

# Utjecaj veličine čestica i vremena destilacije na udio i sastav eteričnog ulja sjemenki komorača

---

Medved, Ana Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:632478>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2021.

Ana Marija Medved

**UTJECAJ VELIČINE ČESTICA I  
VREMENA DESTILACIJE NA  
UDIO I SASTAV ETERIČNOG  
ULJA SJEMENKI KOMORAČA**

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 Ene Cegledi, mag. ing.



Ovo istraživanje provedeno je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Izolacija i enkapsulacija bioaktivnih molekula samonikle i kultivirane koprive i komorača i učinci na fiziologiju organizma“ financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ PlantBioPower, IP-01-2018-4924). Voditelj projekta: prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac.

## ZAHVALA

*Prije svega, od srca se želim zahvaliti svojoj mentorici, doc. dr. sc. Maji Repajić, na nesebičnoj pomoći, prenesenom znanju, ukazanom povjerenju te pruženim prilikama. Hvala Vam za veliko akademsko iskustvo koje sam zbog Vas stekla te za svaki poticaj, motivaciju i podršku koju ste mi pružili tijekom ovih nekoliko godina. Također se zahvaljujem mag. ing. Eni Cegledi na savjetima i pomoći u provođenju istraživačkog dijela rada.*

*Zahvaljujem se svojem malom krugu velikih ljudi, svojim prijateljima, koji su bili uz mene tijekom svih uspona i padova, pružali mi podršku, ali i učinili ovaj period života ljepšim i nezaboravnim. Veliko hvala i Petri, mojoj kolegici, partnerici, a prije svega prijateljici. Bez tebe moji studentski dani ne bi bili tako lijepi i uspješni.*

*Na kraju se želim zahvaliti svojoj obitelji, a posebno roditeljima Diani i Ivici zbog kojih sam danas osoba kakva jesam. Hvala za sve što ste mi pružili u životu, a najviše za ljubav, podršku i razumijevanje.*

## 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: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

### UTJECAJ VELIČINE ČESTICA I VREMENA DESTILACIJE NA UDIO I SASTAV ETERIČNOG ULJA SJEMENKI KOMORAČA

Ana Marija Medved, univ. bacc. nutr.  
0058206856

**Sažetak:** U ovome radu ispitan je utjecaj veličine čestica i vremena destilacije na udio i sastav eteričnog ulja sjemenki komorača. Primjenom vodene destilacije te variranjem veličine čestica (<0,45 mm, 0,45-1 mm, 1-1,6 mm i >1,6 mm) i vremena destilacije (40, 80 i 120 min) dobiveno je 12 uzoraka eteričnog ulja kojima je određen prinos te je ispitan kemijski sastav primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS). Prinos eteričnog ulja kretao se u rasponu od 1,50 do 12,50 %. Ukupno je identificirano 18 hlapljivih spojeva iz skupine fenilpropanoide (prosječna vrijednost 80,65±0,87 %), oksidiranih monoterpena (prosječna vrijednost 15,81±0,59 %), monoterpena (prosječna vrijednost 3,12±0,52 %) i aromatskih aldehida (prosječna vrijednost 0,42±0,04 %). Najzastupljeniji spoj bio je *trans*-anetol (prosječna vrijednost 877,71±54,18 mg mL<sup>-1</sup>). Veličina čestica i vrijeme destilacije pokazali su statistički značajan utjecaj ( $p \leq 0,05$ ) na prinos i sastav eteričnog ulja. Najviši prinos ulja postignut je destilacijom manje veličine čestica sjemenki (<0,45 mm) i duljim vremenom destilacije (120 min). Najviša koncentracija *trans*-anetola dobivena je primjenom najkraćeg vremena destilacije (40 min) uzorka najveće veličine čestica (>1,6 mm). Vrijeme destilacije od 40 i 120 min bilo je podjednako efikasno za izolaciju hlapljivih spojeva dok je manja veličina čestica (<0,45 mm) bila efikasnija za izolaciju lako i srednje hlapljivih spojeva, a veličina čestica 0,45-1 mm i >1,6 mm za izolaciju teže hlapljivih spojeva.

**Ključne riječi:** sjemenke komorača, vodena destilacija, eterično ulje, prinos ulja, hlapljivi spojevi

**Rad sadrži:** 54 stranice, 13 slika, 9 tablica, 69 literaturnih navoda, 1 prilog

**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:** Ena Cegledi, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Maja Repajić (mentor)
3. prof. dr. sc. Sandra Balbino (član)
4. prof. dr. sc. Branka Levaj (zamjenski član)

**Datum obrane:** 20. prosinca 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

**Graduate university study programme:** Nutrition

### INFLUENCE OF PARTICLE SIZE AND DISTILLATION TIME ON THE YIELD AND COMPOSITION OF FENNEL SEEDS ESSENTIAL OIL

*Ana Marija Medved*, univ. bacc. nutr.  
0058206856

**Abstract:** In this study, the influence of particle size and distillation time on the yield and composition of fennel seeds essential oil was investigated. The essential oil was extracted by hydrodistillation while the particle size (<0.45 mm, 0.45-1 mm, 1-1.6 mm and > 1.6 mm) and distillation time (40, 80 and 120 min) were varied. Twelve samples of essential oil were obtained in which the yield and composition by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) were analyzed. The essential oil yield ranged from 1.50 to 12.50 %. A total of 18 volatile compounds from the group of phenylpropanoids (average value  $80.65 \pm 0.87$  %), oxygenated monoterpenes (average value  $15.81 \pm 0.59$  %), monoterpenes (average value  $3.12 \pm 0.52$  %) and aromatic aldehydes (average value  $0.42 \pm 0.04$  %) were identified. The most abundant compound was *trans*-anethole (average value  $877.71 \pm 54.18$  mg mL<sup>-1</sup>). Particle size and distillation time showed a statistically significant effect ( $p \leq 0.05$ ) on the yield and composition of essential oil. The highest oil yield was achieved with distillation of smaller particle size (<0.45 mm) and longer distillation time (120 min). The highest concentration of *trans*-anethole was obtained using the shortest distillation time (40 min) of the sample with the largest particle size (> 1.6 mm). Distillation time of 40 and 120 min were equally effective for isolation of volatile compounds, while smaller particle size (<0.45 mm) was more effective for isolation of highly and medium volatile compounds and particle sizes of 0.45-1 mm and >1.6 mm were more effective for isolation of less volatile compounds.

