahmad i sur., 2017). Sjemenke komorača sadrže 2,82-3,38 % eteričnog ulja (Kalleli i sur., 2019), a ono se u udjelu od 0,05 % može iskoristiti kao prirodni konzervans baguette kruha, ne mijenjajući mu pri tome teksturu, boju i senzorska svojstva (Fasihifar i sur., 2015). Da bi se sjemenke komorača mogle upotrijebiti kao prirodni, prehrambeni konzervans, osim Javeda i sur. (2020), zaključili su i Saber i Eshra (2019). Oni su proučavali mikrobiološka svojstva biskvita koji je sadržavao različite udjele sjemenki komorača i njihova eteričnog ulja, a bio je skladišten na sobnoj temperaturi tijekom 30, 60 i 90 dana. Rezultati istraživanja pokazali su kako je inhibicija rasta bakterija proporcionalno rasla s povećanjem udjela sjemenki i eteričnog ulja komorača tijekom skladištenja, a tako priređeni biskviti bili su prihvaćeni i od strane panelista. Uslijed bioloških aktivnosti, nadaleko je poznata uporaba eteričnih ulja i u farmaceutskoj industriji. Eterično ulje komorača tako se odlikuje vrijednim antibakterijskim, antifungalnim i antioksidacijskim učincima (Sayed-Ahmad i sur., 2017). Antibakterijske aktivnosti ekstrakata sjemenki komorača i njihova eteričnog ulja na gram-

negativne i gram-pozitivne bakterije, dokazane su u radu Saber i Eshra (2019). U istom radu, zabilježen je jači učinak uzorka na gram-pozitivnu bakteriju *Staphylococcus aureus*, nego na gram-negativnu bakteriju *Escherichia coli*. Antifungalne aktivnosti posebno su zabilježene protiv vrsta *C. albicans* i *Aspergillus* te se smatra kako su ovisne o kemijskom sastavu eteričnog ulja (Belabdelli i sur., 2020). Antioksidacijski kapacitet puno je izraženiji kod eteričnog ulja sjemenki komorača nego kod vodenih i etanolnih ekstrakata (Kooti i sur., 2015; Sayed-Ahmad i sur., 2017), dok Kalleli i sur. (2019) navode kako su u njihovom istraživanju svi ekstrakti sjemenki komorača pokazali bolji antioksidacijski kapacitet nego njihova eterična ulja ovisno o porijeklu. Osim navedenog, eterično ulje komorača djeluje i antikolitički, antimutageno, antispazmodički, antitrombotički, antitumorski, antivirusno, estrogeno, hepatoprotektivno, hipoglikemijski (Badgujar i sur., 2014). Osim opisanih i navedenih pozitivnih farmakoloških učinaka eteričnog ulja komorača, zabilježen je i negativni učinak u radu Skalli i Bencheikh (2011). Pacijentica liječena od epilepsije, s posljednjim napadajem prije 3 godine, razvila je tipični napadaj i ostala bez svijesti nakon konzumacije nekoliko kolača koji su sadržavali nepoznatu količinu eteričnog ulja komorača. Eterično ulje komorača brzo se apsorbira i ispoljava primarnu neurotoksičnost te bi ga pacijenti s epilepsijom trebali izbjegavati. Izrazito je važno podizati svijest liječnika, aromaterapeuta i javnosti o mogućim negativnim učincima biljnih pripravaka, kao i provoditi istraživanja toksičnosti svih komponenata biljnih pripravaka, uključujući i eterična ulja. Općenito, smatra se kako je farmakološki učinak sjemenki komorača uglavnom povezan s eteričnim uljem (Anka i sur., 2020).

Veliki broj istraživanja proveden je posljednjih godina u cilju dokazivanja farmakoloških učinaka sjemenki komorača. Komorač je tako biljka koja se primjenjuje u liječenju i ublažavanju različitih endokrinih, neuroloških, reproduktivnih i respiratornih poremećaja, a osobito gastrointestinalnih, djelujući antispazmodički, olakšavajući probavu i ublažavajući bolove u želudcu.

No, da bi se komorač kao biljni pripravak mogao upotrijebiti u svrhu liječenja, ne smiju postojati rizici kancerogenosti, mutagenosti i teratogenosti, tj. takvi pripravci moraju imati minimalnu toksičnost kao i nuspojave. Budući da sigurnost i doziranje sjemenki *F. vulgare* nije istraženo tijekom trudnoće i ne postoje dostupni podaci o njegovoj teratogenosti, Shayan i sur. (2019) proučavali su teratogeni učinak vodenog ekstrakta sjemenki *Foeniculum vulgare* na fetalni razvoj miševa. Vodeni ekstrakt (0,25 mL), različitih koncentracija (2,5, 12,5 i 25 mg) primjenjivao se

oralno, na dnevnoj bazi od 6. do 15. dana trudnoće. Rezultati dobiveni istraživanjem, pokazali su kako teratogeni učinak vodenog ekstrakta *F. vulgare* ovisi o dozi te da se proporcionalno povećava s povećanjem doze pa tako nije uočen pri koncentraciji od 2,5 mg, dok je pri koncentraciji od 12,5 i 25 mg bio jači. Nastala oštećenja na morfološkoj, skeletnoj i staničnoj razini ukazuju na nužnost izbjegavanja upotrebe komorača u prvom tromjesečju trudnoće kada se odvija organogeneza.

Ranije spomenuti učinak u ublažavanju i liječenju respiratornih poremećaja istraživali su Saber i Eshra (2019). Rezultati njihova istraživanja dokazuju da se napitak pripremljen od sjemenki komorača i njihovog eteričnog ulja može učinkovito primijeniti u ublažavanju kašlja i upale grla. Naime, ispitanicima koji su primjenjivali lijek za liječenje kašlja, preporučen od strane liječnika, bilo je potrebno više od 30 dana kako bi se izliječili, dok je onima koji su primjenjivali pripremljeni napitak trebalo 3 do 7 dana, ovisno o primijenjenoj dozi, kako bi se izliječili. Također, Badgular i sur. (2014) naveli su kako je ekstrakt komorača učinkovit kod bronhijalnih bolesnika.

Farmakološki učinak sjemenki komorača nužno je povezati i s prisutnim bioaktivnim spojevima. Zahvaljujući pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje, od kojih se ističe povezanost s prevencijom bolesti izazvanih oksidativnim stresom, bioaktivni spojevi danas dobivaju ogromnu pozornost liječnika, nutricionista, ali i znanstvenika diljem svijeta. Uzimajući u obzir sve navedeno, optimalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz sjemenki komorača od iznimne je važnosti.

#### 2.4. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Odabir metode i optimiranje uvjeta ekstrakcije jedni su od najvažnijih koraka koji prethode ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala. Ekstrakcija se definira kao prijenos jednog ili više spojeva iz njihovog izvornog materijala (obično biljnog podrijetla) u tekuću fazu (Lloyd i van Wyk, 2012), pri čemu se istovremeno odvijaju difuzija otapala u stanice biljnog materijala, otapanje metabolita u otapalu, difuzija otapala s otopljenim tvarima izvan stanica i ispiranje. Procesima prijenosa mase, difuzije i ispiranja postiže se visoka čistoća, osjetljivost i selektivnost ekstrakta. Odabir ekstrakcijske metode ovisi o vrsti, kemijskoj strukturi i topljivosti bioaktivnih spojeva, kao i o vrsti te fizikalno-kemijskim svojstvima materijala iz kojeg se isti nastoje ekstrahirati. Prilikom odabira, potrebno je proučiti prednosti i nedostatke eksperimentalno prihvatljivih ekstrakcijskih tehnika s ciljem izolacije što kvalitetnijeg i višeg prinosa ciljanih

spojeva. S razvojem tehnologije, kontinuirano se poboljšavaju, ali i razvijaju nove ekstrakcijske tehnike s ciljem povećanja iskoristivosti i učinkovitosti ekstrakcije, skraćivanja vremena ekstrakcije, smanjenja upotrebe organskih otapala, a samim time i negativnih utjecaja na okoliš u odnosu na konvencionalne ekstrakcijske tehnike (Soxhlet ekstrakcija, evakolacija, maceracija, perkolacija, refluks). Konvencionalne ekstrakcijske tehnike, osim velikog utroška energije i otapala, što navodi na nisku učinkovitost (Bursać Kovačević i sur., 2018) imaju štetan utjecaj na prinos i kvalitetu ekstrakata uslijed termalne degradacije bioaktivnih spojeva, a prema svemu tome, nisu „zelene“ tehnologije jer nisu održive niti prihvatljive za okoliš (Putnik i sur., 2019). Neke od novih ekstrakcijskih tehnika su: ekstrakcija uz upotrebu superkritičnih tekućina (SFE), ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE), ekstrakcija superpregrijanom vodom (SWE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija potpomognuta hladnom atmosferskom plazmom (HVED), ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (HPAE), mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME), ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem (PEF), enzimima potpomognuta ekstrakcija (EAE) i ubrzana ekstrakcija otapalima uz povišeni tlak (ASE/PLE).

#### 2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)

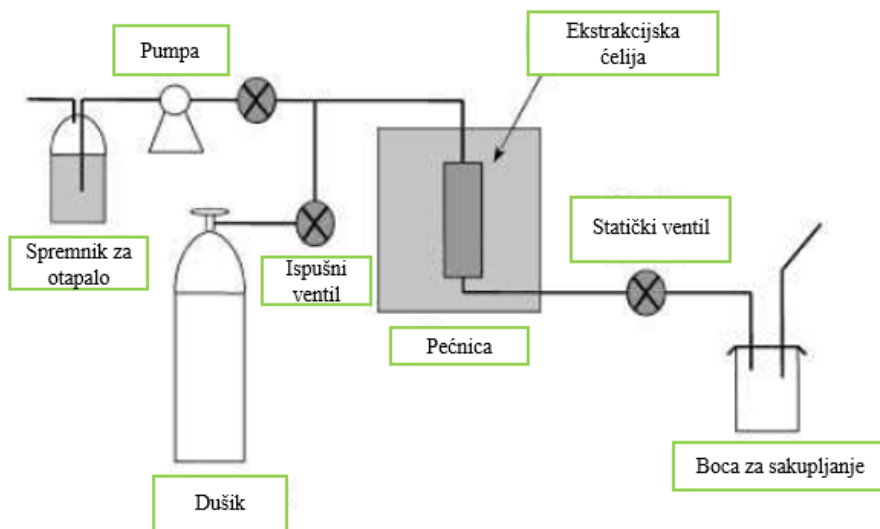
ASE je automatizirana tehnika ekstrakcije koja kombinira povišenu temperaturu (20-200 °C) i tlakove (do 20 MPa) za brzu i učinkovitu ekstrakciju bioaktivnih spojeva (Jentzer i sur., 2015).

ASE tehnologija je automatizirana (Shams i sur., 2015), a uređaj za provođenje ASE relativno je jednostavan (slika 4). U osnovi, sastoji se od spremnika za otapalo, pumpe, pećnice koja sadrži ekstrakcijsku ćeliju, različitih ventila i restriktora te boca za sakupljanje (Alvarez-Rivera i sur., 2020).

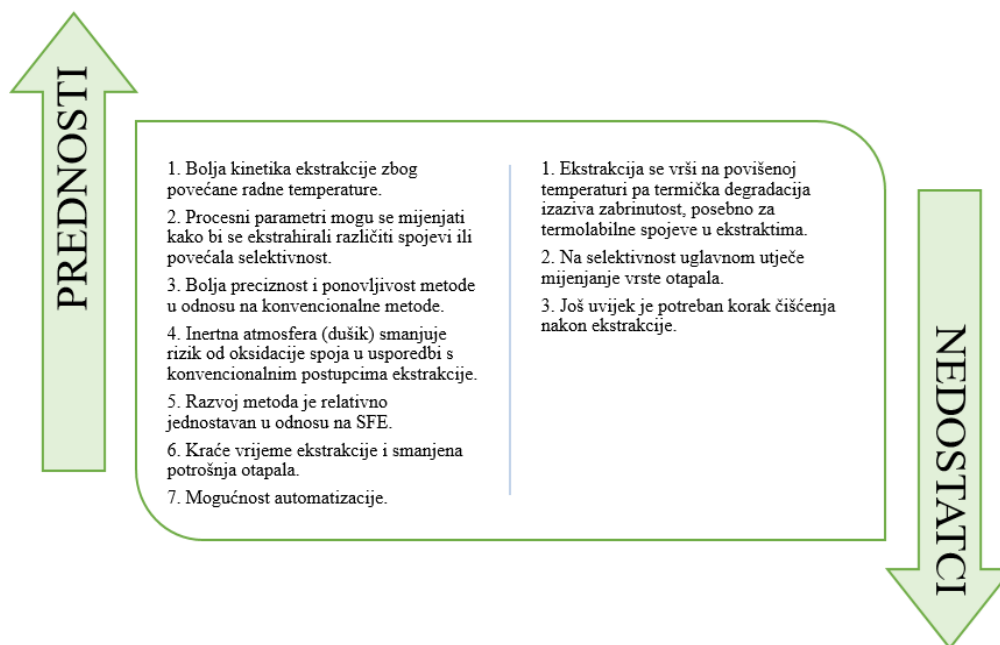
ASE uređaj je razvijen za brzu ekstrakciju kokaina i benzoilekgonina iz lišća koke koristeći metanol kao otapalo (Wang i Weller, 2006). Dionex Inc. kompanija, predstavila ga je 1995. godine. Većina istraživačkih radova o ASE prije 2000. godine bila su povezana s analizom okoliša, tj. ekstrakcijom zagađivača okoliša prisutnih u tlu, mulja iz otpadnih voda, sedimentima (Li i sur., 2006), ali od tada se upotreba ASE za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala znatno povećala (Shams i sur., 2015) te se u novije vrijeme koristi u raznim područjima, uključujući



biologiju, lijekove i prehrambene proizvode (Li i sur., 2006). Usporedno s konvencionalnim tehnikama, ASE se pokazala kao brža, praktičnija, prihvatljivija za okoliš i ne zahtijeva veliku potrošnju energije (Bursać Kovačević i sur., 2018). No, kao i sve ostale tehnike ekstrakcije, ima i određene nedostatke (slika 5).



**Slika 4.** Shema ASE aparature (Shams i sur., 2015)



**Slika 5.** Prednosti i nedostaci ASE (Shams i sur., 2015)

Za brzu i učinkovitu ekstrakciju analita iz čvrstih matrica kao što su biljni materijali, temperatura ekstrakcije je važan eksperimentalni faktor (Shams i sur., 2015), ako ne i daleko najvažniji faktor (Alvarez-Rivera i sur., 2020). Povišena temperatura potiče: *bolju topljivost analita* (Mottaleb i Sarker, 2012; Shams i sur., 2015; Bursać Kovačević i sur., 2018; Alvarez-Rivera i sur., 2020), *bržu difuziju* (Wang i Weller, 2006; Mottaleb i Sarker, 2012; Bursać Kovačević i sur., 2018; Alvarez-Rivera i sur., 2020), *bržu kinetiku ekstrakcije* (Wang i Weller, 2006; Rodríguez-Solana i sur., 2014; Shams i sur., 2015), *brži prijenos mase* (Shams i sur., 2015; Alvarez-Rivera i sur., 2020), *nižu viskoznost otapala* (Mottaleb i Sarker, 2012; Shams i sur., 2015; Bursać Kovačević i sur., 2018; Alvarez-Rivera i sur., 2020), *nižu površinsku napetost otapala* (Alvarez-Rivera i sur., 2020) te *slabi interakcije* (tj. Van der Waalove sile, vodikove sile, dipolne interakcije) *između otapala i analita* (Mottaleb i Sarker, 2012; Shams i sur., 2015; Bursać Kovačević i sur., 2018; Alvarez-Rivera i sur., 2020). Poznato je kako povišena temperatura posljedično dovodi do višeg prinosa. No, valja imati na umu da su neki bioaktivni spojevi ekstrahirani primjenom ASE, termolabilni i visoke temperature mogu negativno utjecati na njihovu bioaktivnost (Li i sur., 2006; Alvarez-Rivera i sur., 2020). Također, s povećanjem temperature ne povećava se samo topljivost analita već i drugih spojeva u uzorku što ASE može učiniti manje selektivnom ekstrakcijskom tehnikom (Alvarez-Rivera i sur., 2020). Isto tako, samo povišenje temperature ne može biti dovoljno za povećanje učinkovitosti ekstrakcije jer mnoga organska otapala koja se koriste u ekstrakciji imaju vrelište na relativno niskim temperaturama. Jedan od načina prevladavanja ovog problema je primjena dovoljnog tlaka tijekom ekstrakcije (Mottaleb i Sarker, 2012). Povišeni tlak omogućava da otapalo ostane u tekućem stanju i iznad točke vrenja (Wang i Weller, 2006; Mottaleb i Sarker, 2012; Shams i sur., 2015). Shodno navedenom, ekstrakcijske ćelije brže se pune, ubrzava se proces ekstrakcije, otapalo lakše i dublje prodire u čvrsti matriks koji se ekstrahira (Wang i Weller, 2006) te se posljedično dobivaju znatno viši prinosi ekstrakcije u usporedbi s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije (Alvarez-Rivera i sur., 2020). Obično se koristi tlak od 5 do 15 MPa (Alvarez-Rivera i sur., 2020) te se ne smatra kritičnim faktorom s eksperimentalnog stajališta (Mottaleb i Sarker, 2012) iako postoje podijeljena mišljenja. Dio autora navodi kako tlak ima mali utjecaj na postupak ekstrakcije, a drugi kako visoki tlak može povećati učinkovitost ekstrakcije „tjerajući“ otapalo u pore matrice (Shams i sur., 2015).