**Keywords:** fennel seeds, hydrodistillation, essential oil, oil yield, volatile compounds

**Thesis contains:** 54 pages, 13 figures, 9 tables, 69 references, 1 supplement

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

**Technical support and assistance:** Ena Cegledi, M.E.

#### Reviewers:

1. Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full professor (president)
2. Maja Repajić, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Sandra Albino, PhD, Full professor (member)
4. Branka Levaj, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** December 20<sup>th</sup>, 2021



## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. KOMORAČ.....	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV SJEMENKI KOMORAČA.....	3
2.3. ETERIČNO ULJE.....	4
2.4. KEMIJSKI SASTAV ETERIČNIH ULJA .....	5
2.4.1. Terpeni.....	5
2.4.2. Fenilpropanoidi .....	6
2.4.3. Ostali hlapljivi spojevi.....	7
2.5. ETERIČNO ULJE SJEMENKI KOMORAČA .....	7
2.6. METODE ODREĐIVANJA VELIČINE ČESTICA .....	10
2.6.1. Metoda prosijavanja .....	10
2.6.2. Metoda raspršivanja laserskog svjetla .....	11
2.7. IZOLACIJA ETERIČNIH ULJA.....	12
2.7.1. Vodena destilacija .....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1. MATERIJALI .....	15
3.1.1. Sjemenke gorkog komorača .....	15
3.1.2. Kemikalije i standardi.....	15
3.1.3. Aparatura i pribor .....	15
3.2. METODE RADA .....	16
3.2.1. Frakcioniranje uzorka prema veličini čestica .....	16
3.2.2. Određivanje veličine čestica.....	17
3.2.3. Vodena destilacija .....	18
3.2.4. Određivanje prinosa eteričnog ulja.....	20
3.2.5. Analiza hlapljivih spojeva .....	20
3.2.6. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
4.1. VELIČINA ČESTICA .....	25
4.2. PRINOS ETERIČNOG ULJA .....	28
4.3. KEMIJSKI SASTAV ETERIČNOG ULJA.....	30
4.3.1. Zastupljenost hlapljivih spojeva po kemijskim skupinama.....	30
4.3.2. Hlapljivi spojevi sjemenki komorača .....	36
5. ZAKLJUČCI.....	46
6. LITERATURA.....	48
7. PRILOZI.....	55

## 1. UVOD

Komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) je višegodišnja aromatična i ljekovita biljka iz obitelji Apiaceae, a prema vrsti se dijeli na slatki, gorki i firentinski komorač. Izvorno potječe iz mediteranskog podneblja, ali se u današnje vrijeme naturalizacijom i kultivacijom proširio u sve dijelove svijeta. Stabljika komorača je uspravna i razgranata, lišće perasto, a cvjetovi su žuti i sitni. Plodovi komorača su sjemenke duguljasta oblika veličine 4-10 mm. Zbog nutritivnih i funkcionalnih svojstava, komoraču se pripisuje antimikrobno, antialergijsko, antiupalno, hepatoprotektivno, antikancerogeno te antioksidativno djelovanje. Pogodan je za ublažavanje nadutosti kod djece i dojenčadi, povoljno utječe na stres i mučnine, a koristan je i kod problema s bronhijalnim tkivima. Iako se od davnina upotrebljavao za izradu ljekovitih kućnih pripravaka, danas se začinski i slatki komorač uzgajaju radi plodova, korijena i lišća koji se koriste u kulinarske svrhe, dok se gorki komorač uzgaja prvenstveno radi sjemenki i eteričnog ulja koje se iz njih dobiva.

Eterično ulje je smjesa različitih hlapljivih spojeva koja ima karakterističan miris i okus. Dobiva se iz biljnih sirovina, a sposobnost njegovog stvaranja pripada sjemenjačama, posebice obitelji Apiaceae. Karakterističan miris te širok spektar farmakološkog djelovanja sjemenki komorača može se pripisati upravo visokom sadržaju eteričnog ulja. Zbog toga ono ima široku primjenu u farmaceutskoj industriji, a radi posjedovanja antimikrobnog, antifungalnog i antioksidativnog djelovanja, može se koristiti i u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji.

Eterično ulje komorača dobiva se raznim modernim i konvencionalnim metodama od kojih je najčešća vodena destilacija. Ono sadrži hlapljive spojeve, a u najvišim se koncentracijama nalaze *trans*-anetol, estragol, mircen, D-limonen,  $\alpha$ -pinen i *p*-anisaldehid. Na prinos eteričnog ulja i njegov kemijski sastav mogu utjecati brojni faktori poput agroklimatskih uvjeta, stupnja zrelosti sjemenke, veličine čestica, odabira metode izolacije te vremena destilacije.

Zbog toga je cilj ovog istraživanja bio ispitati utjecaj veličine čestica i vremena destilacije na izolaciju i kemijski sastav eteričnog ulja sjemenki komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) postupkom vodene destilacije. U tu svrhu proizvedeno je 12 uzoraka eteričnog ulja kojima je određen prinos (%), a kemijski sastav analiziran je primjenom plinske kromatografije uz masenu spektrometriju (GC-MS).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KOMORAČ

Komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) je tradicionalna dvogodišnja ljekovita i aromatična biljka iz obitelji Apiaceae (Badgular i sur., 2014). Iako je porijeklom iz južnog Sredozemlja, postao je široko naturaliziran i u mnogim drugim dijelovima svijeta poput Kine, Japana, Rusije i Indije (Ahmed i sur., 2019). Komorač je uspravna i razgranata biljka visine do 2,5 m s pernatim, mekanim lišćem i žutim cvjetovima (slika 1a), dok plod predstavljaju suhe sjemenke duljine 4-10 mm (slika 1b). Uzgaja se u poljima ili povrtnjacima, a za pravilan rast potrebna mu je umjerena klima u rano proljeće ili zimu, drenirano tlo bogato hranjivim sastojcima te sunčeva svjetlost (Javed i sur., 2020; Badgular i sur., 2014). Kao samoniklo bilje uglavnom se može naći u blizini mora te na suhim, kamenitim i vapnenastim tlima (Javed i sur., 2020).

Najpoznatije vrste komorača su *Foeniculum vulgare* Mill. var. *piperitum* (gorki ili divlji komorač), *Foeniculum vulgare* Mill. var. *dulce* (slatki komorač) te *Foeniculum vulgare* Mill. var. *azoricum* (začinski komorač) (Seidemann, 2005). Dok se začinski i slatki komorač uzgajaju radi plodova, eteričnog ulja i lišća koje je jestivo i koje se koristi u kulinarske svrhe, gorki komorač uzgaja se prvenstveno radi sjemenki i eteričnog ulja koje se iz njih dobiva (Malhotra, 2012).



**Slika 1.** Cvijet i stabljika (a) i sjemenke (b) komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) (Medved i Tonković, 2020)

Komorač se izuzetno koristi, kako u medicini, tako i u mnogim drugim industrijskim područjima. U medicini se koristi zbog svog antikancerogenog, antimikrobnog, antiupalnog,

antialergijskog, hepatoprotektivnog, antioksidativnog, ali i drugih zaštitnih djelovanja. Od davnina se upotrebljavao za izradu ljekovitih kućnih pripravaka u svrhu liječenja raznih bolesti poput gastritisa, bubrežnih bolesti, artritisa, leukoreje, ulkusa u ustima, itd. Pogodan je za ublažavanje nadutosti kod djece i dojenčadi, ubrzava probavu masne hrane te olakšava bolove u trbuhu. Veoma je koristan i kod prehlade i kašlja te problema s bronhijalnim tkivima. Također, može pomoći kod konjuktivitisa, a kod žena i dojilja vrlo se često koristi kao emenagog i galaktagog (Javed i sur., 2020). Osim u medicini, komorač kao jedan od važnijih začina ima široku primjenu i u kulinarstvu. Razni dijelovi biljke poput lukovice i lišća mogu se konzumirati sirovi ili kuhani te se dodavati raznim jelima, prilozima i salatama. Zbog svoje arome slične anisu često se koristi i u prehrambenoj industriji. Dodaje se pekarskim proizvodima, ribljim i mesnim jelima, raznim začinskim mješavinama te alkoholnim pićima radi aromatiziranja i poboljšanja organoleptičkih svojstva (Rather i sur., 2012).

## **2.2. KEMIJSKI SASTAV SJEMENKI KOMORAČA**

Sjemenke komorača prosječno sadrže 52,3 % ugljikohidrata, 39,8 % vlakana, 15,8 % proteina, 14,9 % masti te 8,8 % vode, a energetska vrijednost 100 g sjemenki iznosi 345 kcal. Od vitamina su najzastupljeniji vitamin A (135 IU 100 g<sup>-1</sup>), niacin (6,05 mg 100 g<sup>-1</sup>), vitamin C (21 mg 100 g<sup>-1</sup>), tiamin (0,41 mg 100 g<sup>-1</sup>) i riboflavin (0,35 mg 100 g<sup>-1</sup>), a od minerala kalij (1690 mg 100 g<sup>-1</sup>), kalcij (1200 mg 100 g<sup>-1</sup>), željezo (19 mg 100 g<sup>-1</sup>), fosfor (487 mg 100 g<sup>-1</sup>), magnezij (385 mg 100 g<sup>-1</sup>), natrij (88 mg 100 g<sup>-1</sup>), mangan (6,53 mg 100 g<sup>-1</sup>), cink (3,7 mg 100 g<sup>-1</sup>) i bakar (1,07 mg 100 g<sup>-1</sup>) (USDA, 2019; Malhotra, 2012). Međutim, kemijski sastav sjemenki može varirati ovisno o morfotipu, klimi i stadiju berbe (Malhotra, 2012).

Sjemenke komorača karakteristične su zbog eteričnog (0,79 %) i nehlapljivog ulja (5,82 %), a mogu sadržavati još i sluz, škrob, flavonoide, tanine i kumarine (Malhotra, 2012; El-Awadi i Hassan, 2010). Prema Balbino i sur. (2021), udio nehlapljivog ulja u sjemenkama komorača iznosi 7,89 %, a ono sadrži 30,19±1,75 % zasićenih te 69,81±1,75 % nezasićenih masnih kiselina. Najznačajnije masne kiseline su petroselinska i oleinska kiselina čiji zbroj iznosi 60,20±1,35 %, zatim laurinska kiselina (24,63±1,74 %) te linolna masna kiselina (8,52±0,54%). Udio ukupnih sterola u tom ulju iznosi 492,40±22,0 mg 100 g<sup>-1</sup> od kojih dominiraju stigmasterol (172,50±8,9 mg 100 g<sup>-1</sup>) i β-sitosterol (140,20 ±9,3 mg 100 g<sup>-1</sup>) (Balbino i sur., 2021). U ulju komorača prisutni su i pigmenti (44,74 mg 100 g<sup>-1</sup>), točnije karotenoidi i klorofili, koji doprinose vizualnom izgledu i ljekovitim svojstvima ulja (Medved i Tonković, 2020).

### 2.3. ETERIČNO ULJE

Eterično ulje je hlapljiva smjesa različitih spojeva koja ima karakterističan miris i okus. Uljne je konzistencije i teško topljivo u vodi, ali je topljivo u lipidima i organskim otapalima koja imaju manju gustoću od vode (Bakkali i sur., 2008; Kalođera i sur., 1998). Eterična ulja su prirodni produkt koji se dobiva iz biljnih sirovina, a sposobnost stvaranja takvih ulja pripada uglavnom sjemenjačama. Najvažnijim porodicama biljaka koje proizvode eterično ulje smatraju se *Apiaceae*, *Pinaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae* i *Brassicaceae* (Kalođera i sur., 1998).

Eterično ulje nastaje u plazmi stanice te pripada skupini biljnih ekskreta, a može biti pohranjeno u različitim dijelovima biljke poput listova, cvjetova, kore, korijena i plodova. Uglavnom se nalazi u istaknutim i morfološki diferenciranim spremnicima koji su karakteristični za pojedini rod pa je tako kod porodica *Piperaceae*, *Lauraceae* i *Zingiberaceae* eterično ulje odloženo u posebnim stanicama koje se nazivaju uljenice. Kod porodica *Lamiaceae* i *Asteraceae*, ulje se nalazi u spremnicima između stanične membrane i kutikule (u žlijezdama, žljezdanim ljuskama ili žljezdanim dlakama), dok se kod porodice *Apiaceae* ono nalazi u intracelularnim prostorima ili kanalima (Kalođera i sur., 1998).

U biljaka, eterično ulje ima fiziološku ulogu stvaranja mirisa koje privlači razne kukce radi oprašivanja, ali može služiti i za obranu od drugih životinja. Također, može smanjiti i transpiraciju odnosno isparavanje vode iz biljaka (Kalođera i sur., 1998). S druge strane, zbog velikog broja raznih kemijskih spojeva te znanstveno potvrđenih spoznaja o njihovoj ljekovitosti, eterična ulja našla su široku primjenu i u industriji. Poznato je otprilike 3000 eteričnih ulja, a čak ih je 300 komercijalno važno za prehrambenu, farmaceutsku, agronomsku, parfemsku i kozmetičku industriju (Bakkali i sur., 2008; Kalođera i sur., 1998). Najčešće poznati učinci eteričnih ulja su: antimikrobni učinak, stimuliranje teka, poticanje lučenja žuči, diuretikički učinak i ekspektorirajući učinak. Zbog svog antibakterijskog, antivirusnog i antimikotičnog djelovanja, pri izradi ljekovitih pripravaka obično ne treba dodavati nikakav konzervans ukoliko ti pripravci sadrže dovoljno eteričnog ulja. Ono se također primjenjuje i u aromaterapiji te za dezinfekciju zraka zatvorenih prostora u obliku aerosola. Može pomoći i u liječenju cirkulacijskih smetnji, sportskih ozljeda ili kod reumatičnih oboljenja zbog sposobnosti lokalnog podraživanja kože. Osim toga, eterična ulja mogu djelovati stimulirajuće na tek zbog podraživanja receptora za njuh i okus, a što pokreće želučano-crijevnu sekreciju. Upravo zbog ovog svojstva, često se koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao korigensi (Kalođera i sur., 1998). Upotrebljavaju se i kao dodaci okusu hrani, industrijska

otapala i mirisi za sredstva za čišćenje, a neka su eterična ulja pokazala i ljekovita svojstva prilikom liječenja disfunkcija pojedinih organa (Bakkali i sur., 2008).