Osim navedenih radnih parametara za ASE, treba spomenuti i broj ciklusa ekstrakcija, statičko vrijeme ekstrakcija, veličinu čestica, volumen ispiranja i otapalo za ekstrakciju (Li i sur., 2006).

Mogućnost izbora širokog raspona otapala za ekstrakciju čini ASE svestranom tehnikom. Otapala različite polarnosti, počevši od *n*-heksana do metanola, mogu se koristiti za ovu tehniku ekstrakcije (Mottaleb i Sarker, 2012). Poželjno je korištenje GRAS otapala (etanol, etil acetat, etil laktat), kao i onih ekološki prihvatljivih. Među njima, „najzelenija“ mogućnost uključuje upotrebu vode (SWE) (Alvarez-Rivera i sur., 2020). S toksikološkog stajališta, etanol i voda kao otapala smatraju se sigurnijim od acetona, metanola i drugih organskih otapala te su sukladno tome pogodniji za primjenu u prehrambenoj industriji (Oktay i sur., 2003).

Vrijeme ekstrakcije potrebno za potpunu ekstrakciju određenog matriksa ovisi o matriksu, vrsti spoja i načinu ekstrakcije (statički ili dinamički) (Alvarez-Rivera i sur., 2020). Povećanje statičkog vremena ekstrakcije općenito povećava prinos ekstrakcije sve dok se ne postigne ravnoteža (Shams i sur., 2015). Ekstrakcija je dovršena za 15-25 min, uz upotrebu svega 15-45 mL otapala (Mottaleb i Sarker, 2012). Sažeto, ASE se koristi kako bi se smanjilo vrijeme ekstrakcije i volumen otapala (Mustafa i Turner, 2011). Važan parametar je i veličina čestica. Općenito, učinkovitost ekstrakcije raste sa smanjenjem veličine čestica (Li i sur., 2006), stoga se čvrsti uzorci obično sjeckaju, melju ili homogeniziraju. Tako dobivena veća kontaktna površina omogućava bolju dostupnost otapala analitu i utječe na prijenos mase.

U skladu s navedenim, za postizanje veće učinkovitosti ASE, a time i višeg prinosa ciljanih spojeva, vrlo je važno optimirati parametre ekstrakcije, gdje je uz odabir otapala bitno definirati parametre poput temperature ekstrakcije, statičkog vremena ekstrakcije i broja ciklusa ekstrakcije (Putnik i sur., 2017).

Rodríguez-Solana i sur. (2014) ekstrahirali su ulje iz osušenih sjemenki komorača primjenom dviju ekstrakcijskih tehnika, ASE i Soxhlet. Tijekom optimiranja Soxhlet ekstrakcije, kao optimalni uvjeti pokazali su se upotreba metanola kao otapala (usporedno s heksanom, dietil eterom, etil acetatom i etanolom) te trajanje od 4 h (usporedno s 8 h), dok su za ASE dobiveni optimalni uvjeti 125 °C/7 min/3 ciklusa također uz primjenu metanola kao otapala. Soxhlet tehnika omogućila je veću učinkovitost ekstrakcije i višu količinu ekstrahiranih spojeva u usporedbi s ASE tehnikom. No, gledano s industrijskog stajališta, ASE je prihvatljivija tehnika jer koristi manju količinu otapala (15 mL) te kraće vrijeme ekstrakcije (30 min) u odnosu na Soxhlet tehniku (150 mL, 8 h).

Prema tome, u proizvodnji ekstrakata sjemenki komorača koji potencijalno mogu imati široku primjenu, upotreba ASE tehnike pri optimalnim uvjetima značila bi znatno smanjenje konačnih troškova, ali i povećanje ekstrakcijskih prinosa.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovog rada proveden je u dva dijela. U prvom dijelu istraživanja provedeno je optimiranje uvjeta ASE za izolaciju fenolnih spojeva i pigmentata iz sjemenki komorača. U drugom dijelu istraživanja, primjenom definiranih uvjeta ASE iz prvog dijela istraživanja izolirani su fenolni spojevi i pigmenti iz sjemenki samoniklog komorača s različitih lokacija na području Istre (Republika Hrvatska) te su spektrofotometrijski određeni njihovi maseni udjeli.

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Sjemenke komorača

Tijekom provođenja prvog dijela eksperimentalnog rada korištene su komercijalno dostupne osušene sjemenke gorkog komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) (Harissa d.o.o., Hrvatska). U drugom dijelu eksperimentalnog rada korištene su osušene sjemenke samoniklog komorača prikupljene tijekom listopada 2019. godine na pet različitih lokacija na području Istre (tablica 3). Neposredno prije izvođenja eksperimentalnog dijela, sjemenke komorača su usitnjene pomoću električnog mlinca, a usitnjeni materijal se koristio za izolaciju bioaktivnih spojeva (fenolni spojevi i biljni pigmenti).

**Tablica 3.** Uzorci sjemenki samoniklog komorača s područja Istre

OZNAKA UZORKA	LOKACIJA
A	Poreč
B	Raša
C	Plomin
D	Vodnjan
E	Valmade

##### 3.1.2. Kemikalije i standardi

1. Dijatomejska zemlja, 6/60 mesh, 26033 (Restek Corporation, Bellefonte, SAD)
2. Etanol (96 %-tni, odzračeni, T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska )
3. Destilirana voda
4. Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
5. Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

Priprema otopine: u 800 mL vruće destilirane vode otopi se 200 g anhidrida natrijeva karbonata, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni u odmjerne tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.

6. Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna
7. Natrij-acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ )
8. Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3.6

Priprema: odvaži se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u nju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

9. FRAP reagens

Priprema: u staklenoj čaši volumena 50 mL pomiješa se 20 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2 mL TPTZ reagensa i 2 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

10. Klorovodična kiselina, 37 %-tna

11. Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: otpipetira se 330  $\mu\text{L}$  37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjerne tikvici od 100 mL.

12. 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

13. TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

Priprema: odvaži se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.

14. 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)

15. Željezo (III)-klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), 20 mM otopina

Priprema: odvaži se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### Aparatura:

1. ASE ekstraktor, ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, SAD)
2. Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
3. Ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex Digitec DT 514, Bandelin electronic GmbH & Co., Berlin, Njemačka)
4. Kupelj rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Flawil, Švicarska)
5. Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, Radnor, SAD)
6. Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
7. Električni mlinac (GT11, Tefal, Rumily, Francuska)

#### Pribor:

1. Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (Thermo Scientific, 34 mL)
2. Celulozni filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
3. Odmjerne tikvice (5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL, 1000 mL)
4. Plastične lađice za vaganje
5. Plastične epruvete (Falcon) (50 mL)
6. Stakleni lijevci
7. Staklene boce za ekstrakciju (Thermo Scientific) (250 mL)
8. Staklene kivete
9. Mikropipete Eppendorf (100 µL, 1000 µL, 5 mL)
10. Staklene epruvete, stalak za epruvete
11. Staklene kivete
12. Stakleni lijevci
13. Staklene čaše (50 mL, 100 mL)
14. Spatula
15. Menzura (50 mL)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. ASE

Primjenom ASE provedena je izolacija bioaktivnih spojeva (fenolni spojevi, biljni pigmenti) iz osušenih sjemenki komorača. ASE ekstrakcija provedena je na uređaju ASE 350™ Thermo Fisher Scientific, SAD (slika 6), uz primjenu etanola kao ekstrakcijskog otapala (96 %-tni, odzračeni).

U svrhu definiranja optimalnih parametara ekstrakcije pri kojima se postižu najviši prinosi fenolnih spojeva i pigmentata, u prvom dijelu istraživanja provedeno je optimiranje uvjeta ASE. U tu svrhu varirani su parametri ekstrakcije: temperatura (80 i 110 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) te broj ciklusa ekstrakcije (1, 2, 3 i 4 ciklusa), čime je dobiveno ukupno 16 ekstrakata (tablica 4).

U drugom dijelu eksperimentalnog rada, provedena je izolacija fenolnih spojeva i pigmentata iz uzoraka sjemenki samoniklog komorača s različitih lokacija na području Istre (tablica 3) prema prethodno definiranim optimalnim uvjetima.



**Slika 6.** Ekstraktor ASE™ 350 (vlastita fotografija)



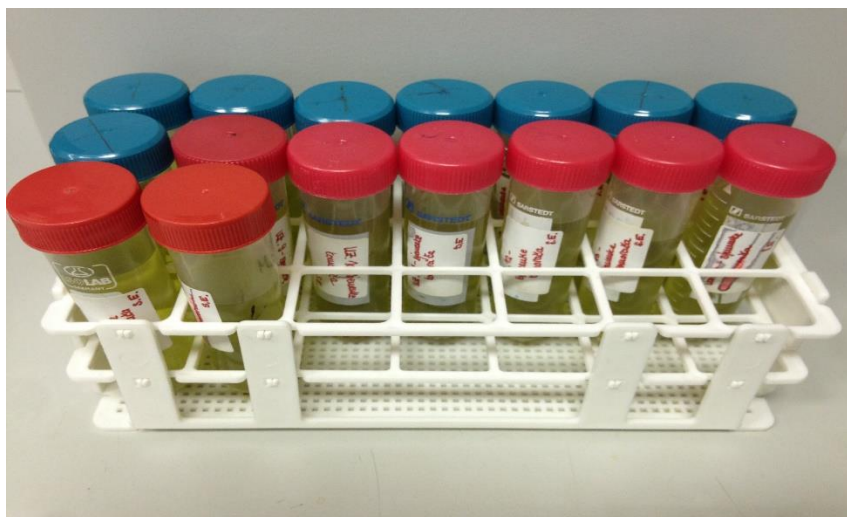
**Tablica 4.** Eksperimentalni dizajn optimiranja uvjeta ASE

<b>BROJ UZORKA</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>STATIČKO VRIJEME (min)</b>	<b>BROJ CIKLUSA</b>
1	80	5	1
2	80	5	2
3	80	5	3
4	80	5	4
5	80	10	1
6	80	10	2
7	80	10	3
8	80	10	4
9	110	5	1
10	110	5	2
11	110	5	3
12	110	5	4
13	110	10	1
14	110	10	2
15	110	10	3
16	110	10	4

*Postupak ekstrakcije:*

U plastičnoj čašici, na analitičkoj vagi, odvaže se približno  $3 \pm 0,0001$  g uzorka osušenih i usitnjenih sjemenki komorača, promiješa s jednom mjericom dijatomejske zemlje (~ 2,0 g) i prebaci u ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika veličine 34 mL na čije su dno prethodno postavljena 2 celulozna filtera. U ćelije se potom dodatno dodaje dijatomejska zemlja do ispunjenja gotovo cijelog volumena ćelije. Zatvorena ćelija postavlja se na predviđeno mjesto u ASE Dionex 350<sup>TM</sup> ekstraktor, nakon čega slijedi postupak ASE ekstrakcije gdje se kao ekstrakcijsko otapalo primjenjuje 96 %-tni etanol. U svrhu optimiranja uvjeta ASE, varirani su temperatura (80 i 110 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) i broj ciklusa ekstrakcije (1, 2, 3 i 4 ciklusa), dok su fiksni uvjeti ekstrakcije bili: tlak 10.34 MPa, volumen ispiranja 50 % i vrijeme propuhivanja dušikom 30 s. Dobiveni ekstrakti sakupljaju se u staklene boce koje se nalaze u donjem dijelu uređaja i kvantitativno prenose u odgovarajuću odmjernu tikvicu (50 mL) koja se nadopuni do oznake ekstrakcijskim otapalom (etanol). Pripremljeni ekstrakti prebace se u plastične epruvete

(Falcon, 50 mL) (slika 7) i skladište pri temperaturi +4 °C do provođenja spektrofotometrijskih analiza.



**Slika 7.** Ekstrakti sjemenki komorača (vlastita fotografija)

### 3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

#### *Princip određivanja:*

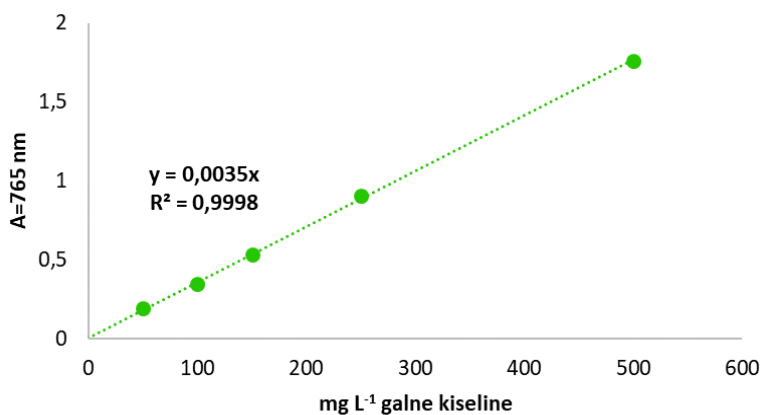
Određivanje ukupne koncentracije fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode. Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji između Folin-Ciocalteu reagensa i reducirajućeg reagensa, polifenola. Nastali plavo obojeni kompleks intenzivniji je što je veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

#### *Postupak određivanja:*

U staklenu epruvetu redom se otpipetira 100  $\mu$ L ekstrakta, 200  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Zasićena otopina natrijeva karbonata (1 mL) dodaje se nakon 3 minute. Nakon toga slijedi miješanje (pomoću Vortexa) i termostatiranje pripremljenih uzoraka 25 minuta pri T=50 °C. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima ekstrakcijsko otapalo (96 %-tni etanol).

### Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvažuje se 0,5 g galne kiseline, otopi u 10 mL 96 %- tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom nadopuni do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L<sup>-1</sup>. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute dodaje se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a uzorci se potom termostatiraju 25 minuta pri T=50 °C. Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije galne kiseline (mg L<sup>-1</sup>), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm (slika 8). Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



**Slika 8.** Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035 \times X \quad (R^2=0,9998) \quad [1]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$R^2$  – koeficijent determinacije

Koncentracije ukupnih fenola izražene su u  $\text{mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  osušenih sjemenki kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje biljnih pigmenata

#### *Princip određivanja:*

Određivanje biljnih pigmenata (klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida) bazira se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama. Spektrofotometrijsko mjerenje provodi se u etanolnom ekstraktu pri valnim duljinama 470, 649 i 664 nm (u skladu s korištenim ekstrakcijskim otapalom) (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

#### *Postupak određivanja:*

Kvantitativno određivanje biljnih pigmenata provodi se spektrofotometrijski pri sljedećim valnim duljinama: 649 i 664 za klorofil *a* i *b* (u skladu s korištenim ekstrakcijskim otapalom, etanolom) i 470 nm za karotenoide. Svako mjerenje provodi se najmanje u paraleli. Kao slijepa proba koristi se otapalo koje je korišteno za ekstrakciju (96 %-tni etanol). Apsorbanciju slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka, a tako dobivena vrijednost koristi se za izračunavanje konačnog rezultata.

Udjeli klorofila *a* i *b* te karotenoida računaju se prema sljedećim jednadžbama (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

#### *Etanol:*

$$c_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13,36 A_{664} - 5,19 A_{649} \quad [2]$$

$$c_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27,43 A_{649} - 8,12 A_{664} \quad [3]$$

$$c_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 2,13c_a - 97,64 c_b)/209 \quad [4]$$

gdje je:

$A$  = apsorbancija

$c_a$  = klorofil *a*

$c_b$  = klorofil *b*

$c_{(x+c)}$  = karotenoidi (ksantofili + karoteni)

Koncentracije klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih klorofila te ukupnih karotenoida izražene su u mg 100 g<sup>-1</sup> osušenih sjemenki kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

*Princip određivanja:*

FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda temelji se reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u kiselom mediju pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996). FRAP vrijednosti najčešće se izražavaju preko FeSO<sub>4</sub>, askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996).