Međutim, potrebno je obratiti pažnju i na toksična i nepoželjna svojstva ulja. Štetna djelovanja povezana su s njihovom lipofilnošću i podražujućim djelovanjima, a oralnom konzumacijom visokih doza može doći do grčeva, povraćanja i hemoragičnog gastroenteritisa. Dodatno, mogu izazvati i alergiju na hranu izravnim (povećavanje apsorpcije alergena zbog nadraživanja sluznice) ili neizravnim putem (reaktivni sastojci ulja su alergeni). Zbog svoje lipofilnosti, eterična ulja vrlo lako mogu proći i krvno-moždanu barijeru i tako izazvati vrtoglavice, glavobolje ili čak i prestanak disanja (Kalođera i sur., 1998).

## **2.4. KEMIJSKI SASTAV ETERIČNIH ULJA**

Eterična ulja vrlo su kompleksne prirodne smjese. Poznato je više od 500 različitih kemijskih spojeva koji ulaze u sastav eteričnih ulja, a pojedino ulje može sadržavati 20-60 komponenti različitih koncentracija. Takva ulja karakteriziraju dvije ili tri glavne komponente u visokim koncentracijama (20-70 %), dok su ostali spojevi prisutni tek u tragovima. Komponenta koja prevladava uvjetuje biološka svojstva eteričnog ulja odnosno fizikalna i kemijska svojstva te farmakološko djelovanje. U sastav eteričnog ulja ulaze spojevi koji pripadaju različitim grupama organskih spojeva poput alkohola, fenola, ugljikovodika, aldehida, ketona itd. Međutim, glavna podjela hlapljivih spojeva jest na terpene, fenilpropanoide te ostale spojeve (Bakkali i sur., 2008; Kalođera i sur., 1998).

### **2.4.1. Terpeni**

Terpeni su najveća skupina fitokemikalija koje proizvodi veliki broj biljaka i neke životinje, a od iznime su važnosti zbog različitih funkcija i metaboličke kontrole (Perveen i Al-Taweel, 2018; Devappa i sur., 2011). Najviše koncentracije terpena prisutne su u lišću i reproduktivnim strukturama biljaka neposredno prije cvatnje (Paduch i sur., 2007). Klasificiraju se u grupe s obzirom na broj i strukturnu organizaciju ugljikovih atoma, a nastaju linearnim povezivanjem izoprenskih jedinica ( $C_5H_8$ ) po principu „glava-rep“, nakon čega može uslijediti ciklizacija i preslagivanje ugljikovog kostura (Devappa i sur., 2011; Paduch i sur., 2007). Također, terpeni mogu biti i kemijski modificirani pa se u tom slučaju dobiveni spojevi nazivaju terpenoidima (Paduch i sur., 2007).

S obzirom na broj ugljikovih atoma, terpeni se dijele u sedam skupina: semiterpeni ( $C_5$ ), monoterpeni ( $C_{10}$ ), seskviterpeni ( $C_{15}$ ), diterpeni ( $C_{20}$ ), triterpeni ( $C_{30}$ ), tetraterpeni ( $C_{40}$ ) te politerpeni. Međutim, u sastav eteričnih ulja ulaze samo skupine monoterpena, seskviterpena, diterpena i triterpena (Perveen i Al-Taweel, 2018; Kalođera i sur., 1998). Monoterpeni ( $C_{10}H_{16}$ ) su spojevi koji čine 90 % eteričnih ulja (Bakkali i sur., 2008). Nastaju spajanjem dviju izoprenskih jedinica, a s obzirom na funkcionalnu skupinu dijele se na ugljikovodike, alkohole, aldehide, ketone, estere, etere, perokside i fenole. Ovoj skupini spojeva pripadaju mircen, geraniol, kamfor, karvon, timol, mentol, nerol, *p*-cimen, sabinen i fenhon (Bakkali i sur., 2008). Seskviterpeni ( $C_{15}H_{24}$ ) su posebno zanimljivi zbog svoje raznolike strukture i farmakološke aktivnosti (Cordell, 1976). Nastaju spajanjem tri izoprenske jedinice, a upravo produžetak lanca omogućava povećanje broja ciklizacija pa tako postoje aciklički, monociklički, biciklički i triciklički seskviterpeni (Bakkali i sur., 2008; Kalođera i sur., 1998). Neki od predstavnika ove skupine spojeva su nerolidol, farnezol, bisabolen,  $\alpha$ -kurkumen i santonin (Kalođera i sur., 1998). Diterpeni ( $C_{20}H_{32}$ ) i triterpeni ( $C_{30}H_{48}$ ) nalaze se u uljima dobivenim ekstrakcijom s organskim otapalima (Kalođera i sur., 1998). Diterpeni su spojevi čiji skelet sadržava četiri izoprenske jedinice. Imaju izrazito značajnu biološku aktivnost zbog antiupalnih i antimikrobnih svojstva, a neki od spojeva poput forskolina i marubenola posjeduju i djelovanje na kardiovaskularni sustav (Perveen i Al-Taweel, 2018). Triterpeni se nalaze u raznim dijelovima biljaka poput pluta, kore, cvijeća i lišća, a za izolaciju ovih spojeva potrebna je prethodna obrada materijala (npr. sušenje, mljevenje, prosijavanje) (Muffler i sur., 2011). Najznačajniji spojevi iz skupine triterpena su skvalen i glicirizinska kiselina (Kalođera i sur., 1998).

#### 2.4.2. Fenilpropanoidi

Fenilpropanoidi su velika skupina biljnih fenola, a sam naziv označava bilo koji spoj čiji je lanac od tri ugljikova atoma vezan na benzenski prsten ( $C_6-C_3$ ) (Korkina, 2007; Seigler, 1998). Proizvode se putem šikiminske kiseline odnosno deaminacijom aminokiseline fenilalanin u cimetnu kiselinu, uz prisustvo katalizatora fenilalanin amonijazne liaze. Mnogi fenolni spojevi biljnog porijekla poput kumarina, lignana, flavonoida i izoflavonoida zapravo su sekundarni produkti metabolizma fenilpropanoida (Korkina, 2007). Fenilpropanski derivati se u visokim koncentracijama mogu naći upravo u uljima nekih biljnih vrsta iz porodice *Apiaceae* (Kalođera i sur., 1998).

Utvrđeno je da fenilpropanoidi i njihovi derivati imaju mnoge blagotvorne učinke na ljudsko zdravlje. Prvenstveno se takvi učinci pripisuju njihovom antioksidativnom djelovanju i mogućnosti uklanjanja slobodnih radikala. Stoga su vrlo djelotvorni u kemoprevenciji tumora i zacjeljivanju rana, smanjuju mogućnost pojave osteoporoze i kardiovaskularnih bolesti, a neki spojevi imaju i protuupalno djelovanje. Jedan od najrasprostranjenijih fenilpropanoida u ljudskoj prehrani jest klorogenska kiselina za koju se smatra da utječe na smanjenje učestalosti kemijske karcinogeneze (Korkina, 2007). Još neki od predstavnika iz ove skupine spojeva su cimetaldhid, anetol, estragol i eugenol (Burčul i sur., 2020).

### 2.4.3. Ostali hlapljivi spojevi

Uz terpene i fenilpropanoide, u eteričnim se uljima nalaze i drugi hlapljivi spojevi, lančasti ugljikovodici te njihovi derivati s kisikom, sumporom i dušikom (Kalodera i sur., 1998). Iako je sumpor vrlo oštrog mirisa, njegovi organski spojevi prisutni u eteričnim uljima mogu biti vrlo ugodni. Takvi spojevi poput alil sulfida i dimetil sulfida biljkama služe za obranu i detoksikaciju, a sadrže ih češnjak, luk i poriluk. S druge strane, spojevi koji sadrže dušik mogu se naći u samo nekoliko eteričnih ulja, prvenstveno u uljima citrusa. Predstavnici ove skupine spojeva su metil antratil, piridin, pirazin te skatol koji se koristi kao fiksator u cvjetnim mirisima (Zuzarte i Salgueiro, 2015). Još neke skupine ostalih hlapljivih spojeva su izotiocijanati i laktoni koji se nalaze u povrću poput repe, kelja, kupusa, rotkvice i celera (Zuzarte i Salgueiro, 2015; Başer i Demirci, 2007).

## 2.5. ETERIČNO ULJE SJEMENKI KOMORAČA

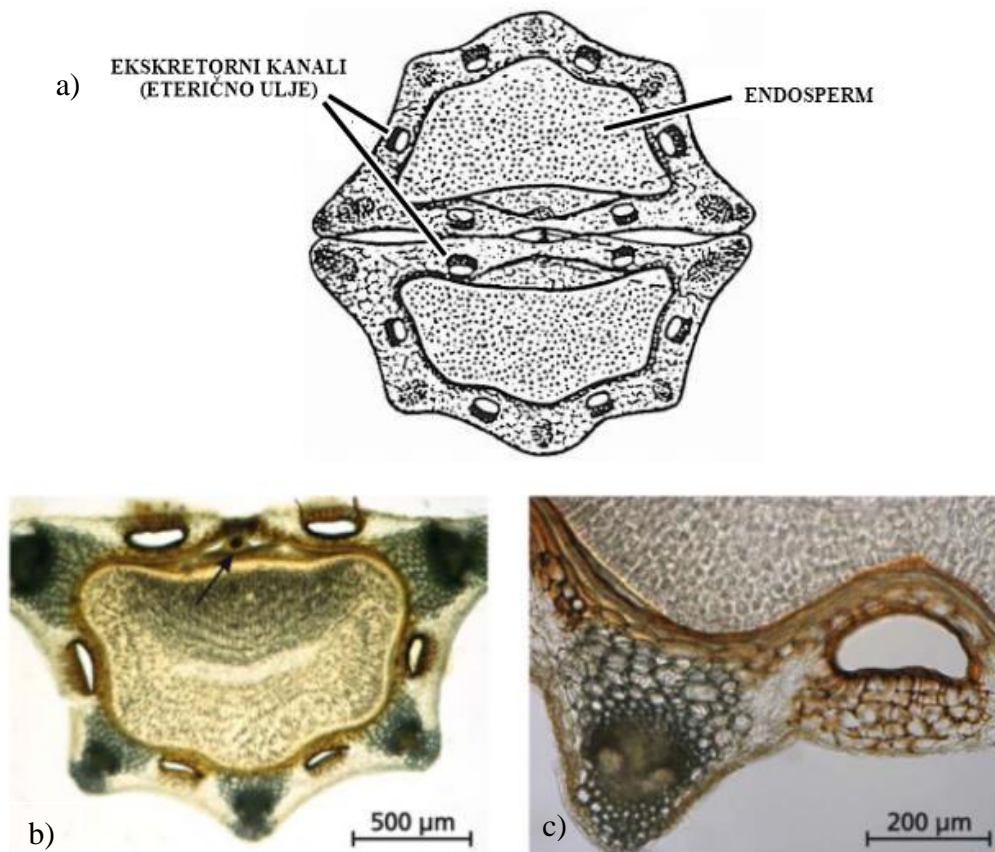
Komorač je izrazito poznat po svom eteričnom ulju (Badgujar i sur., 2014). Njegove sjemenke predstavljaju šizokarp sastavljen od dva jednosjemena merikarpa (slika 2a) (Pistelli i sur., 2018). Eterično ulje nastaje u ekskretornim kanalima (slika 2b i 2c) koji se nalaze u najudaljenijem sloju tkiva (tzv. perikarpu), ali isto tako kapljice ulja mogu biti lokalizirane i u endospermu (Strehle i sur., 2004).

Sjemenke gorkog komorača sadrže najmanje 40 ml kg<sup>-1</sup>, odnosno 0,6-6 % eteričnog ulja (Malhotra, 2012; Rahfeld, 2009). U njemu je zabilježeno do 87 hlapljivih spojeva, a glavni spojevi ekstrahiranog ulja su *trans*-anetol (50-60 %) i fenhon (15-20 %) (Badgujar i sur., 2014;



Malhotra, 2012; Rahfeld, 2009). Mimica-Dukić i sur. (2003) kao glavne spojeve naveli su *trans*-anetol (72,27-74,18 %), fenhon (11,32-16,35 %) i estragol (3,78-5,29 %).

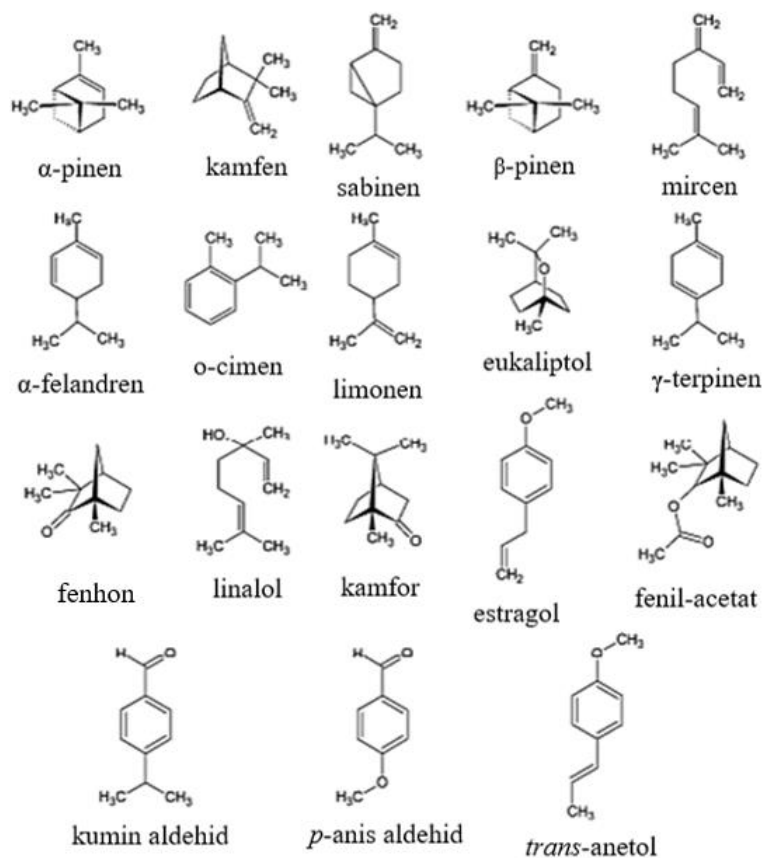
Međutim, kemijski sastav eteričnog ulja komorača može varirati što pretežno ovisi o genotipu i podrijetlu sjemenki, uvjetima uzgoja, ali i o tehnološkom postupku njegove izolacije iz sjemenki (Strehle i sur., 2004). Isto tako, postoje značajne varijacije u sastavu s obzirom na stupanj zrelosti ploda. Najniže koncentracije *trans*-anetola, *cis*-anetola i fenhona određene su u nezrelim plodovima i srednje zrelih plodovima, dok su najviše koncentracije istih spojeva imali zreli plodovi. S druge strane, udio spojeva poput sabinena, limonena i  $\alpha$ -pinena bio je najviši u nezrelim sjemenkama, a najniži u njihovoj zreloj fazi (Anwar i sur., 2009).