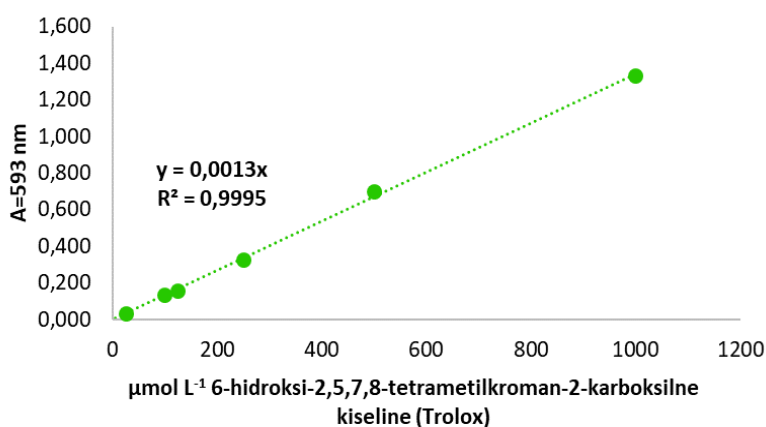
*Postupak određivanja:*

U staklene epruvete redom se otpipetira 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa (pomoću Vortexa) te 5 minuta termostatira pri T=37 °C. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, gdje se umjesto uzorka dodaje ekstrakcijsko otapalo (96 %-tni etanol).

*Izrada baždarnog pravca:*

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) tako da se odvaži 0,0501 g Troloxa. Odvaga se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom. Od pripremljene otopine Troloxa rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom: 0,125, 0,5, 0,625, 1,25, 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa u svaku tikvicu. Odmjerne tikvice potom se nadopunjavaju do oznake 96 %-tnim etanolom.

Koncentracije Troloxa u tim tikvicama iznose: 25, 100, 125, 250, 500 i 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Nakon toga, u staklene epruvete redom se otpipetira 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  otopine standarda iz prethodno pripremljenih odmjernih tikvica i 2080  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa. Potom slijedi miješanje (pomoću Vortexa) i termostatiranje pri  $T=37\text{ }^\circ\text{C}$ . Apsorbancija se mjeri pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, gdje se umjesto uzorka dodaje 96 %-tni etanol. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije troloxa ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 593 nm (slika 9). Antioksidacijski kapacitet uzorka određen FRAP metodom izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



**Slika 9.** Prikaz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox)

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0013 \times X \quad (R^2=0,9995) \quad [5]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

X – ekvivalent Troloxa (TE) ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )

$R^2$  – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražen je u  $\text{mmol TE } 100\text{ g}^{-1}$  osušenih sjemenki kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.2.5. Statistička analiza

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Eksperimenti su dizajnirani kao puni faktorijalni dizajn.

U dijelu istraživanja u kojem se provelo optimiranje parametara ekstrakcije za izolaciju bioaktivnih spojeva iz sjemenki gorkog komorača nezavisne varijable bile su: temperatura ekstrakcije (80 i 110 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) i broj ciklusa ekstrakcije (1, 2, 3 i 4 ciklusa), a kao zavisne varijable promatrane su: udio ukupnih fenola ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), ukupnih klorofila ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) i ukupnih karotenoida ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ). Za usporedbu uzoraka korištena je multifaktorska analiza varijance (MANOVA).

U dijelu istraživanja u kojem se ispitaio utjecaj različitih lokacija uzgoja na udio bioaktivnih spojeva u sjemenkama samoniklog komorača nezavisna varijabla bila je lokalitet staništa (Poreč, Raša, Plomin, Vodnjan i Valmade), a zavisne varijable bile su: udio ukupnih fenola ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), klorofila *a* ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), klorofila *b* ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), ukupnih klorofila ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ), ukupnih karotenoida ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) i antioksidacijski kapacitet ( $\text{mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ ). Uzorci su uspoređeni jednosmjernom analizom varijance (one-way ANOVA).

U oba dijela istraživanja statistički značajna razlika razmatrana je na razini  $p \leq 0,05$  (95 %-tni interval pouzdanosti), a svi marginalni prosjeci uspoređeni su s Tukey HSD testom.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U prvom dijelu ovog istraživanju provedeno je optimiranje uvjeta ASE za izolaciju bioaktivnih spojeva (fenolni spojevi i biljni pigmenti) iz sjemenki komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.).

Kao ekstrakcijsko otapalo korišten je 96 %-tni odzračeni etanol koji se odlikuje GRAS statusom, niskom cijenom i niskom toksičnošću. Sukladno navedenom, dopuštena je njegova primjena u prehrambenoj industriji te se sve češće koristi kao najprikladnija zamjena za konvencionalna ekstrakcijska otapala (Barba i sur., 2016).

Tijekom optimiranja uvjeta ASE, varirani su parametri ekstrakcije: temperatura (80 i 110 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5 i 10 min) te broj ciklusa (1, 2, 3 i 4 ciklusa). U dobivenim ekstraktima provedena je spektrofotometrijska analiza te su određene koncentracije ukupnih fenola, klorofila *a* i *b*, ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida. Dobiveni rezultati obrađeni su primjenom MS Excel programa te grafički prikazani (slika 10, slika 11, slika 12, slika 13, slika 14) kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja±standardna devijacija. Također, dobiveni rezultati statistički su obrađeni, a rezultati statističke analize prikazani su kao srednja vrijednost±standardna pogreška (tablica 5).



#### 4.1. OPTIMIRANJE ASE UVJETA

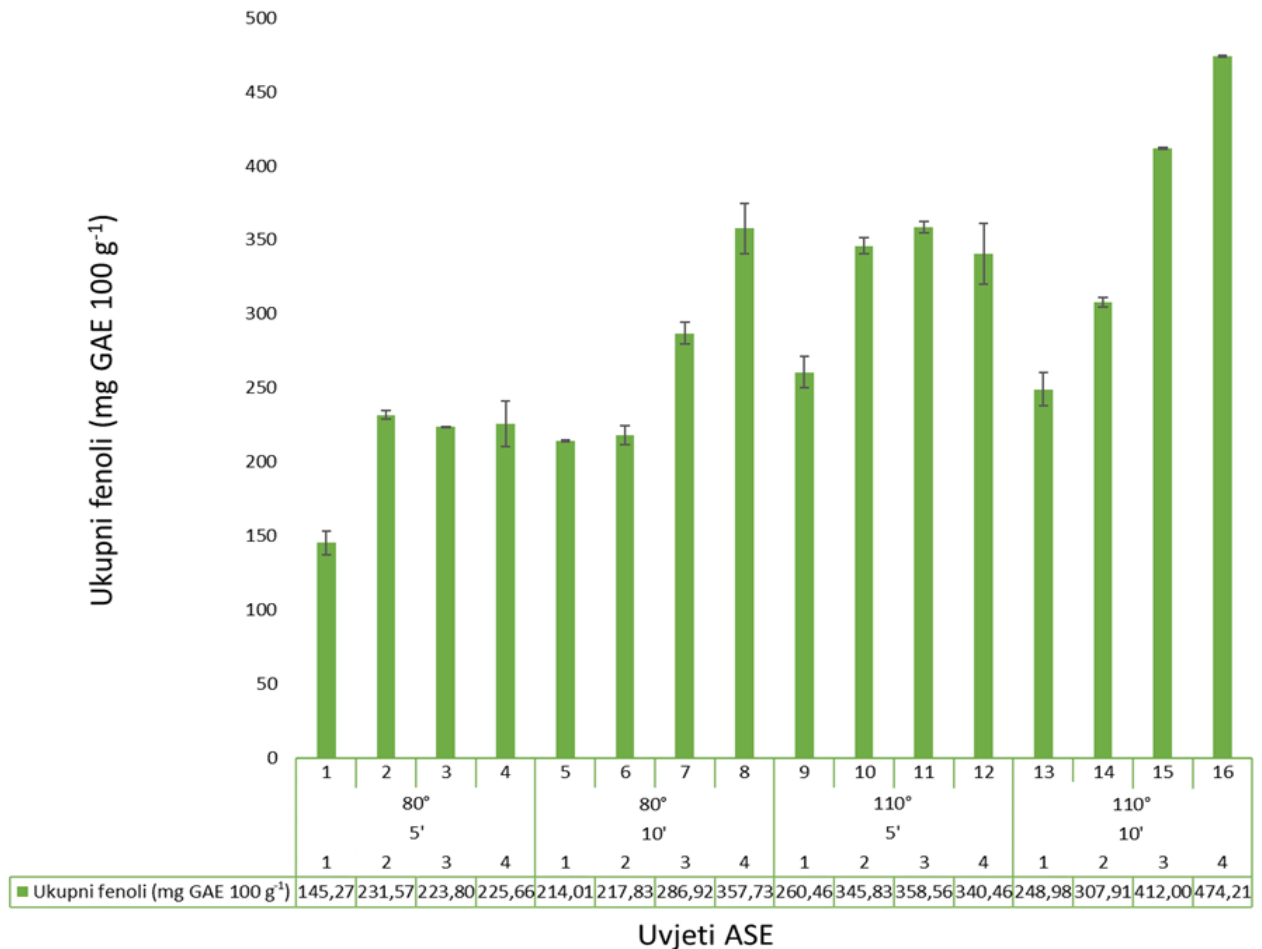
**Tablica 5.** Utjecaj parametara ASE na udio ukupnih fenola, ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida izoliranih iz sjemenki komorača

<b>Parametri ekstrakcije</b>	<b>Ukupni fenoli (mg GAE 100 g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ukupni klorofili (mg 100 g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ukupni karotenoidi (mg 100 g<sup>-1</sup>)</b>
<b>Temperatura (°C)</b>	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*
80	237,85±2,35 <sup>a</sup>	9,14±0,02 <sup>a</sup>	2,52±0,10 <sup>a</sup>
110	343,55±2,35 <sup>b</sup>	11,27±0,02 <sup>b</sup>	3,43±0,10 <sup>b</sup>
<b>Statičko vrijeme (min)</b>	p<0,01*	p<0,01*	p=0,11
5	266,45±2,35 <sup>a</sup>	9,28±0,02 <sup>a</sup>	2,86±0,10 <sup>a</sup>
10	314,95±2,35 <sup>b</sup>	11,13±0,02 <sup>b</sup>	3,10±0,10 <sup>a</sup>
<b>Broj ciklusa</b>	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*
1 ciklus	217,18±3,33 <sup>a</sup>	7,79±0,03 <sup>a</sup>	2,11±0,14 <sup>a</sup>
2 ciklusa	275,78±3,33 <sup>b</sup>	9,92±0,03 <sup>b</sup>	3,01±0,14 <sup>b</sup>
3 ciklusa	320,32±3,33 <sup>c</sup>	11,29±0,03 <sup>c</sup>	3,90±0,14 <sup>c</sup>
4 ciklusa	349,51±3,33 <sup>d</sup>	11,82±0,03 <sup>d</sup>	2,88±0,14 <sup>b</sup>
<b>Prosječna vrijednost</b>	<b>290,70</b>	<b>10,20</b>	<b>2,98</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna pogreška.

\*Statistički značajna varijacija kod  $p \leq 0,05$ . Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.1. Utjecaj ASE na udio ukupnih fenola u sjemenkama komorača



**Slika 10.** Maseni udio ukupnih fenola izoliranih iz sjemenki komorača primjenom ASE

Maseni udio ukupnih fenola u sjemenkama komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) nakon provedene ASE određen je u rasponu vrijednosti od  $145,27 \pm 8,07$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  do  $474,21 \pm 0,81$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  (slika 10) s prosječnom vrijednošću  $290,70$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  (tablica 5).

Roby i sur. (2012) proveli su maceraciju sjemenki komorača pri sobnoj temperaturi tijekom 72 h te utvrdili kako je maseni udio fenolnih spojeva u etanolnom ekstraktu sjemenki komorača  $3,0 \pm 2,6$  mg GAE  $\text{g}^{-1}$  suhog ekstrakta što je gotovo jednako vrijednostima dobivenim u ovom istraživanju.

Najniži maseni udio ukupnih fenola u sjemenkama komorača određen je u uzorku 1 ( $145,27 \pm 8,07$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$ ) dobivenom pri temperaturi  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , statičkom vremenu 5 min uz 1 ciklus

ekstrakcije, dok je najviši maseni udio ukupnih fenola određen u uzorku 16 ( $474,21 \pm 0,81$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$ ) koji je dobiven pri temperaturi  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ , statičkom vremenu 10 min uz 4 ciklusa ekstrakcije.

Budući da se topljivost bilo kojeg analita u otapalu povećava s porastom temperature otapala te se promatrani analiti kreću puno brže od graničnog sloja do blizu površine matriksa iz kojeg su ekstrahirani u skupno otapalo (Mottaleb i Sarker, 2012) očekivano je kako će se maseni udio ukupnih fenola povećavati s porastom temperature.

U uzorcima 1-8 primijenjena je temperatura ekstrakcije  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  te je prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih fenola iznosila  $237,85 \pm 2,35$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$ , dok je u uzorcima 9-16 uz primijenjenu temperaturu ekstrakcije od  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih fenola bila  $343,55 \pm 2,35$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  (tablica 5), što je za gotovo 45 % više u odnosu na nižu temperaturu ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ). U prilog navedenom, idu i rezultati statističke analize (tablica 5) koji prikazuje da temperatura kao parametar ekstrakcije ima statistički značajan ( $p < 0,01$ ) utjecaj na maseni udio ukupnih fenola u sjemenkama komorača.

Značajan utjecaj ( $p \leq 0,05$ ) temperature na udio ukupnih fenola u 30 %-tnom acetonskom ekstraktu odmašćenih sjemenki gorkog komorača dokazala je Peričić (2019). Ekstrakti ekstrahirani 30 %-tnom vodenom otopinom acetona pri  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  sadržavali su više udjele ukupnih fenola nego oni dobiveni ekstrakcijom pri temperaturi od  $75 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Iz rezultata dobivenih u ovom istraživanju, vidljivo je kako se maseni udjeli ukupnih fenola statistički značajno razlikuju ( $p < 0,01$ ) i ovisno o primijenjenom statičkom vremenu ekstrakcije (5 ili 10 min) (tablica 5). Sukladno navedenom, ono mora biti pažljivo optimirano, minimalno, ali dovoljno za adekvatni prijenos mase (Alvarez-Rivera i sur., 2020). Povećanjem statičkog vremena ekstrakcije pri povišenoj temperaturi pospješuje se i difuzija analita zadržanih unutar pora ili drugih struktura matrice uzorka u otapalo za ekstrakciju (Mottaleb i Sarker, 2012.).

U uzorcima 1-4 ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) te 9-12 ( $110 \text{ }^\circ\text{C}$ ) primijenjeno je statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 5 min, gdje je prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih fenola bila  $266,45 \pm 2,35$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$ , dok je u uzorcima 5-8 ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) te 13-16 ( $110 \text{ }^\circ\text{C}$ ) primijenjeno statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 10 min s prosječnom vrijednošću masenog udjela ukupnih fenola od  $314,95 \pm 2,35$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$ , što je za 18 % više u odnosu na kraće statičko vrijeme (5 min). Razlika u masenom udjelu ukupnih fenola, vidljiva je i kod uzoraka koji su ekstrahirani pri istoj temperaturi, ali

različitim statičkom vremenu. Slijedom toga, prosječni maseni udio ukupnih fenola za uzorke 1-4 (80 °C, 5 min) iznosi  $206,57 \pm 41,00$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$ , a za uzorke 5-8 (80 °C, 10 min)  $269,12 \pm 67,91$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$  što je za 30 % više u odnosu na kraće statičko vrijeme (5 min) pri istoj temperaturi (80 °C). Isto tako, prosječni maseni udio ukupnih fenola za uzorke 9-12 (100 °C, 5 min) iznosi  $326,33 \pm 44,56$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$ , dok je za uzorke 13-16 (100 °C, 10 min)  $360,77 \pm 101,30$  mg GAE  $100 \text{ g}^{-1}$ , odnosno 10 % više pri dužem statičkom vremenu (10 min).

Do potpune ekstrakcije bioaktivnih spojeva potencijalno dolazi uslijed upotrebe više ciklusa (Mustafa i Turner, 2011). U prilog navedenom ide i činjenica da je najviši maseni udio ukupnih fenola u ovom istraživanju zabilježen upravo pri najvećem broju ciklusa (4 ciklusa) (slika 10, tablica 5) što se može dodatno objasniti i na način da je održavanje povoljne ekstrakcijske ravnoteže bilo potpomognuto uvođenjem svježeg otapala što je svrha statičkog ciklusa (Mottaleb i Sarker, 2012). Statističkom analizom (tablica 5) dokazano je kako broj ciklusa također statistički značajno ( $p < 0,01$ ) utječe na maseni udio ukupnih fenola. Promatrajući uzorke 13 i 16, vidljivo je kako su ekstrahirani pri istoj temperaturi (110 °C) i statičkom vremenu (10 min), no pri različitom broju ciklusa (1 ciklus vs. 4 ciklusa). Temeljem dobivenih masenih udjela ukupnih fenola u navedenim uzorcima vidljivo je povećanje za gotovo 91 %.

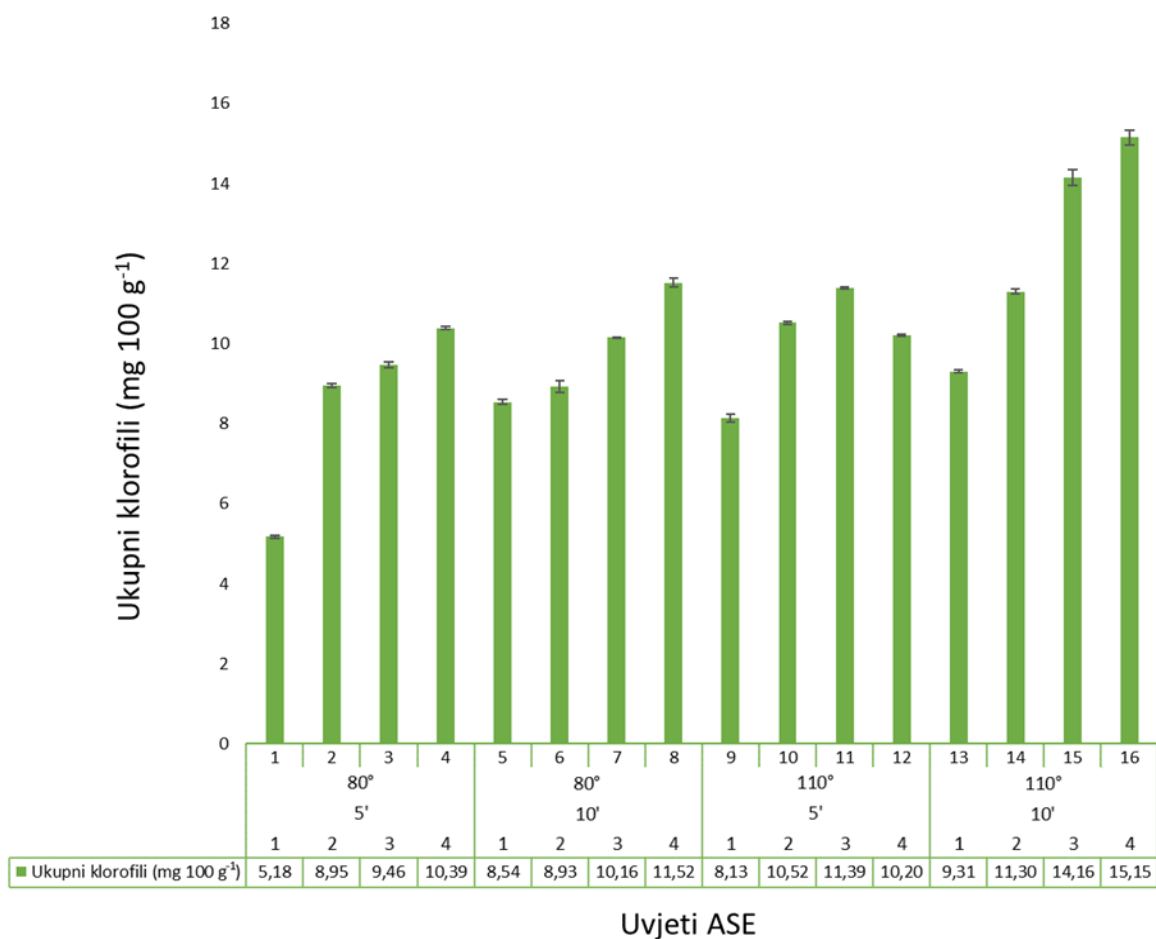
Peričić (2019) je dokazala kako su ekstrakti odmašćenih sjemenki komorača dobiveni ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona u tri ciklusa (pri 75 i 100 °C) sadržavali više udjele ukupnih fenola nego oni dobiveni u jednom ili dva ciklusa. Statistički značajan utjecaj gotovo svih ispitivanih parametara, temperature (75 i 100 °C), statičkog vremena (5 i 10 min) i broja ciklusa (1, 2 i 3) na ukupni udio fenola u sjemenkama komorača tijekom sukcesivne ASE, dokazali su Repajić i sur. (2020). Iznimka je uočena tek kod utjecaja temperature na udio ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima. No, to je razumljivo jer je metanolna frakcija bila posljednja u nizu iscrpljivanja (nakon ekstrakcije *n*-heksanom i 30 %-tnom vodenom otopinom acetona). Najviši prinosi u acetonskim ekstraktima dobiveni su pri 100 °C/10 min/3 ciklusa, dok su uvjeti 100 °C/5 min/1 ciklus rezultirali najvišim vrijednostima ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima. Acetonski ekstrakti pokazali su više udjele ukupnih fenola ( $416,18 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) usporedno s metanolnim ekstraktima ( $80,25 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ). Da broj ciklusa (1, 2 i 3) i temperatura (75 i 100 °C) značajno ( $p \leq 0,05$ ) utječu na udio ukupnih fenola ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) u sjemenkama komorača potvrđeno je istraživanjem Tonković (2019). Udio ukupnih fenola, ekstrahiran 30 %-tnom vodenom

otopinom acetona, povećavao se s porastom temperature i broja ciklusa. Sukladno navedenom, kao optimalni uvjeti, pokazali su se 100 °C i 3 ciklusa. Kod ekstrakata ekstrahiranih 30 %-tnom vodenom otopinom metanola, udio ukupnih fenola povećavao se s porastom temperature, a smanjivao s povećanjem broja ciklusa te su se posljedično u tom slučaju kao optimalni uvjeti pokazali 100 °C i 1 ciklus. U istraživanju Tonković (2019), kao i u istraživanju Repajić i sur. (2020), acetonski ekstrakti pokazali su više prosječne udjele ukupnih fenola (368,87 mg 100 g<sup>-1</sup>) usporedno s metanolnim ekstraktima (93,90 mg 100 g<sup>-1</sup>). Prosječni udio ukupnih fenola dobiven u ovom istraživanju (290,70 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>) niži je u odnosu na udio ukupnih fenola u acetonskim ekstraktima (416,18 mg 100 g<sup>-1</sup>; 368,87 mg 100 g<sup>-1</sup>), a viši od udjela ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima (80,25 mg 100 g<sup>-1</sup>; 93,90 mg 100 g<sup>-1</sup>) u istraživanjima Repajić i sur. (2020) te Tonković (2019). Valja uzeti u obzir kako je u istraživanjima Repajić i sur. (2020) te Tonković (2019) provedeno odmašćivanje sjemenki komorača *n*-heksanom kao i uzastopna ekstrakcija polarnim otapalima, vodenom otopinom acetona (30 %, *v/v*), a zatim vodenom otopinom metanola (30 %, *v/v*) što u ovom istraživanju nije bio slučaj. Isto tako, varijacije u udjelu ukupnih fenola moguće su zbog različitog geografskog porijekla sjemenki.

Roby i sur. (2012) proučavali su udio fenolnih spojeva u sjemenkama komorača u ovisnosti o primijenjenom otapalu. Osim u ranije spomenutom etanolnom ekstraktu (3,0±2,6 mg GAE g<sup>-1</sup> suhog ekstrakta), izrazili su udjele ukupnih fenolnih spojeva u metanolnom (3,4±1,7 mg GAE g<sup>-1</sup> suhog ekstrakta), dietil eternom (2,8±1,7 mg GAE g<sup>-1</sup> suhog ekstrakta) te heksanskom (2,6±1,0 mg GAE g<sup>-1</sup> suhog ekstrakta) ekstraktu. Najviši udio ukupnih fenola ekstrahiran je primjenom metanola, potom etanola i dietil etera, a najniži primjenom *n*-heksana. Dobivene razlike u udjelu ukupnih fenola pokazuju kako su više polarna otapala učinkovitija u ekstrahiranju fenolnih spojeva iz sjemenki komorača nego manje polarna otapala. Tako je primjerice u istraživanju Nagy i sur. (2014) korištena ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (ultrazvučna kupelj) uz 80 %-tnu vodenu otopinu metanola tijekom 20 min za izolaciju fenolnih spojeva iz sjemenki komorača. Dobiveni udio fenolnih spojeva (1017,29 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> suhe mase) i više je no dvostruko viši od najvišeg udjela ukupnih fenola (474,21±0,81 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>) dobivenih u uzorku 16 u ovom istraživanju. Shodno navedenom, jasno je kako na maseni udio ukupnih fenola utječe primjena različitih ekstrakcijskih otapala.

Zaključno, temeljem dobivenih rezultata i provedene statističke analize vidljivo je kako se porastom temperature, dužim statičkim vremenom i većim brojem ekstrakcijskih ciklusa značajno povećava maseni udio ukupnih fenola.

#### 4.1.2. Utjecaj ASE na udio klorofila u sjemenkama komorača



**Slika 11.** Maseni udio ukupnih klorofila izoliranih iz sjemenki komorača primjenom ASE

Maseni udio ukupnih klorofila (klorofil *a* + klorofil *b*) u sjemenkama komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) nakon provedene ASE određen je u rasponu vrijednosti od  $5,18 \pm 0,04$  mg 100 g<sup>-1</sup> do  $15,15 \pm 0,18$  mg 100 g<sup>-1</sup> (slika 11) s prosječnom vrijednošću  $10,20$  mg 100 g<sup>-1</sup> (tablica 5).

Najniži maseni udio ukupnih klorofila u sjemenkama komorača određen je u uzorku 1 ( $5,18 \pm 0,04$  mg 100 g<sup>-1</sup>) pri temperaturi 80 °C, statičkom vremenu 5 min uz 1 ciklus ekstrakcije, dok je najviši

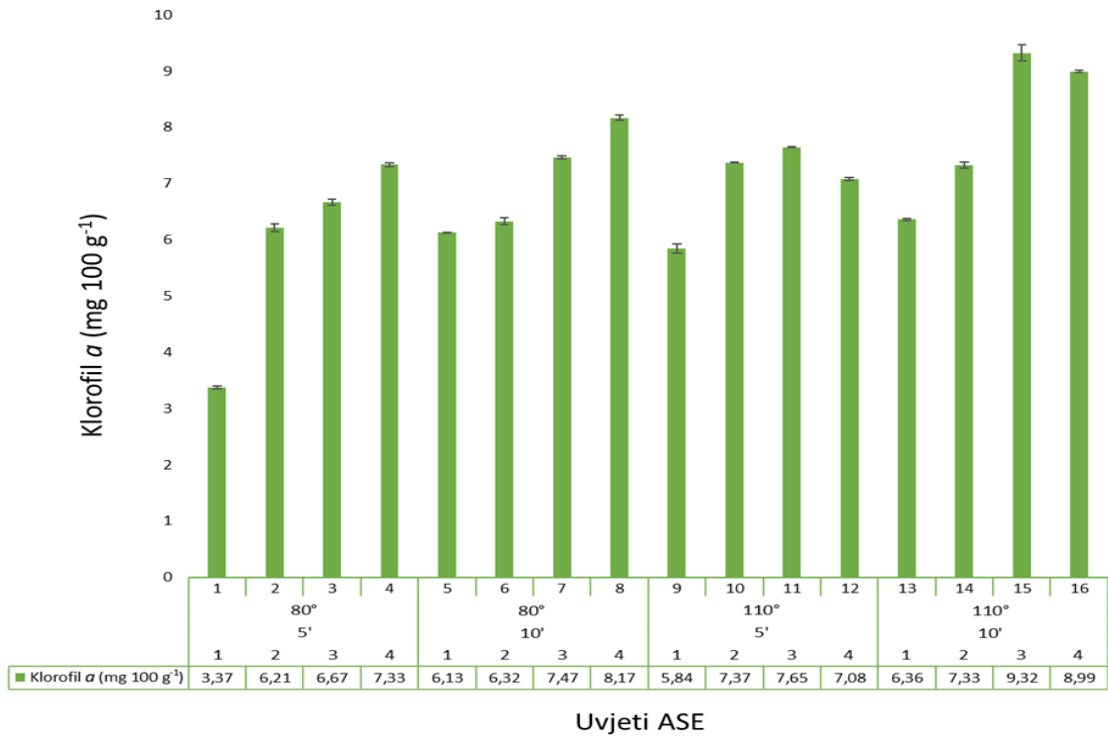
maseni udio ukupnih klorofila određen u uzorku 16 ( $15,15 \pm 0,18$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ) pri temperaturi  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ , statičkom vremenu 10 min uz 4 ciklusa ekstrakcije.

U uzorcima 1-8, u kojima je primijenjena temperatura ekstrakcije  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih klorofila iznosila je  $9,14 \pm 0,02$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ , dok je u uzorcima 9-16 uz primijenjenu temperaturu ekstrakcije od  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih klorofila bila  $11,27 \pm 0,02$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  (tablica 5), što je otprilike za 23 % više u odnosu na nižu temperaturu ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ). U prilog navedenom, rezultati statističke analize (tablica 5) su pokazali da temperatura kao parametar ekstrakcije ima statistički značajan ( $p < 0,01$ ) utjecaj na maseni udio ukupnih klorofila (mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ) u sjemenkama komorača.

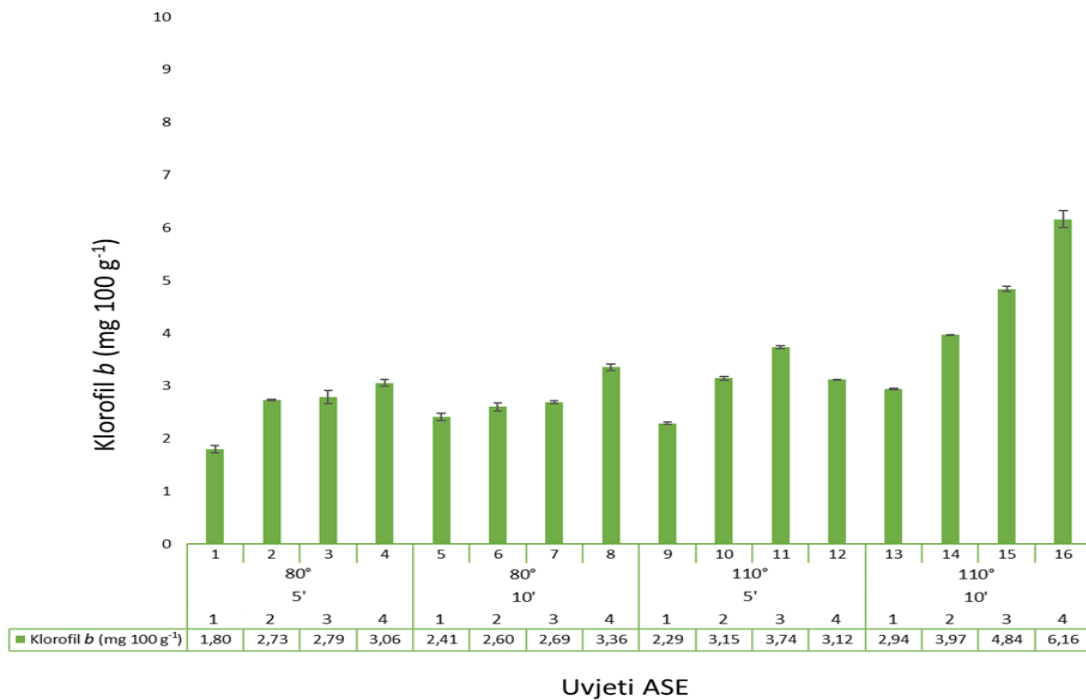
Iz rezultata dobivenih u ovom istraživanju, vidljivo je kako se maseni udjeli ukupnih klorofila statistički značajno razlikuju ( $p < 0,01$ ) ovisno i o primijenjenom statičkom vremenu ekstrakcije (5 ili 10 min) (tablica 5). U uzorcima 1-4 ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) te 9-12 ( $110 \text{ }^\circ\text{C}$ ) primijenjeno je statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 5 min s prosječnom vrijednošću  $9,28 \pm 0,02$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ , dok je u uzorcima 5-8 ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) te 13-16 ( $110 \text{ }^\circ\text{C}$ ) primijenjeno statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 10 min, gdje je prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih klorofila iznosila  $11,13 \pm 0,02$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  što je za 20 % viši prinos u odnosu na kraće statičko vrijeme (5 min).

Statističkom analizom pokazalo se kako broj ciklusa također statistički značajno ( $p < 0,01$ ) utječe na maseni udio ukupnih klorofila (tablica 5). Promatrajući uzorke 13 i 16, vidljivo je kako su ekstrahirani pri istoj temperaturi ( $110 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i statičkom vremenu (10 min), no pri različitom broju ciklusa (1 ciklus vs. 4 ciklusa). Temeljem dobivenih masenih udjela ukupnih klorofila u navedenim uzorcima ( $9,31$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ;  $15,15$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ), vidljivo je povišenje prinosa za gotovo 63 %, dok je naprimjer u uzorku 4 ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min, 4 ciklusa) dobiveni udio ukupnih klorofila viši za čak 100 % u odnosu na onaj dobiven u uzorku 1 ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min, 1 ciklus).

Trend povišenja udjela ukupnih klorofila u ovisnosti o temperaturi, statičkom vremenu i broju ciklusa ekstrakcije vidljiv je u svim uzorcima, osim u uzorku 12. Uočeno smanjenje potencijalno se može objasniti degradacijom ukupnih klorofila pri većem broju ciklusa ekstrakcije. No, takva promjena nije uočena u ostalim setovima uzoraka (1-4, 5-8, 13-16).