**Slika 2.** Shematski (a) i mikroskopski prikaz prezeza sjemenke gorkog komorača (b) i kanalića s eteričnim uljem (c) (prema Rumpel i Pope, 1993; Rahfeld, 2009)

Prema Shahat i sur. (2011), eterično ulje komorača sadrži 18 glavnih spojeva čija su imena i kemijska struktura prikazani na slici 3. Napoli i sur. (2010) u eteričnom su ulju identificirali 78 spojeva podijeljenih u 5 skupina: monoterpeneske ugljikovodike, oksidirane monoterpenes, seskviterpenes, fenilpropanoide te ostale spojeve. Najveći udio ulja činila je skupina fenilpropanoida s estragolom kao glavnim spojem koji se kretao u rasponu od 34-89 %. Glavni

oksidirani monoterpen bio je fenhon (2-27%), a od monoterpenskih ugljikovodika u najvišim su koncentracijama izolirani  $\alpha$ -pinen, limonen i  $\gamma$ -terpinen. Najmanje zastupljene skupine spojeva bile su seskviterpeni i ostali spojevi (Napoli i sur., 2010).



**Slika 3.** Kemijska struktura hlapljivih spojeva eteričnog ulja sjemenki komorača (Shahat i sur., 2011)

Rezultati raznih studija pokazali su kako eterično ulje komorača pokazuje antioksidativna i antimikrobna svojstva. Ono djeluje protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, s time da veći učinak ima na gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* nego na gram-negativne bakterije *Escherichia coli*. Pokazalo se i da viša koncentracija ulja dovodi do većeg promjera zone inhibicije (Saber i Eshra, 2019). Snažna antimikrobna svojstva protiv bakterija, kvasaca i parazita pripisuju se *trans*-anetolu (Dash, 2021; Mimica-Dukić i sur., 2003), dok su za aromatičan okus prehrambenih proizvoda zaslužni anetol, estragol i limonen (Saber i Eshra, 2019). Osim toga, dodatak eteričnog ulja komorača hrani može utjecati na smanjenje brzine oksidacije, a da pri tome nema utjecaja na promjenu boje i teksture proizvoda (Saber i Eshra, 2019). Zbog toga bi proizvodnja ovog ulja te izolacija bioaktivnih komponenti iz sjemenki

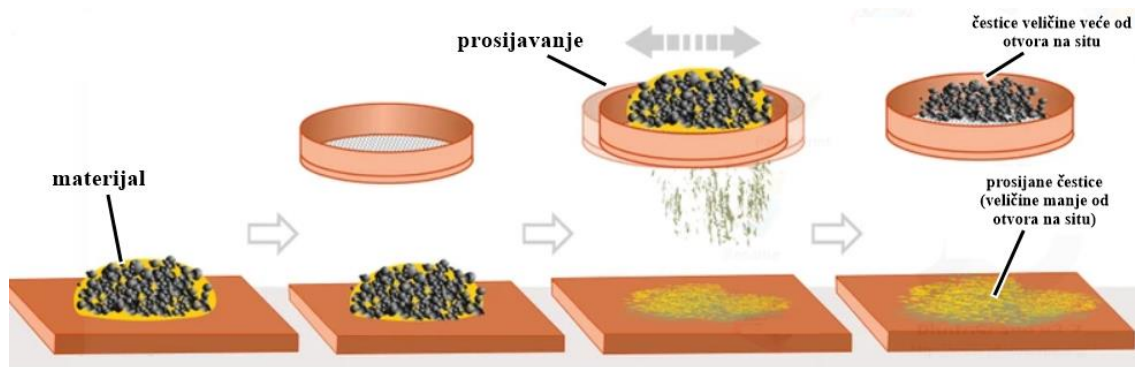
komorača mogla predstavljati potencijalni prirodni konzervans za hranu. Također, radi antioksidativnih svojstva i mogućnosti uklanjanja slobodnih radikala, komorač se može razmatrati i kao funkcionalna hrana (Anwar i sur., 2009). Eterično ulje sjemenki može imati i antitrombocitno, hepatoprotektivno i estrogenu djelovanje, a iz tog se razloga može koristiti i za proizvodnju farmaceutskih pripravaka (Badgubar i sur., 2014).

## **2.6. METODE ODREĐIVANJA VELIČINE ČESTICA**

Veličina čestica je parametar koji ima dimenziju duljine. Postupku određivanja veličine čestica uglavnom prethodi postupak frakcioniranja odnosno razvrstavanja čestica u različite skupine ovisno o njihovoj veličini. Najčešće korištene metode za dobivanje frakcija su prosijavanje i sedimentacija, dok se suvremenije metode određivanja veličine čestica temelje na laserskoj difrakciji, analizi slike, granulometrijskoj analizi te aerodinamičnoj analizi veličine čestica (Allen, 1997; Black i Day, 1965).

### **2.6.1. Metoda prosijavanja**

Ručno prosijavanje (slika 4) jedna je od najstarijih i najčešćih metoda određivanja veličine čestica. Koristi se kao standard po kojem se ocjenjuje točnost drugih metoda. Postupak započinje stavljanjem materijala u sito čija količina ne smije pretrpati to sito (Washington, 1992). Sito se zatim može tresti u vertikalnom ili horizontalnom smjeru kako bi došlo do prolaska materijala kroz mrežicu sita (Kaye, 1999). Nakon toga, materijal se prenosi u drugo sito i postupak se ponavlja u svrhu dobivanja frakcija. Ekvivalentni promjer sita može se definirati kao veličina čestice koja će proći kroz mrežicu nekog sita (Washington, 1992). Iako je metoda vrlo jednostavna te ne zahtijeva korištenje skupocjene opreme, ipak ima neka ograničenja. Postoje sita s četvrtastom mrežicom i okruglim otvorima, a nerijetko su ti otvori na sitima nejednakih veličina. Zbog toga postoji vjerojatnost da čestice nepravilnog oblika imaju ograničenu mogućnost prolaska kroz sito. Na primjer, čestica kuglastog oblika od 100  $\mu\text{m}$  proći će kroz sita s okruglim i četvrtastim oćicama čiji je promjer 100  $\mu\text{m}$ , dok čestica od 100  $\mu\text{m}$  nepravilnog oblika može proći samo kroz jedno od ta dva sita (Washington, 1992; Black i Day, 1965). Još jedan od nedostataka ove metode jest mogućnost pojave aglomerata koji ulaze u otvore sita te onemogućavaju prolazak čestica manjeg promjera (Kaye, 1999).