**Slika 12.** Maseni udio klorofila *a* izoliranog iz sjemenki komorača primjenom ASE



**Slika 13.** Maseni udio klorofila *b* izoliranog iz sjemenki komorača primjenom ASE



Iz grafičkog prikaza (slika 12 i slika 13) vidljivo je kako sjemenke komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) korištene u ovom istraživanju sadrže značajno viši maseni udio klorofila *a* (prosječna vrijednost  $6,98 \pm 1,38$  mg  $100$  g<sup>-1</sup>) u odnosu na maseni udio klorofila *b* (prosječna vrijednost  $3,23 \pm 1,06$  mg  $100$  g<sup>-1</sup>). Omjer klorofila *a* i *b* u uzorcima iznosi 2:1 što je djelomično u skladu s očekivanim jer se klorofil *a* i *b* identificirani u višim biljkama odnose u prosječnom omjeru 3:1 (Gaur i sur., 2006).

Maseni udio klorofila *a* u sjemenkama komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) određen je u rasponu vrijednosti od  $3,37 \pm 0,03$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> do  $9,32 \pm 0,15$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> (slika 12), dok se maseni udio klorofila *b* kretao od  $1,80 \pm 0,07$  do  $6,16 \pm 0,16$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> (slika 13). Najniži maseni udio klorofila *a* ( $3,37 \pm 0,03$  mg  $100$  g<sup>-1</sup>) i *b* ( $1,80 \pm 0,07$  mg  $100$  g<sup>-1</sup>) određen je u uzorku 1 pri temperaturi  $80$  °C, statičkom vremenu 5 min uz 1 ciklus ekstrakcije. Najviši maseni udio klorofila *a* ( $9,32 \pm 0,15$  mg  $100$  g<sup>-1</sup>) određen je u uzorku 15 pri temperaturi  $110$  °C, statičkom vremenu 10 min uz 3 ciklusa ekstrakcije, a klorofila *b* ( $6,16 \pm 0,16$  mg  $100$  g<sup>-1</sup>) u uzorku 16 pri temperaturi  $110$  °C, statičkom vremenu 10 min uz 4 ciklusa ekstrakcije.

Na temelju prosječnih vrijednosti može se zaključiti kako se maseni udio klorofila *a* povećava s porastom temperature ( $80$  °C  $6,46$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> vs.  $100$  °C  $7,49$  mg  $100$  g<sup>-1</sup>), statičkog vremena (5 min  $6,44$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> vs. 10 min  $7,51$  mg  $100$  g<sup>-1</sup>) i broja ciklusa ekstrakcije (1 ciklus  $5,43$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> vs. 4 ciklusa  $7,89$  mg  $100$  g<sup>-1</sup>). Promatrajući numeričke vrijednosti, kod uzoraka 12 i 16 došlo je do smanjenja udjela klorofila *a*, što se može objasniti mogućom degradacijom klorofila *a* uslijed invazivnih uvjeta.

Kao i kod klorofila *a* i kod klorofila *b* je moguće uočiti trend povećanja prosječnog masenog udjela u ovisnosti o temperaturi ( $80$  °C  $2,68$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> vs.  $100$  °C  $3,78$  mg  $100$  g<sup>-1</sup>), statičkom vremenu (5 min  $2,84$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> vs. 10 min  $3,62$  mg  $100$  g<sup>-1</sup>) i broju ciklusa ekstrakcije (1 ciklus  $2,36$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> vs. 4 ciklusa  $3,92$  mg  $100$  g<sup>-1</sup>). Izuzetak je uzorak 12, kod kojeg je uočen nešto niži maseni udio klorofila *b* u odnosu na uzorak 11 s kraćim brojem ciklusa.

Sukladno svemu navedenom, može se zaključiti kako je učinak ispitivanih parametara ASE na maseni udio klorofila *a* i *b* u sjemenkama gorkog komorača jednak trendu masenih udjela ukupnih fenola, odnosno da se maseni udio klorofila *a* i *b* u sjemenkama gorkog komorača povećava s porastom temperature, dužim statičkim vremenom te većim brojem ekstrakcijskih ciklusa.

Pregledom dostupne znanstvene literature, pronađeno je samo nekoliko radova koji su istraživali udio klorofila u komoraču (list), dok je dostupna literatura za pigmente sjemenki komorača rijetka. Također, prema dostupnoj znanstvenoj literaturi ne postoje podaci o primjeni ASE za ekstrakciju pigmenata iz sjemenki komorača, pa samim time, nije bilo moguće usporediti dobivene rezultate s literaturnim podacima.

Za ekstrakciju pigmenata iz lišća komorača, Parmoon i sur. (2018) koristili su svježe lišće komorača homogenizirano s 80 %-tnom vodenom otopinom acetona. Izraženi su udjeli za klorofil *a* ( $1,70 \pm 0,32$  mg g<sup>-1</sup> svježe mase), klorofil *b* ( $0,53 \pm 0,19$  mg g<sup>-1</sup> svježe mase), ukupne klorofile ( $2,23 \pm 0,48$  mg g<sup>-1</sup> svježe mase) i karotenoide ( $0,55 \pm 0,08$  mg g<sup>-1</sup> svježe mase). Budući da su kloroplasti lišća glavni organi u kojima se odvija fotosinteza (Bonan, 2015) jasno je kako su izraženi udjeli za lišće komorača, u istraživanju Parmoon i sur. (2018), viši nego oni dobiveni u ovom istraživanju za sjemenke komorača. U principu, fotosinteza se i u lišću i u sjemenkama provodi na isti način, ali je glavna svrha drugačija. Naime, fotosinteza u lišću podrazumijeva provođenje atmosfere fiksacije CO<sub>2</sub>, dok ona u sjemenci podrazumijeva stvaranje energije proizvodnjom NADPH i ATP tj. pretvorbom saharoze u acetyl CoA i masne kiseline, opskrbljujući biljku na taj način hranjivim tvarima (Borisjuk i sur., 2005; Smolikova i Medvedev, 2016). Osim primjene različitih materijala (lišće komorača vs. sjemenke komorača), jedan od razloga može biti u primjeni različitih otapala (80 %-tna vodena otopina acetona vs. 96 %-tna vodena otopina etanola). Majdoub i sur. (2017) također su koristili 80 %-tnu vodenu otopinu acetona za ekstrakciju pigmenata pri sobnoj temperaturi iz nadzemnih dijelova i korijena dvaju kultivara slatkog komorača te dobili sljedeće masene udjele (mg g<sup>-1</sup> svježe mase): 0,98±0,01; 1,12±0,05 (klorofil *a*), 0,68±0,01; 0,84±0,08 (klorofil *b*), 1,67±0,02; 1,97±0,03 (ukupni klorofili) 0,48±0,01; 0,49±0,06 (ukupni karotenoidi). Rezultati dobiveni u tom istraživanju, teško su usporedivi s onima dobivenim u ovom istraživanju jer Majdoub i sur. (2017) precizno ne navode iz kojih se nadzemnih dijelova komorača vršila ekstrakcija pigmenata.

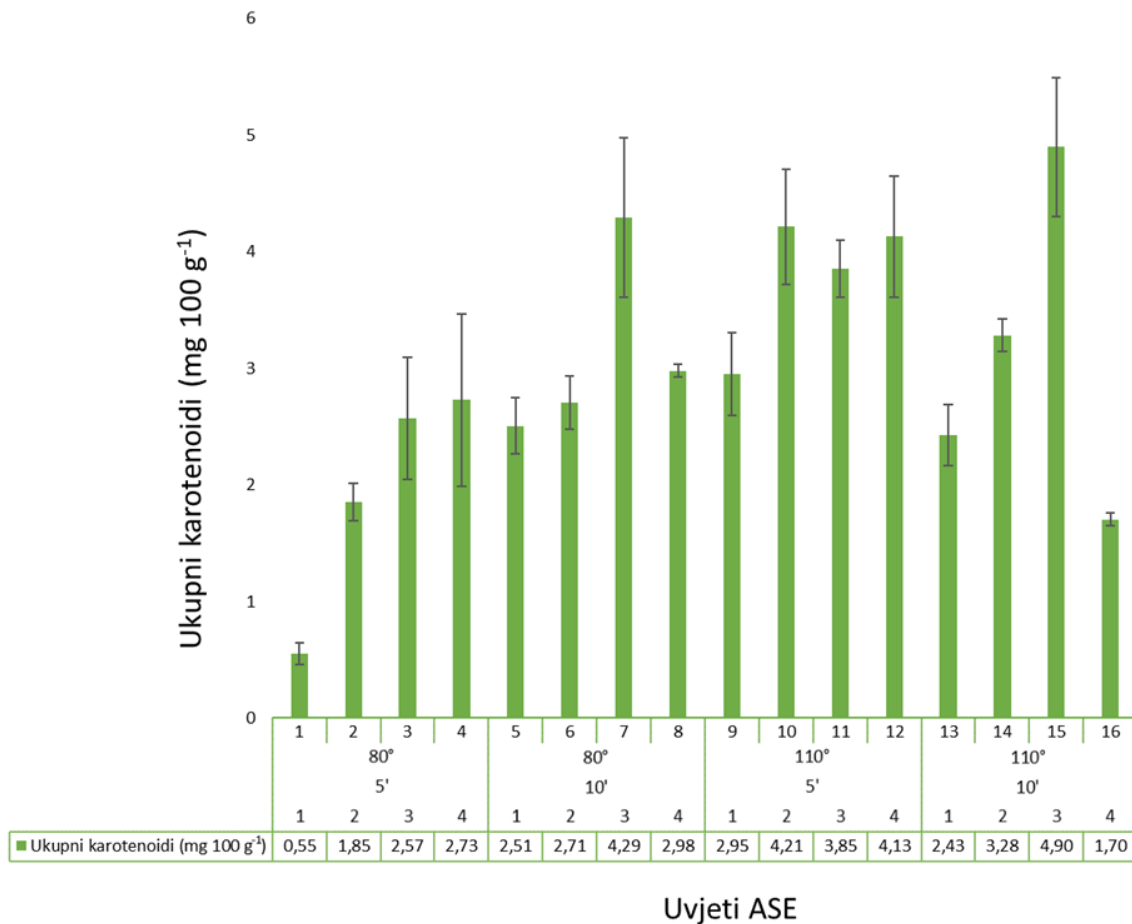
Da ekstrakcija fotosintetskih pigmentata ovisi o kemijskoj prirodi bioaktivnih spojeva (klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi) i primijenjenom ekstrakcijskom otapalu dokazali su Sumanta i sur. (2014). Oni su spektrofotometrijski analizirali fotosintetske pigmente (klorofile *a* i *b* i karotenoide) iz paprati primjenom različitih ekstrakcijskih otapala: 80 %-tnog acetona, 95 %-tnog etanola, dietil etera, dimetil sulfoksida (DMSO) i metanola. Etanol se u gotovo svim slučajevima pokazao kao

najmanje učinkovito ekstrakcijsko otapalo za spomenute pigmente iako posjeduje značajnu praktičnu, sigurnosnu i ekonomsku prednost u odnosu na ostala spomenuta ekstrakcijska otapala. Dietil eter je opisan kao najučinkovitije ekstrakcijsko otapalo za klorofil *a* i *b* za većinu ispitivanih uzoraka, dok je DMSO opisan kao najpogodnije ekstrakcijsko otapalo za karotenoide u promatranim uzorcima. Također, za većinu ispitivanih vrsta primijećeno je značajno povećanje koncentracije pigmenta ( $p < 0,01$ ) u trajanju između 48-72 h, dok je za aceton i metanol opažen značajan pad ( $p < 0,01$ ) udjela klorofila tijekom istog vremena.

Udio klorofila *a*, *b* i ukupnih karotenoida u zamrznutom lišću hrena i nusproizvodima lišća hrena ovisno o korištenom ekstrakcijskom otapalu (aceton, dietil eter, metanol i etanol) proučavali su Tomsone i Kruma (2019). Njihovim je istraživanjem također dokazano kako se udio fotosintetskih pigmenta značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuje ovisno o primijenjenom ekstrakcijskom otapalu. Za razliku od istraživanja Sumanta i sur. (2014), Tomsone i Kruma (2019) opisali su metanol kao najučinkovitije ekstrakcijsko otapalo za klorofil *a* i ukupne karotenoide u lišću hrena i nusproizvodima, dok je aceton opisan kao najučinkovitije ekstrakcijsko otapalo za klorofil *b* i ukupne klorofile. Nadalje, Lisiewska i sur. (2004) su istraživali udio klorofila u listovima i cijeloj biljci kopra u ovisnosti o tretmanima prije zamrzavanja (blanširani i neblanširani uzorci), temperaturama (od  $-20$  do  $-30$  °C) i vremenu skladištenja tijekom cijele godine (0, 3, 6, 9, 12 mjeseci). Istraživanjem je pokazano kako niža temperatura skladištenja doprinosi boljoj očuvanosti klorofila jer u uzorcima pohranjenim na  $-30$  °C nisu primijećene promjene na razini klorofila, dok su u uzorcima pohranjenim na  $-20$  °C gubici iznosili 9 % za lišće i 15 % za cijele biljke. Također, Lisiewska i sur. (2004) navode kako se razgradnja klorofila *a* dogodila brže od razgradnje klorofila *b*.

Shodno navedenim istraživanjima, može se zaključiti kako udio fotosintetskih pigmenta ne ovisi samo o primijenjenom otapalu već i o vrsti materijala iz kojeg se isti ekstrahiraju kao i o načinu skladištenja ispitivanih materijala.

#### 4.1.3. Utjecaj ASE na udio ukupnih karotenoida u sjemenkama komorača



**Slika 14.** Maseni udio ukupnih karotenoida izoliranih iz sjemenki komorača primjenom ASE

Maseni udjeli ukupnih karotenoida u sjemenkama komorača određeni su u rasponu od  $0,55 \pm 0,09$  do  $4,90 \pm 0,59$  mg 100 g<sup>-1</sup> (slika 14) s prosječnom vrijednošću 2,98 mg 100 g<sup>-1</sup> (tablica 5).

Najniži maseni udio ukupnih karotenoida u sjemenkama komorača određen je u uzorku 1 ( $0,55 \pm 0,09$  mg 100 g<sup>-1</sup>) pri temperaturi 80 °C, statičkom vremenu 5 min uz 1 ciklus ekstrakcije, dok je najviši maseni udio ukupnih karotenoida određen u uzorku 15 ( $4,90 \pm 0,59$  mg 100 g<sup>-1</sup>) pri temperaturi 110 °C, statičkom vremenu 10 min uz 3 ciklusa ekstrakcije. Tri ciklusa ASE pokazala su se optimalnima i pri izolaciji karotenoida iz narančaste mrkve u istraživanju Saha i sur. (2015). Isti autori navode kako povećanje količine otapala kroz broj ciklusa iznad 3 ne poboljšava ekstrakciju karotenoida.

Prosječni maseni udio karotenoida u uzorcima 1-8 iznosi  $2,52 \pm 1,05$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  dok u uzorcima 9-16 iznosi  $3,43 \pm 1,05$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  što je za 36 % više u odnosu na nižu temperaturu ekstrakcije ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) temperature na udio ukupnih karotenoida potvrđen je i statističkom analizom (tablica 5). Nadalje, prema dobivenim rezultatima može se zaključiti kako ne postoji statistički značajna razlika ( $p = 0,11$ ) u udjelu ukupnih karotenoida dobivenih pri statičkom vremenu 5, odnosno 10 min. Prosječna vrijednost ekstraktata ekstrahiranih pri 5 min (uzorci 1-4 i 9-12) iznosi  $2,86 \pm 1,25$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ , a pri 10 min (uzorci 5-8 i 13-16) iznosi  $3,10 \pm 1,04$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ . Također, porast broja ciklusa ekstrakcije statistički značajno ( $p < 0,01$ ) doprinosi povećanju masenog udjela karotenoida u sjemenkama komorača (tablica 5), iako se ekstrakcije provedene pri 2 i 4 ciklusa statistički značajno ne razlikuju. Tako je maseni udio ukupnih karotenoida u uzorku 10, dobivenom pri 2 ekstrakcijska ciklusa  $4,21 \pm 0,49$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ , a u uzorku 12, dobivenom pri 4 ekstrakcijska ciklusa  $4,13 \pm 0,52$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ . Također, vidljivo je kako u uzorcima 8 ( $2,98$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ), 11 ( $3,85$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ), 12 ( $4,13$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ) i 16 ( $1,70$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ ) dolazi do sniženja masenog udjela ukupnih karotenoida s porastom broja ekstrakcijskih ciklusa. Shodno tome, dobiveni rezultati ukazuju da su 3 ekstrakcijska ciklusa dovoljna za maksimalno iskorištenje odnosno najviši prinos ukupnih karotenoida.