**Slika 4.** Ručno prosijavanje materijala u svrhu dobivanja frakcija (Anonymous 1)

### 2.6.2. Metoda raspršivanja laserskog svjetla

Osim tradicionalnih metoda određivanja veličine čestica, razvijaju se i suvremenije tehnike za industrijsku primjenu. Među takvim novijim metodama jest i metoda laserskog raspršivanja svjetlosti koja počinje zamjenjivati konvencionalnu metodu sedimentacije (Fisher i sur., 2017). Ova se metoda zasniva na laserskoj difrakciji prilikom koje čestice, prolazeći kroz lasersku zraku, raspršuju svjetlost pod kutem koji je obrnuto proporcionalan veličini čestica. Dakle, veće čestice proizvest će manji kut raspršenja dok će manje čestice proizvesti veći kut raspršenja (Galacgac i Ooi, 2018).

Jedan od uređaja zasnovan na ovoj metodi jest Malvern Panalytical Mastersizer 2000 (slika 5). Uređaj se sastoji od optičkog instrumenta, jedinice za dispergiranje uzoraka Scirocco te računala sa odgovarajućim programskim paketom (Stojanović i sur., 2010). Mjerenje na takvom uređaju obuhvaća snimanje snopa svjetlosti koji se odvaja od čestica, a potom se vraća u detektor. Rezultati se izračunavaju odabirom jednog od algoritama i odgovarajuće teorije (Mieove teorije raspršenja ili Fraunhoferove difrakcijske teorije) (Ryžak i Bieganowski, 2011).

Neke od prednosti primjene ove metode su vrlo kratko vrijeme analize, širok raspon frakcija, ponovljivost te mala količina potrošenog uzorka, dok je jedan od glavnih nedostataka visoka cijena instrumenta za analizu (Eshel i sur., 2004).



**Slika 5.** Uređaj za određivanje veličine čestica Malvern Panalytical Mastersizer 2000  
(Anonymous 2)

## **2.7. IZOLACIJA ETERIČNIH ULJA**

Izolacija, koncentriranje i pročišćavanje eteričnih ulja jedni su od važnijih tehnoloških procesa današnjice zbog sve šire primjene tih ulja (Luque de Castro i sur., 1999). Za njihovu izolaciju mogu služiti različiti dijelovi biljaka poput plodova, kore, lišća i cvjetova. Ovisno o vrsti, kvaliteti i količini eteričnog ulja u njima, biljne sirovine mogu se obrađivati u svježem obliku, poluosušene ili osušene. Dakako, važno je uzeti u obzir i promjene koje mogu nastati sušenjem biljnog materijala te koje u konačnici mogu utjecati na kvalitetu i kemijski sastav tog ulja. Prinos eteričnog ulja najviše ovisi o uvjetima i načinu berbe, transportu te biološkoj zrelosti. Odabir metode za izolaciju ovisit će o vrsti biljnog materijala, ali i o svojstvima ulja koja želimo dobiti (Kalodera i sur., 1998). Uobičajene metode koje se uglavnom koriste za izolaciju temelje se na prešanju, destilaciji i ekstrakciji otapalom (Zhang i sur., 2018). Najpopularnije konvencionalne metode su vodena i parna destilacija, maceracija te perkolacija. Međutim, danas se sve više primjenjuju moderne i zelene metode u svrhu niže potrošnje otapala te kraćeg vremena ekstrakcije. Suvremene metode obuhvaćaju ekstrakciju superkritičnim fluidima, ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima, ubranu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku, ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, ekstrakciju potpomognuta enzimima i mnoge druge (Zhang i sur., 2018).

Općenito, ekstrakcija je prvi korak odvajanja željenih prirodnih produkata iz sirovine. Najraširenija metoda je ekstrakcija otapalom. Na nju uvelike utječu omjer otapala i krute tvari,

veličina čestica sirovine, svojstva otapala te temperatura i vrijeme same ekstrakcije. Smatra se da manja veličina čestica sirovine doprinosi boljem rezultatu ekstrakcije, a razlog tome je povećano prodiranje otapala i difuzija otopljenih tvari. Osim toga, visoka temperatura omogućava povećanu topljivost i difuziju čestica, ali previsoka temperatura može uzrokovati raspad termolabilnih komponenti. Isto tako, učinkovitost ekstrakcije raste s povećanjem njezine duljine trajanja u određenom vremenskom intervalu. Međutim, povećanje vremena ekstrakcije neće imati nikakvog utjecaja nakon što se uspostavi ravnoteža otopljenih tvari unutar i izvan materijala (Zhang i sur., 2018).

Ekstrakcija ulja jedan je od bitnijih čimbenika koji utječu na kvalitetu eteričnog ulja, a neodgovarajuća metoda može dovesti do promjene kemijskog sastava ulja, gubitka njegovih prirodnih karakteristika kao i gubitka bioaktivnih spojeva. Također, može doći i do promjene boje, pojave neugodnog okusa i mirisa ili određenih fizičkih promjena poput povećane viskoznosti (Tongnuanchan, i Benjakul, 2014). Zbog toga je potrebno odabrati najprikladniji materijal, metodu i uvjete ekstrakcije kako ne bi došlo do gubitaka biološki aktivnih spojeva te promjene kemijskog sastava i kvalitete ulja (Reyes-Jurado i sur., 2015).

### 2.7.1. Vodena destilacija

Vodena destilacija jedna je od najčešće korištenih konvencionalnih metoda ekstrakcije eteričnog ulja, a najpogodnija je za ekstrakciju ulja iz praškastog ili mljevenog biljnog materijala (Stratakos i Koidis, 2016; Rao i Pandey, 2007). Postupak obuhvaća zagrijavanje materijala potpuno uronjenog u vodu na temperaturama višim od vrelišta (slika 6). Prilikom toga dolazi do proizvodnje mješovitih plinova i isparavanja, a samim time do oslobađanja eteričnog ulja iz uljnih žlijezda u biljnome tkivu (Stratakos i Koidis, 2016; Sadgrove i Jones, 2015). Nastala vodena i uljna para se šire i skupljaju u kondenzatoru gdje se neizravno hlade vodom te se kondenziraju u dvije odvojene faze koje se ne miješaju. Jedna faza predstavlja eterično ulje, a druga hidrolat te se nakon kondenziranja gravitacijom dovode u separator gdje je najčešće uljna faza iznad hidrolata (Sadgrove i Jones, 2015). Proces destilacije može trajati od 1 - 10 h, a količina ekstrahiranog ulja ovisi o duljini trajanja destilacije, tlaku, temperaturi i vrsti biljnog materijala (Stratakos i Koidi, 2016). Isto tako, ulje ekstrahirano ovom metodom je tamnije boje te ima puno jače mirisne note nego ulja dobivena nekim drugim metodama (Tandon, 2008).