Također, pri najintenzivnijim uvjetima ekstrakcije ( $110 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min, 4 ciklusa) ekstrahirano je  $1,70$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  ukupnih karotenoida, što se numerički nalazi među nižim vrijednostima. Dobiveni rezultat može biti posljedica degradacije ukupnih karotenoida pri primijenjenim uvjetima. Karotenoidi su osjetljiviji na promjene u odnosu na druge pigmente što može biti povezano s neobičnom linearnom i čvrstom strukturom karotenoidnih molekula, pa se shodno tome preporuča između ostalog, izbjegavati produljeno vrijeme procesiranja i zagrijavanje na povišenoj temperaturi kako ne bi došlo do gubitka karotenoida (Britton i Khachik, 2009).

Lisiewska i sur. (2004) su osim udjela klorofila, u listovima i cijeloj biljci kopra u ovisnosti o tretmanima prije zamrzavanja (blanširani i neblanširani uzorci), temperaturama (od  $-20$  do  $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i vremenu skladištenja tijekom cijele godine (0, 3, 6, 9, 12 mjeseci) odredili i udio ukupnih karotenoida i  $\beta$ -karotena. Proučavajući karotenoide, zapažene su tek minimalne promjene tijekom 3 mjeseca skladištenja, tj. razina  $\beta$ -karotena bila je stabilna u svim uzorcima kopra tijekom zamrzavanja i skladištenja do tri mjeseca.

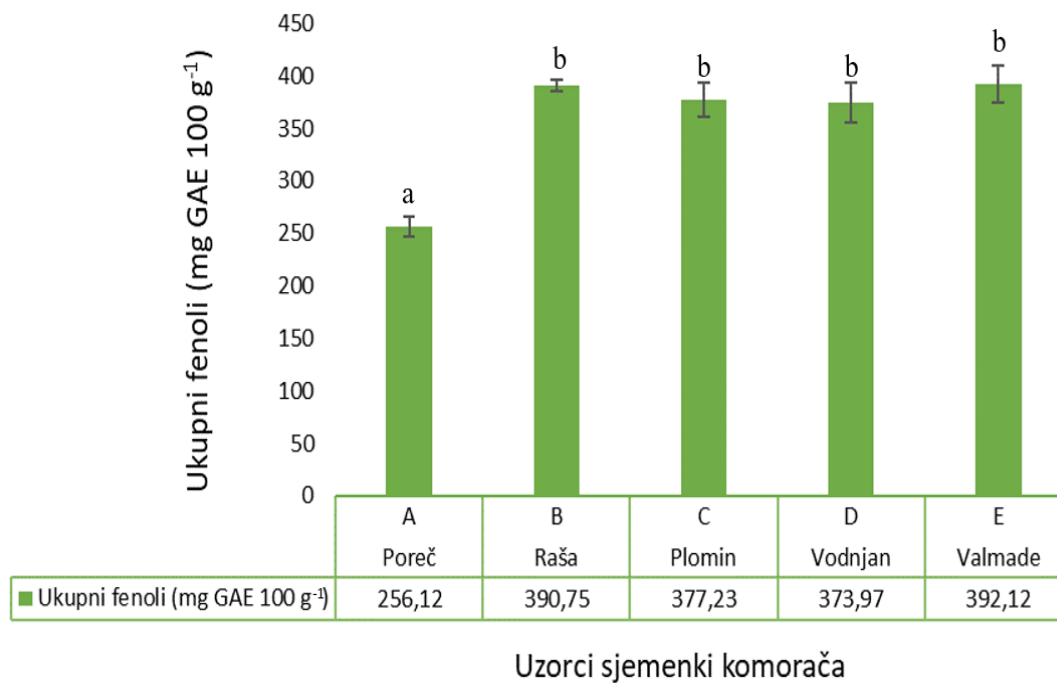
Budući da su sjemenke komorača, primijenjene u prvom dijelu ovog istraživanja, komercijalno dobavljene, nije poznato na koji način i koliko dugo su one skladištene, stoga valja uzeti u razmatranje i mogućnost da je smanjeni maseni udio ispitivanih pigmenata posljedica neadekvatnog skladištenja.

Zaključno, svi ispitivani parametri ekstrakcije (temperatura, statičko vrijeme i broj ciklusa) imali su statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) na udio ukupnih fenola, ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida izoliranih iz sjemenki komorača, osim statičkog vremena na udio ukupnih karotenoida ( $p = 0,11$ ). Prema dobivenim rezultatima statističke obrade najviši prinosi ukupnih fenola i ukupnih klorofila sjemenki gorkog komorača dobiveni su pri temperaturi 110 °C, statičkom vremenu ekstrakcije 10 min i 4 ciklusa. Iako statičko vrijeme ekstrakcije nije pokazalo statistički značajan utjecaj na prinos ukupnih karotenoida, prema dobivenim numeričkim vrijednostima može se zaključiti kako se najviši prinosi ukupnih karotenoida postižu pri temperaturi 110 °C, statičkom vremenu ekstrakcije 10 min i 3 ciklusa.

## 4.2. BIOAKTIVNI POTENCIJAL SJEMENKI SAMONIKLOG KOMORAČA

U drugom dijelu istraživanja, određen je udio bioaktivnih spojeva (fenolni spojevi i biljni pigmenti) iz sjemenki samoniklog komorača s različitih lokacija na području Istre, koji su izolirani primjenom ASE prema prethodno definiranim optimalnim uvjetima ekstrakcije (110 °C/10 min/4 ciklusa) uz 96 %-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo. Ispitani su uzorci sjemenki sakupljeni s 5 lokacija (tablica 3), a u svim uzorcima spektrofotometrijskim analizama određeni su maseni udjeli ukupnih fenola, klorofila *a* i *b* te ukupnih klorofila, kao i udio ukupnih karotenoida te antioksidacijski kapacitet. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni i prikazani su grafički na slikama 15-20 kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja ± standardna devijacija.

### 4.2.1. Utjecaj lokacije na udio ukupnih fenola u sjemenkama samoniklog komorača



Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.  
Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod  $p \leq 0,05$ .

**Slika 15.** Utjecaj lokacije na maseni udio ukupnih fenola u sjemenkama samoniklog komorača s područja Istre

Maseni udio ukupnih fenola ( $\text{mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ ) u sjemenkama samoniklog komorača sakupljenih na području Istre nakon provedene ASE pri uvjetima  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min i 4 ciklusa određen je u rasponu od  $256,12 \pm 9,88 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  (A, Poreč) do  $392,12 \pm 17,33 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  (E, Valmade) (slika 15) s prosječnom vrijednošću  $358,04 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  (A-E).

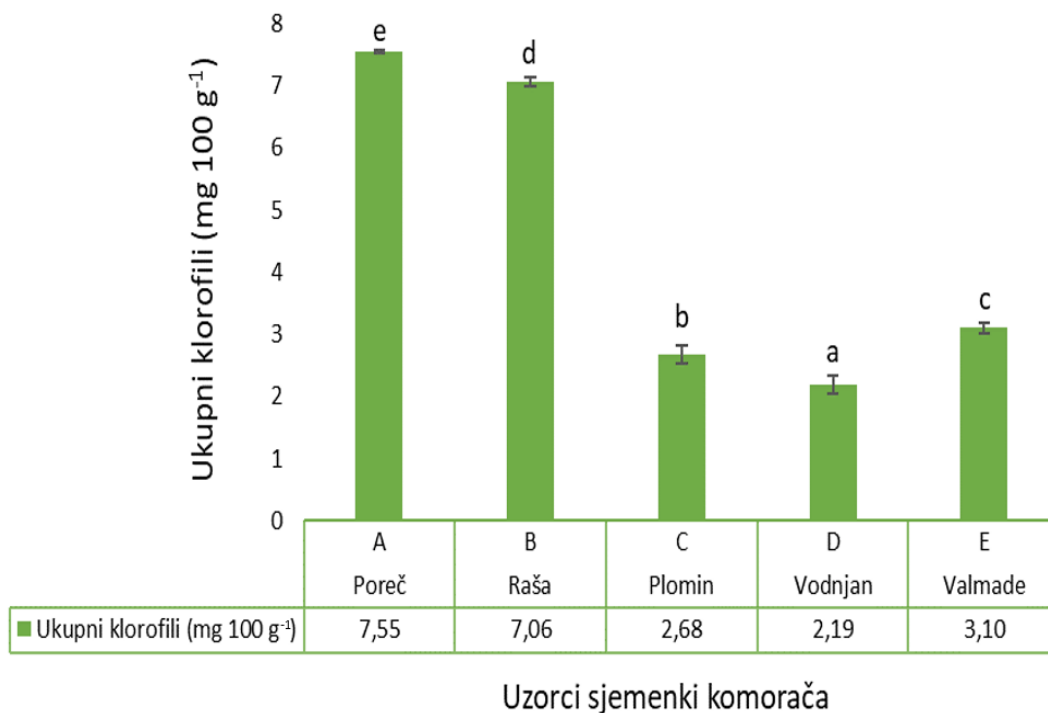
Također, iz grafičkog prikaza (slika 15) vidljiv je i statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) lokacije na maseni udio ukupnih fenola u ispitivanim sjemenkama komorača. Uzorak A statistički se značajno razlikuje u udjelu ukupnih fenola od uzoraka B, C, D i E koji se međusobno statistički ne razlikuju.

Kalleli i sur. (2019) proučavali su fitokemijska i antioksidacijska svojstva metanolnih ekstrakta različitih kultivara sjemenki komorača iz Tunisa (Bizerte, Djerba, Korba) i Francuske (Marseille, Villeneuve-la-Garenne). Navedeni kultivari kultivirani su pod istim okolišnim uvjetima tijekom dvije sezone (2014 i 2015). Dokazano je kako postoje značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u udjelu ukupnih fenola između različitih lokacija. Udio ukupnih fenola varirao je od 5,93 do  $15,69 \text{ mg GAE g}^{-1}$  suhe mase, pri čemu su uzorci sjemenki iz Francuske imali niži udio fenola u usporedbi s uzorcima sjemenki iz Tunisa.

Vremenske i sezonske promjene te lokalno geološko stanje mogu također biti razlog za razlike u koncentraciji pigmenta u biljkama (Sumanta i sur., 2014).



#### 4.2.2. Utjecaj lokacije na udio klorofila u sjemenkama samoniklog komorača

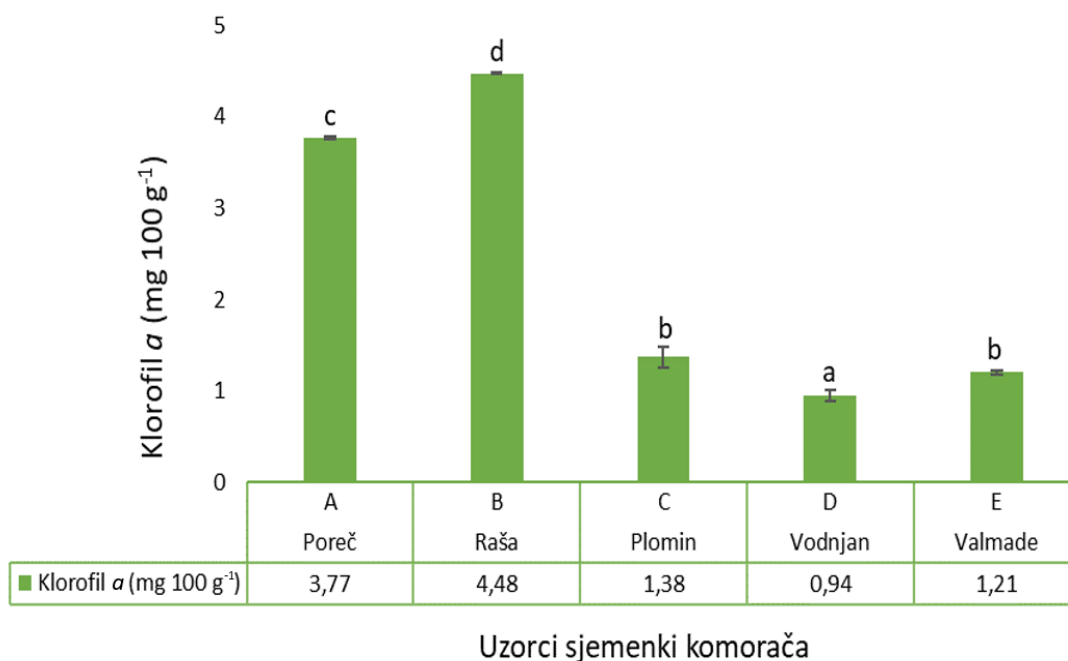


Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.  
Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod  $p \leq 0,05$ .

**Slika 16.** Utjecaj lokacije na maseni udio ukupnih klorofila u sjemenkama samoniklog komorača s područja Istre

Maseni udio ukupnih klorofila ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) u sjemenkama samoniklog komorača s područja Istre određen je u rasponu vrijednosti od  $2,19 \pm 0,15 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (D, Vodnjan) do  $7,55 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (A, Poreč) (slika 16) s prosječnom vrijednošću  $4,51 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (A-E).

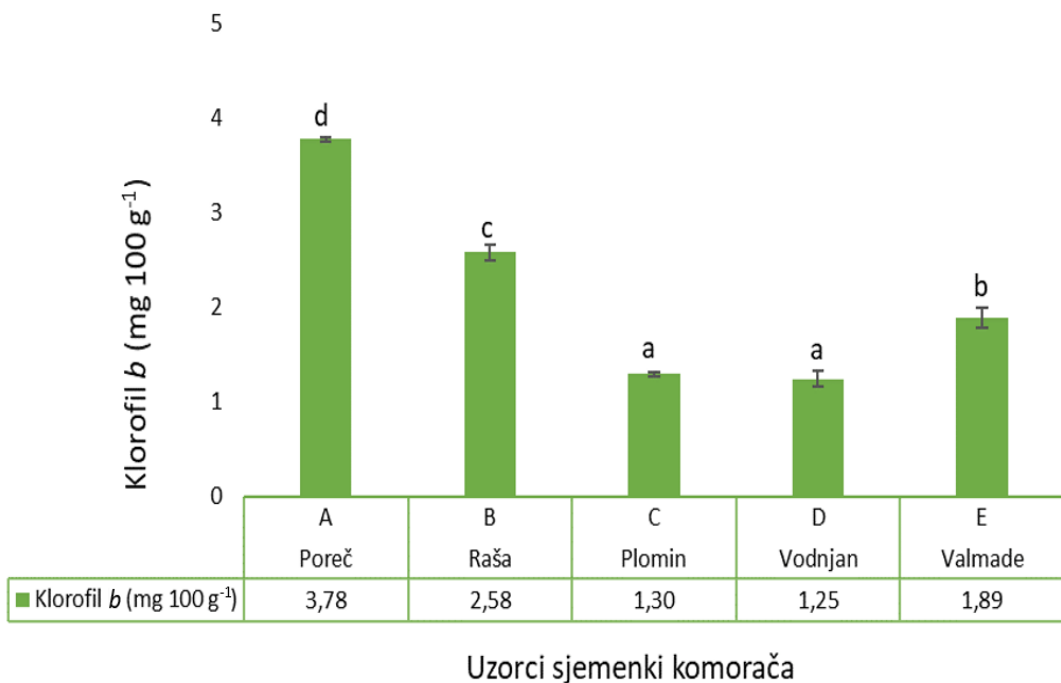
Lokacija je statistički značajno ( $p < 0,01$ ) utjecala i na maseni udio ukupnih klorofila (klorofil *a* + klorofil *b*) u sjemenkama samoniklog komorača. Iz slike 16 vidljivo je i svojevrsno grupiranje uzoraka jer uzorci A (Poreč) i B (Raša) sadrže dvostruko više masene udjele ukupnih klorofila u odnosu na uzorke C (Plomin), D (Vodnjan) i E (Valmade).



Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.  
 Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod  $p \leq 0,05$ .

**Slika 17.** Utjecaj lokacije na maseni udio klorofila *a* u sjemenkama samoniklog komorača s područja Istre

Raspon vrijednosti za maseni udio klorofila *a* kretao se od  $0,94 \pm 0,06$  mg 100 g<sup>-1</sup> (D, Vodnjan) do  $4,48 \pm 0,00$  mg 100 g<sup>-1</sup> (B, Raša) (slika 17) s prosječnom vrijednošću  $2,36$  mg 100 g<sup>-1</sup> (A-E). Statističkom analizom dokazano je kako utjecaj lokacije ima statistički značajan ( $p < 0,01$ ) utjecaj na udio klorofila *a* u ispitivanim sjemenkama. Svi uzorci se međusobno statistički značajno ( $p < 0,01$ ) razlikuju prema udjelu klorofila *a*, osim uzoraka C (Plomin) i E (Valmade). Uzorci A (Poreč) i B (Raša) ne sadrže samo više masene udjele ukupnih klorofila nego i više masene udjele klorofila *a* u odnosu na ostale ispitivane uzorke. Shodno navedenom, uzorak B (Raša) sadrži gotovo peterostruko viši maseni udio klorofila *a* u odnosu na uzorak D (Vodnjan).

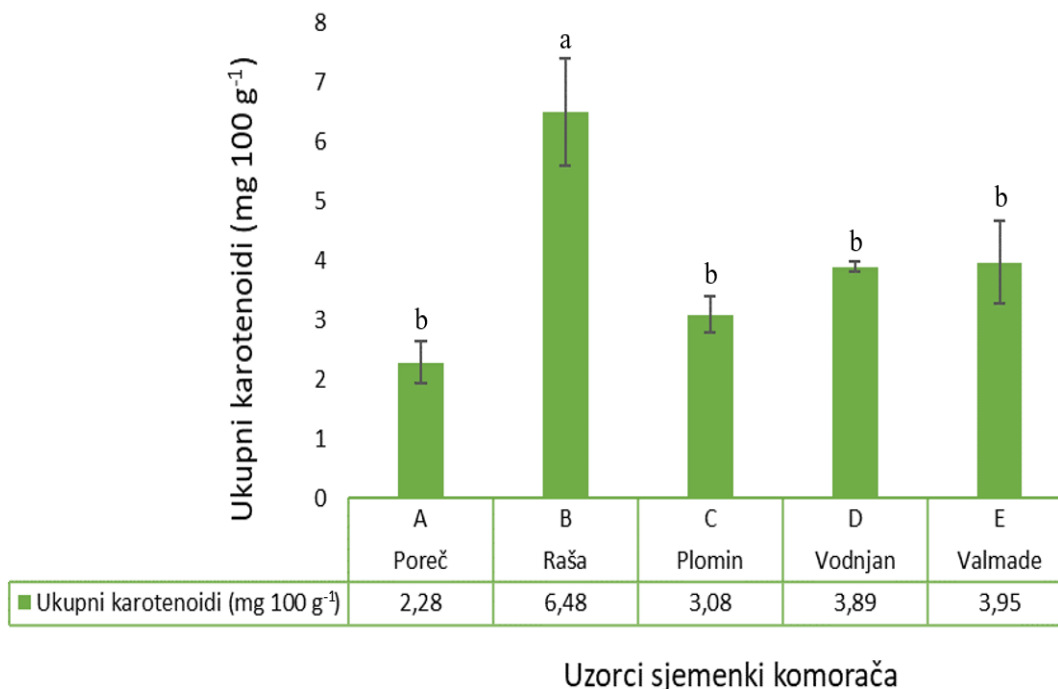


Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.  
 Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod  $p \leq 0,05$ .

**Slika 18.** Utjecaj lokacije na maseni udio klorofila *b* u sjemenkama samoniklog komorača s područja Istre

Nadalje, u sjemenkama samoniklog komorača s područja Istre određen je maseni udio klorofila *b* (mg 100 g<sup>-1</sup>) u rasponu vrijednosti od  $1,25 \pm 0,08$  mg 100 g<sup>-1</sup> (D, Vodnjan) do  $3,78 \pm 0,03$  mg 100 g<sup>-1</sup> (A, Poreč) (slika 18) s prosječnom vrijednošću  $2,16$  mg 100 g<sup>-1</sup> (A-E). Kao i kod klorofila *a*, lokacija je imala statistički značajan ( $p < 0,01$ ) utjecaj i na udio klorofila *b*. Iz grafičkog prikaza (slika 18) vidljivo je kako se uzorci C (Plomin) i D (Vodnjan) statistički međusobno ne razlikuju prema udjelu klorofila *b*, no postoji statistički značajna razlika u masenom udjelu klorofila *b* među svim ostalim ispitivanim uzorcima sjemenki. Kao i kod masenog udjela ukupnih klorofila te masenog udjela klorofila *a*, trend svojevrsnog grupiranja uočljiv je i kod vrijednosti masenog udjela klorofila *b* u sjemenkama samoniklog komorača, gdje grupa uzoraka A (Poreč) i B (Raša) sadrži više masene udjele klorofila *b* u odnosu na grupu uzoraka C (Plomin), D (Vodnjan) i E (Valmade). Maseni udio klorofila *b* u uzorku A (Poreč) tako je trostruko viši u odnosu na uzorak D (Vodnjan).

#### 4.2.3. Utjecaj lokacije na udio ukupnih karotenoida u sjemenkama samoniklog komorača



Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.  
Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod  $p \leq 0,05$ .

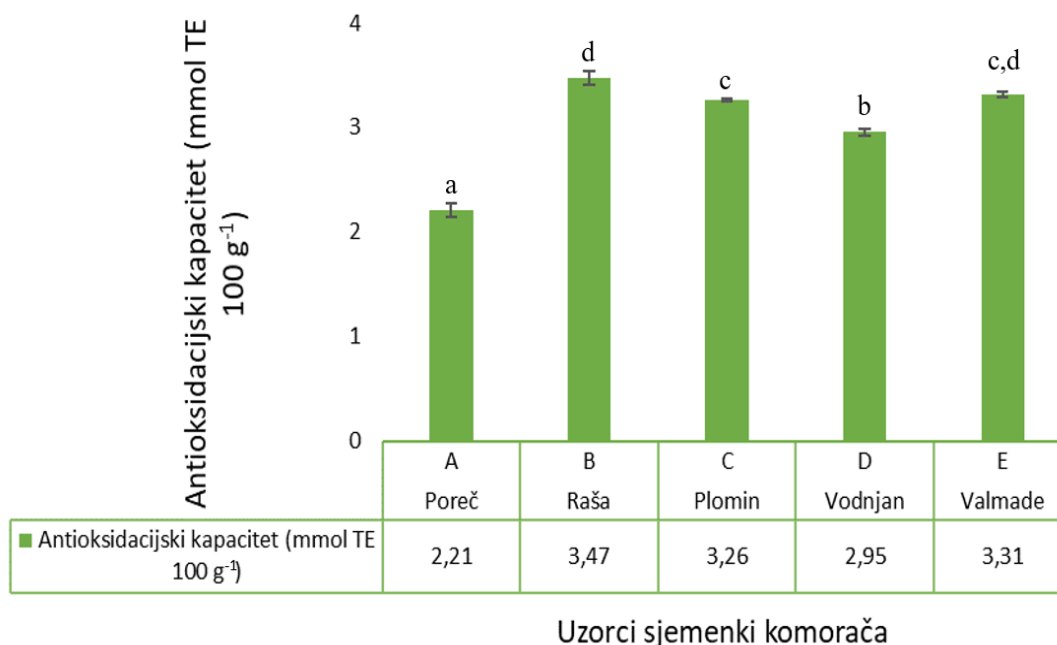
**Slika 19.** Utjecaj lokacije na maseni udio ukupnih karotenoida u sjemenkama samoniklog komorača s područja Istre

Maseni udio ukupnih karotenoida ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) u ispitivanim sjemenkama samoniklog komorača određen je u rasponu vrijednosti od  $2,28 \pm 0,35 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (A, Poreč) do  $6,48 \pm 0,91 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (B, Raša) (slika 19) s prosječnom vrijednošću  $3,94 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (A-E).

Temeljem rezultata statističke analize utjecaja lokacije na udio ukupnih karotenoida vidljiva je statistički značajna ( $p < 0,01$ ) razlika između ispitivanih sjemenki komorača u udjelu ukupnih karotenoida (slika 19), pri čemu se uzorak B (Raša) statistički značajno razlikuje od preostalih uzoraka (A, C, D, E) koji se pak statistički međusobno ne razlikuju. Važno je napomenuti kako se i ovdje može uočiti svojevršno grupiranje uzoraka slično onome uočenom prethodno, tj. ponovno se grupiraju uzorci C (Plomin), D (Vodnjan) i E (Valmade). Bitnu razliku čini uzorak A (Poreč) u

kojem je određen najviši maseni udio ukupnih klorofila i klorofila *b*, ali najniži maseni udio ukupnih karotenoida.

#### 4.2.4. Utjecaj lokacije na antioksidacijski kapacitet sjemenki samoniklog komorača



Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.  
Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod  $p \leq 0,05$ .

**Slika 20.** Utjecaj lokacije na antioksidacijski kapacitet sjemenki samoniklog komorača s područja Istre

Antioksidacijski kapacitet u sjemenkama samoniklog komorača s područja Istre određen je u rasponu vrijednosti od  $2,21 \pm 0,06$  mmol TE  $100 \text{ g}^{-1}$  (A, Poreč) do  $3,47 \pm 0,07$  mmol TE  $100 \text{ g}^{-1}$  (B, Raša) s prosječnom vrijednošću  $3,04 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  (slika 20) (A-E). Svi uzorci sjemenki statistički su se međusobno razlikovali ( $p < 0,01$ ) u vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta. Iznimku čini uzorak E (Valmade) koji se statistički značajno ne razlikuje od uzoraka B (Raša) i C (Plomin).

Tonković (2019) je odredila antioksidacijski kapacitet FRAP metodom u ekstraktima odmašćenih sjemenki komorača dobivenih primjenom sukcesivne ASE i 30 %-tne vodene otopine acetona, a

potom 30 %-tne vodene otopine metanola. U acetonskim ekstraktima vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određena je u rasponu od 254,24 do 474,81 mg AAE 100 g<sup>-1</sup>, a u metanolnim ekstraktima od 87,62 do 117,50 mg AAE 100 g<sup>-1</sup>. Dobivene vrijednosti, značajno su više od vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju. Rajić i sur. (2018) navode kako antioksidacijski kapacitet, mjeran DPPH metodom, iznosi 3,73±0,04 mmol TE L<sup>-1</sup> u vodeno-etanolnom ekstraktu sjemenki komorača dobivenom dvostrukom perkolacijom pri sobnoj temperaturi.

Kao što je i ranije navedeno, antioksidacijsko djelovanje fenolnih spojeva u korelaciji je s njihovom kemijskom strukturom. Uklanjanje slobodnih radikala uglavnom ovisi o broju i položaju hidroksilnih skupina koje doniraju vodik, a utjecaj imaju i glikozilacije aglikona kao i prisutnost drugih grupa koje mogu donirati vodik (-NH, -SH) (Cai i sur., 2004). Uspoređujući vrijednosti masenog udjela ukupnih fenola s vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta može se uočiti određena korelacija. Uzorci u kojima su određeni najviši maseni udjeli ukupnih fenola pokazuju i najviši antioksidacijski kapacitet. Razlika se ogleda tek u statističkoj analizi jer se uzorci B-E nisu statistički značajno razlikovali u udjelu ukupnih fenola dok u slučaju antioksidacijskog kapaciteta ipak postoji određena statistički značajna razlika. Sličnu korelaciju uočili su ranije spomenuti Kalleli i sur. (2019) koji su mjerenjem antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom uočili kako ekstrakti sjemenki komorača iz Tunisa ne pokazuju samo više vrijednosti ukupnih fenola, već i više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta usporedno sa sjemenkama komorača iz Francuske. Također, isti su autori koristili Pearsonov koeficijent korelacije kako bi procijenili odnos između antioksidacijskog kapaciteta i fenolnih spojeva sjemenki *Foeniculum vulgare*. Dokazano je kako je sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala snažno povezana s udjelom ukupnih fenola (r=0,902), a dobra korelacija između antioksidacijskog kapaciteta i glavnih fenolnih spojeva u metanolnom ekstraktu sjemenki komorača (3,4-di-*O*-kafeoilkina kiselina, r=0,889; 4,5-di-*O*-kafeoilkina kiselina, r=0,886) dodatno potvrđuje njihovu važnost pri uklanjanju slobodnih radikala. Cai i sur. (2004) u svojem su istraživanju također potvrdili da polifenolni spojevi imaju najveći doprinos antioksidacijskom djelovanju. Međutim, Tonković (2019) nije dokazala korelaciju između antioksidacijskog kapaciteta (mg AAE 100 g<sup>-1</sup>) i udjela ukupnih fenola (mg 100 g<sup>-1</sup>) u metanolnim ekstraktima, dok je korelacija u acetonskim ekstraktima sjemenki gorkog komorača bila vrlo visoka (r=0,96). Naposljetku, kako bi potvrdili da su fenolni spojevi odgovorni za antioksidacijski kapacitet vodeno-etanolnog ekstrakta sjemenki komorača, Rajić i sur. (2018) proveli su identifikaciju i kvantifikaciju fenolnih spojeva LC-MS/MS metodom te praćenjem višestrukih

reakcija (MRM). U ispitivanim ekstraktima dokazali su prisustvo nekoliko fenolnih spojeva od kojih se za količinski najzastupljenije, *p*-hidroksibenzojevu, klorogensku i *p*-kumarinsku kiselinu može reći da pridonose antioksidacijskom djelovanju. No, kako se u dostupnoj literaturi navode različiti fenolni spojevi koji doprinose antioksidacijskom djelovanju sjemenki komorača, potrebno je ponoviti kako uzroci tome mogu biti brojni, od uporabe različitih genotipova komorača kao i različitih dijelova komorača do primjene različitih metoda, otapala i uzgoja u različitim klimatskim uvjetima (Rajić i sur., 2018). Osim ukupnog udjela fenola, Salama i sur. (2015) dokazali su kako antioksidacijskom kapacitetu u metanolnom ekstraktu slatkog komorača pridonosi i ranije spomenuti vitamin C.

Uz fenolne spojeve, znatan doprinos antioksidacijskom djelovanju svakako potječe i od biljnih pigmentata od kojih se posebno ističu karotenoidi koji štite biljke od oksidativnih oštećenja. Pretpostavlja se da sudjeluju u zaštiti lipoofilnih odjeljaka te uklanjanju reaktivnih vrsta nastalih u fotooksidacijskim procesima od kojih se ističu singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ) i peroksilni radikali (Stahl i Sies, 2003). Iako klorofili ne djeluje kao glavni antioksidansi jer nisu donori vodika, niti sudjeluju u reakcijama oksidacije i redukcije vodika (Tomsone i Kruma, 2019) te klorofil *a* pokazuje najslabije antioksidacijsko djelovanje među svim zelenim pigmentima što se objašnjava njegovom velikom kemijskom nestabilnošću (Lanfer-Marquez i sur., 2005) klorofili također manjim dijelom pridonose antioksidacijskom kapacitetu (Ferruzzi i sur., 2002).

Zaključno, uzorci sjemenki samoniklog komorača sakupljenih na području Istre odlikuju se zastupljenošću bioaktivnih spojeva i antioksidacijskim kapacitetom te predstavljaju vrijedan prirodni izvor antioksidanasa. Također, temeljem dobivenih rezultata mogu se primijetiti velike razlike u zastupljenosti fenolnih spojeva i pigmentata u uzorcima sjemenki samoniklog komorača obzirom na mikrolokaciju. Evidentno je da različiti geografski i klimatski uvjeti uvelike doprinose bioraznolikosti samoniklog biljnog materijala.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedene statističke analize može se zaključiti:

1. Tijekom optimiranja ASE, iz sjemenki gorkog komorača izolirani su sljedeći bioaktivni spojevi s prosječnim vrijednostima: ukupni fenoli (290,70 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>), klorofil *a* (6,98 mg 100 g<sup>-1</sup>), klorofil *b* (3,23 mg 100 g<sup>-1</sup>), ukupni klorofili (10,20 mg 100 g<sup>-1</sup>) i ukupni karotenoidi (2,98 mg 100 g<sup>-1</sup>).
2. Statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) na maseni udio ukupnih fenola, ukupnih klorofila i ukupnih karotenoida imali su svi ispitivani parametri ekstrakcije (temperatura, statičko vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa ekstrakcije), izuzev statičkog vremena ekstrakcije na maseni udio ukupnih karotenoida ( $p = 0,11$ ).
3. Obzirom na rezultate statističke analize, najviši prinosi ukupnih fenola i ukupnih klorofila izoliranih iz sjemenki komorača primjenom ASE dobiveni su pri temperaturi 110 °C, statičkom vremenu ekstrakcije 10 min i 4 ciklusa ekstrakcije. Iako su najviši prinosi ukupnih karotenoida postignuti pri temperaturi 110 °C, statičkom vremenu ekstrakcije 10 min i 3 ciklusa ekstrakcije, za ekstrakciju navedenih spojeva prednost se može dati kraćem statičkom vremenu ekstrakcije (5 min) ekstrakcije što u konačnici donosi uštedu vremena i energije.
4. Iz sjemenki samoniklog komorača sakupljenih na području Istre izolirani su sljedeći bioaktivni spojevi s prosječnim vrijednostima: ukupni fenoli (358,04 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>), klorofil *a* (2,36 mg 100 g<sup>-1</sup>), klorofil *b* (2,16 mg 100 g<sup>-1</sup>), ukupni klorofili (4,51 mg 100 g<sup>-1</sup>), ukupni karotenoidi (3,94 mg 100 g<sup>-1</sup>). Prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta (FRAP) iznosila je 3,04 mmol TE 100 g<sup>-1</sup>.
5. Promatrajući utjecaj lokacije na udio fenolnih spojeva i pigmenata u sjemenkama samoniklog komorača sakupljenih s različitih lokacija na području Istre, statistička analiza pokazala je značajne razlike u zastupljenosti navedenih spojeva obzirom na lokaciju.
6. Najviši maseni udio ukupnih fenola (392,12 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>) određen je u sjemenkama komorača sakupljenim na lokaciji Valmade, dok su u sjemenkama komorača sakupljenim na lokaciji Poreč određeni najviši maseni udjeli ukupnih klorofila (7,55 mg 100 g<sup>-1</sup>) i klorofila *b* (3,78 mg 100 g<sup>-1</sup>). Najviši maseni udio klorofila *a* (4,48 mg 100 g<sup>-1</sup>), ukupnih



karotenoida ( $6,48 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) te najviši antioksidacijski kapacitet ( $3,47 \text{ mmol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ ) karakterizirali su sjemenke komorača sakupljene na lokaciji Raša.

## 6. LITERATURA

- Akbar, S. (2020) Handbook of 200 Medicinal Plants, Springer, Stockton, str. 931-945. doi:10.1007/978-3-030-16807-0
- Abdullah, Y., Schneider, B., Petersen, M. (2008) Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species. *Phytochem. Lett.* **1**, 199-203. doi:10.1016/j.phytol.2008.09.010
- Alvarez-Rivera, G., Bueno, M., Ballesteros-Vivas, D., Mendiola, J. A., Ibanez, E. (2020) Pressurized Liquid Extraction. U: Liquid-Phase Extraction, (Poole, C. F., ured.), Elsevier Inc., Amsterdam/Oxford/Cambridge, str. 375-394. doi:10.1016/B978-0-12-816911-7.00013-X
- Angelov, G., Boyadzhieva, S. (2016) Extraction of Fennel (*Foeniculum vulgare*) Seeds: Process Optimization and Antioxidant Capacity of the Extracts. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **30**, 245-253. doi:10.15255/cabeq.2015.2281
- Anka, Z. M., Gimba, S. N., Nanda, A., Salisu, L. (2020) Phytochemistry and Pharmacological Activities of *Foeniculum Vulgare*. *IOSR J. Pharm.* **10**, 1-10.
- Badgujar, S. B., Patel, V. V., Bandivdekar, A. H. (2014) *Foeniculum vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology. *BioMed Res. Int.* **2014**, 1-32. doi:10.1155/2014/842674
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., Orlie, V. (2016) Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **49**, 96-109. doi:10.1016/j.tifs.2016.01.006
- Belabdelli, F., Piras, A., Bekhti, N., Falconieri, D., Belmokhtar, Z., Merad, Y. (2020) Chemical Composition and Antifungal Activity of *Foeniculum vulgare* Mill. *Chemistry Africa* **3**, 323-328. doi:10.1007/s42250-020-00130-x
- Benzie, I. F. F. (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin. Biochem.* **29**, 111-116. doi:10.1016/0009-9120(95)02013-6

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292

Bonan, G. (2015) *Ecological Climatology: Concepts and Applications*, 3. izd., Cambridge University Press, Cambridge, str. 241.

Borisjuk, L., Nguyen, T. H., Neuberger, T., Rutten, T., Tschiersch, H., Claus, B., Feussner, I., Webb, A. G., Jakob, P., Weber, H., Wobus, U., Rolletschek, H. (2005) Gradients of lipid storage, photosynthesis and plastid differentiation in developing soybean seeds. *New Phytol.* **167**, 761-776. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01474.x

Britton, G., Khachik, F. (2009) Carotenoids in Food. U: Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health, (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., ured.), Birkhäuser Verlag, Basel/Boston/Berlin, str. 45-66. doi:10.1007/978-3-7643-7501-0

Bursać Kovačević, D., Maras, M., Barba, F. J., Granato, D., Roohinejad, S., Mallikarjunan, K., Montesano, D., Lorenzo, J. M., Putnik, P. (2018) Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: A review. *Food Chem.* **268**, 513-521. doi:10.1016/j.foodchem.2018.06.091

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* **74**, 2157-2184. doi:10.1016/j.lfs.2003.09.047

De Marino, S., Gala, F., Borbone, N., Zollo, F., Vitalini, S., Visioli, F., Iorizzi, M. (2007) Phenolic glycosides from *Foeniculum vulgare* fruit and evaluation of antioxidative activity. *Phytochemistry* **68**, 1805-1812. doi:10.1016/j.phytochem.2007.03.029

Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., Esteban, J., Sanz, J. (2006) Comparison of the Volatile Composition of Wild Fennel Samples (*Foeniculum vulgare* Mill.) from Central Spain. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6814-6818. doi:10.1021/jf0609532

Douglas Schneider (2014) Fennel seeds, <[https://douglasschneider.com/culinary-herbs-spices-stock-art-illustrations/#iLightbox\[gallery-1\]/43](https://douglasschneider.com/culinary-herbs-spices-stock-art-illustrations/#iLightbox[gallery-1]/43)>. Pristupljeno 18. lipnja 2020.

- Faudale, M., Viladomat, F., Bastida, J., Poli, F., Codina, C. (2008) Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Wild, Edible, and Medicinal Fennel from Different Mediterranean Countries. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1912-1920. doi:10.1021/jf073083c
- Fasihifar, M., Salehi, E. A., Sheikholeslami, Z. (2015) Investigation on the Effect of Fennel Essence on Sensorial, Textural and Microbial Properties of Baguette Bread. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* **4**, 83-87.
- Ferioli, F., Giambanelli, E., D'Antuono, L. F. (2017) Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *piperitum*) florets, a traditional culinary spice in Italy: evaluation of phenolics and volatiles in local populations, and comparison with the composition of other plant parts. *J. Sci. Food Agric.* **97**, 5369-5380. doi:10.1002/jsfa.842
- Ferruzzi, M. G., Bohm, V., Courtney, P. D., Schwartz, S. J. (2002) Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J. Food Sci.* **67**, 2589-2595. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08782.x.
- Gaur, S., Shivhare, U. S., Ahmed, J. (2006) Degradation of chlorophyll during processing of green vegetables: a review. *Stewart Postharvest Rev.* **5**, 1-8. doi: 10.2212/spr.2006.5.14
- Ghanem, M. T. M., Radwan, H. M. A., Mahdy, El-S. M., Elkholy, Y. M., Hassanein, H. D., Shahat, A. A. (2012) Phenolic compounds from *Foeniculum vulgare* (Subsp. *Piperitum*) (Apiaceae) herb and evaluation of hepatoprotective antioxidant activity. *Pharmacogn. Res.* **4**, 104-108. doi:10.4103/0974-8490.94735
- Islam, M. A., Jeong, B.-G., Jung, J., Shin, E.-C., Choi, S.-G., Chun, J. (2017) Phytosterol Determination and Method Validation for Selected Nuts and Seeds. *Food Anal. Methods* **10**, 3225-3234. doi:10.1007/s12161-017-0877-3
- Jangdey, M. S., Gupta, A., Sarwa, K. (2018) Apigenin and Quercetin: Potential Therapeutic Challenging Effective Against in Alzheimer's Disease. *UK. J. Pharm. Biosci.* **6**, 46-51. doi:10.20510/ukjpb/6/i1/173531
- Javed, R., Hanif M. A., Ayub, M. A., Rehman, R. (2020) Fennel. U: Medicinal Plants of South Asia, (Hanif, M., Nawaz, H., Khan, M., Byrne, H., ured.), Elsevier, San Diego, str. 241-256. doi: 10.1016/B978-0-08-102659-5.00019-7

- Jentzer, J.-B., Alignan, M., Vaca-Garcia, C., Rigal, L., Vilarem, G. (2015) Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chem.* **166**, 561-567. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.078
- Kalleli, F., Rebey, I. B., Wannas, W. A., Boughalleb, F., Hammami, M., Tounsi, M. S., M'hamdi, M. (2019) Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and methanol extract from Tunisian and French fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds. *J. Food Biochem.* **43**, 1-14. doi: 10.1111/jfbc.12935
- Kooti, W., Moradi, M., Ali-Akbari, S., Sharafi-Ahvazi, N., Asadi-Samani, M., Ashtary-Larky, D. (2015) Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: A review. *J. HerbMed. Pharmacol.* **4**, 1-9.
- Lanfer-Marquez, U. M., Barros, R. M. C., Sinnecker, P. (2005) Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Res. Int.* **38**, 885-891. doi:10.1016/j.foodres.2005.02.012
- Li, P., Li, S. P., Lao, S. C., Fu, C. M., Kan, K. K. W., Wang, Y. T. (2006) Optimization of pressurized liquid extraction for Z-ligustilide, Z-butylidenephthalide and ferulic acid in *Angelica sinensis*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**, 1073-1079. doi:10.1016/j.jpba.2005.08.035
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **1**, F4.3.1–F4.3.8. doi:10.1002/0471142913.faf0403s01
- Lisiewska, Z., Kmiecik, W., Słupski, J. (2004) Contents of chlorophylls and carotenoids in frozen dill: effect of usable part and pre-treatment on the content of chlorophylls and carotenoids in frozen dill (*Anethum graveolens* L.), depending on the time and temperature of storage. *Food Chem.* **84**, 511-518. doi:10.1016/s0308-8146(03)00265-6
- Lloyd, P. J., van Wyk, J. (2012) Introduction to Extraction in Food Processing. U: Enhancing Extraction Processes in the Food Industry, (Lebovka, F., Vorobiev, N., Chemat, E., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 1-24. doi:10.1201/b11241-2
- Majdoub, N., el-Guendouz, S., Rezgui, M., Carlier, J., Costa, C., Kaab, L. B. B., Miguel, M. G. (2017) Growth, photosynthetic pigments, phenolic content and biological activities of *Foeniculum*

*vulgare* Mill., *Anethum graveolens* L. and *Pimpinella anisum* L. (Apiaceae) in response to zinc. *Ind. Crop. Prod.* **109**, 627-636. doi:10.1016/j.indcrop.2017.09.012

Mallik, S., Sharangi, A. B., Sarkar, T. (2020) Phytochemicals of Coriander, Cumin, Fenugreek, Fennel and Black Cumin: A Preliminary Study. *Natl. Acad. Sci. Lett.* doi:10.1007/s40009-020-00884-5

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 Science+Business Media, Berlin/ Dordrecht/ Heidelberg/New York, str. 75-87. doi: 10.1007/978-1-61779-624-1\_4

Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Acta* **703**, 8-18. doi:10.1016/j.aca.2011.07.018

Nagy, M., Tofană, M., Socaci, S. A., Pop, A. V., Bors, M. D., Frcas, A., Moldovan, O. (2014) Total Phenolic, Flavonoids and Antioxidant Capacity of Some Medicinal and Aromatic Plants. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca, Food Sci. Technol.* **71**, 209-210. doi:10.15835/buasvmcn-fst:10639

Oktay, M., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003) Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT - Food Sci. Technol.* **36**, 263-271. doi:10.1016/s0023-6438(02)00226-8

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Schmeda-Hirschmann, G., Burillo, J., Codina, C. (2004) Bioguided Isolation and Identification of the Nonvolatile Antioxidant Compounds from Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Waste. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1890-1897. doi:10.1021/jf030717g

Parmoon, G., Ebadi, A., Jahanbakhsh, S., Hashemi, M., Moosavi, S. A. (2018) Effect of Exogenous Application of Several Plant Growth Regulators on Photosynthetic Pigments of Fennel Plants. *Not. Sci. Biol.* **10**, 508-515. doi:10.15835/nsb10410356

Peričić, M. (2019) Primjena ubrzane ekstrakcije otapalima u izolaciji fenolnih spojeva iz sjemenki komorača (završni rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

- Putnik, P., Barba, F. J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Bursać Kovačević, D. (2017) Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europea*). *Food Bioprod. Process.* **106**, 19-28. doi:10.1016/j.fbp.2017.08.004
- Putnik, P., Barba, F. J., Lucini, L., Rocchetti, G., Montesano, D. (2019) Conventional, non-conventional extraction techniques and new strategies for the recovery of bioactive compounds from plant material for human nutrition. *Food Res. Int.* **123**, 516-517. doi:10.1016/j.foodres.2019.05.010
- Rajić, J. R., Đorđević, S. M., Tešević, V. V., Živković, M. B., Đorđević, N. O., Paunović, D. M., Nedović, V. A., Petrović, T. S. (2018) The extract of fennel fruit as a potential natural additive in food industry. *J. Agric. Sci.* **63**, 205-215. doi:10.2298/JAS1802205R
- Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A., Qurishi, M. A. (2016) *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arab. J. Chem.* **9**, 1574-1583. doi:10.1016/j.arabjc.2012.04.011
- Repajić, M., Tonković, P., Kruk, V., Zorić, Z., Garofulić, I. E., Palčić, I., Dragović-Uzelac, V. (2020) Bioactive compounds and antioxidant capacity in fennel seeds influenced by pressurized liquid extraction. *Proceedings of the 13<sup>th</sup> European Nutrition Conference FENS 2019*, Dublin. doi:10.1017/S0029665120004966
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A.-H., Khalel, K. I. (2012) 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. doi:10.1016/j.indcrop.2012.10.012
- Rodríguez-Solana, R., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., Cortés-Diéguez, S. (2014) Characterization of fennel extracts and quantification of estragole: Optimization and comparison of accelerated solvent extraction and Soxhlet techniques. *Ind. Crop. Prod.* **52**, 528-536. doi:10.1016/j.indcrop.2013.11.028
- Saber, J. I., Eshra, D., H. (2019) Using Fennel Seeds and their Oil as a Preservative and Functional Food to Produce Some Food and Drink Products to Alleviate Cough Symptoms. *Alexandria Science Exchange Journal* **40**, 406-414.

- Saha, S., Walia, S., Kundu, A., Sharma, K., Paul, R. K. (2015) Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **177**, 369-375. doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.039
- Salama, Z. A., El Baz, F. K., Gaafar, A. A., Zaki, M. F. (2015) Antioxidant activities of phenolics, flavonoids and vitamin C in two cultivars of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) in responses to organic and bio-organic fertilizers. *J. Saudi. Soc. Agric. Sci.* **14**, 91-99. doi:10.1016/j.jssas.2013.10.004
- Sayed-Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., Merah, O. (2017) The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Ind. Crop. Prod.* **109**, 661-671. doi:10.1016/j.indcrop.2017.09.027
- Shams, K., Abdel-Azim, N., Saleh, I. A., Hegazy, M. E. F. (2015) Green technology: Economically and environmentally innovative methods for extraction of medicinal & aromatic plants (MAP) in Egypt. *J. Chem. Pharm. Res.* **7**, 1054-1057.
- Shayan, M., Mehrannia, K., Rastegar, T., Khanehzad, M., Ghantabpour, T., Hassanzadeh, G. (2019) Teratogenic effect of the aqueous extract of the *Foeniculum vulgare* (fennel) on fetal development in mice. *J. Contemp. Med. Sci.* **5**, 258-263.
- 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 Sci.* **98**, 828-834. doi:10.1016/j.meatsci.2014.07.001
- Skalli, S., Bencheikh, R. S. (2011) Epileptic seizure induced by fennel essential oil. *Epileptic Disord.* **13**, 345-347. doi: 10.1684/epd.2011.0451
- Smolikova, G. N., Medvedev, S. S. (2016) Photosynthesis in the Seeds of Chloroembryophytes. *Russ. J. Plant Physiol.* **63**, 1-12. doi:10.1134/s1021443715060163
- Stahl, W., Sies, H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.* **24**, 345-351. doi:10.1016/S0098-2997(03)00030-X
- Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., Suprakash, R. (2014) Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Res. J. Chem. Sci.* **4**, 63-69. doi:10.1055/s-0033-1340072



Teimoori-Boghsani, Y., Bagherieh-Najjar, M. B., Mianabadi, M. (2018) Investigation of Phytochemical and Antioxidant Capacity of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Against Gout. *Journal of Medicinal Plants and By-products* **1**, 59-65.

Tomsone, L., Kruma, Z. (2019) Spectrophotometric analysis of pigments in horseradish by using various extraction solvents. *Proceedings of the 13th Baltic Conference on Food Science and Technology "FOOD. NUTRITION. WELL-BEING."* *FOODBALT*, Jelgava, str. 210-215. doi: 10.22616/FoodBalt.2019.023.

Tonković, P. (2019) Utjecaj ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku na udio fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet u sjemenkama komorača (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

TradeIndia (2020) Fennel Essential Oil Bitter, <<https://www.tradeindia.com/products/fennel-essential-oil-bitter-c4897781.html>>. Pristupljeno 18. lipnja 2020.

USDA (2019) Spices, fennel seed. USDA - U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service, Washington, <<https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171323/nutrients>>. Pristupljeno 19. veljače 2020.

Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech.* **17**, 300-312. doi:10.1016/j.tifs.2005.12.004

Zeller, A., Rychlik, M. (2006) Character Impact Odorants of Fennel Fruits and Fennel Tea. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 3686-3692. doi: 10.1021/jf052944j

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

*Sara Ekić*

---

Sara Ekić