Mimica-Dukić i sur. (2003) istražili su utjecaj vodene destilacije na ekstrakciju eteričnog ulja sjemenki komorača pri različitim uvjetima. Iz dobivenih su rezultata zaključili da omjer materijala i vode nije imao signifikantan utjecaj na sastav ulja. Međutim, ono što je uvelike utjecalo na kvantitativni i kvalitativni sastav jest dulje vrijeme destilacije, koje je ujedno utjecalo i na povećanje antifungalne aktivnosti ulja protiv nekih gljivica. No, došlo je do gubitka određenih spojeva iz skupine monoterpena i oksidiranih monoterpena. S druge strane, Hammouda i sur. (2014) ispitivali su utjecaj tri različite metode ekstrakcije eteričnog ulja komorača. Najveći prinos ulja bio je postignut primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Također, ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima kao i superkritičnom fluidnom ekstrakcijom izolirana je viša koncentracija određenih spojeva poput fenhona. Međutim, vodenom destilacijom dobivena je najviša koncentracija limonena i pinena (Hammouda i sur., 2014).

Dakle, vodena se destilacija još uvijek najčešće koristi u svrhu dobivanja eteričnog ulja usprkos razvoju novih suvremenih metoda. Jedna od njezinih prednosti jest što ne uključuje korištenje kemijskih otapala. Učinkovita je za ekstrakciju eteričnog ulja iz začina i začinskog bilja iz kojih se takva ulja teško izoliraju. Također, pogodna je za izolaciju ulja koja su bogata spojevima netopljivim u vodi i termički stabilnim spojevima. S druge strane, produljeno vrijeme vrenja biljnog materijala u vodi može potaknuti hidrolizu estera, polimerizaciju aldehida ili gubitak hlapljivih spojeva osjetljivih na toplinu (Roohinejad i sur., 2017). Drugi nedostaci su dugo trajanje procesa kao i teška regulacija topline (Tandon, 2008).



**Slika 6.** Shematski prikaz vodene destilacije (prema Roohinejad i sur., 2017)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Sjemenke gorkog komorača

U svrhu provođenja eksperimentalnog dijela rada korištene su suhe sjemenke gorkog komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) nabavljene od tvrtke Agristar d.o.o. (Višnjevac, Hrvatska). Sjemenke su uzgojene u naselju Zelčin koje se nalazi u sastavu grada Valpova (Osječko-baranjska županija), a njihova sjetva obavljena je žitnom sijačicom u ožujku 2020. godine. Agrotehničke mjere koje su provedene prilikom uzgoja sjemenki bile su: oranje, predsjetvena priprema (tanjuranje i roto-drljanje), suzbijanje korova košenjem te žetva žitnim kombajnom koja se odvila 30. rujna 2020. godine. Sušenje sjemenki komorača provedeno je na podnim sušarama za kamilicu na način da je sušen sloj sjemenki debljine 30 cm pri temperaturi 42 °C te u vremenskom razdoblju od 20 h. Kao energent je korišten plin. Neposredno prije izvođenja eksperimenta, sjemenke komorača usitnjene su pomoću električnog mlinca te se tako dobiveni uzorak koristio za prosijavanje i ekstrakciju eteričnog ulja.

##### 3.1.2. Kemikalije i standardi

- 96 %-tni etanol (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Bezvodni natrijev hidrogensulfat (Lach-Ner, d.o.o, Neratovice, Češka)
- Destilirana voda
- Interni standard, nerol,  $c=10,6500 \text{ mg mL}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka)  
Priprema: Odvaži se 532,50 mg nerola u odmjernu tikvicu od 50 mL i zatim nadopuni *n*-heksanom do oznake.
- *n*-heksan, HPLC čistoće (Lach-Ner, d.o.o, Neratovice, Češka)
- Standardna smjesa C<sub>7</sub> – C<sub>30</sub> alkana (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)

##### 3.1.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga (OHAUS, Parsippany, SAD)
- Aparatura za izolaciju eteričnog ulja po Clevengeru (Europska Farmakopeja, 2008)
- Električni grijač (LabHEAT, Baden-Württemberg, Njemačka)
- Električni mlinac (Waring Commercial, Stamford, SAD)
- Menzure, volumena 5 i 100 mL



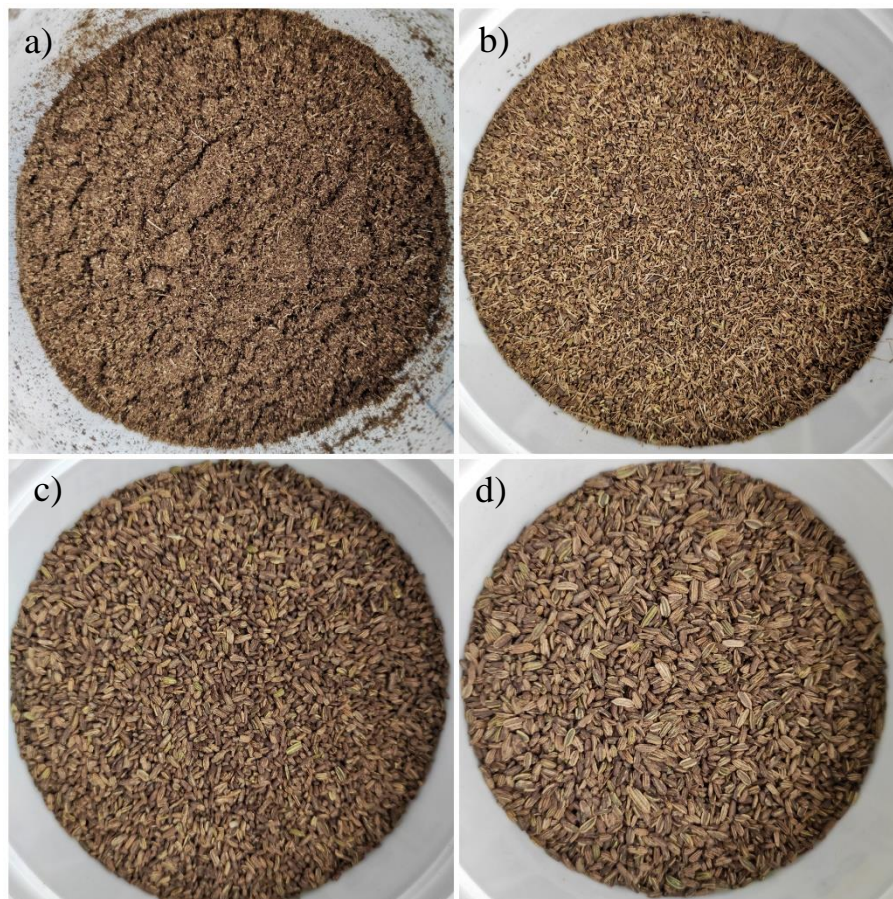
- Malvern Panalytical Mastersizer 2000 (Malvern Panalytical, Malvern, Velika Britanija) opremljen s:
  - računalni software Mastersizer 2000 (verzija 5.61)
- Uređaj za plinsku kromatografiju, Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) opremljen s:
  - maseni detektor tipa Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector
  - računalni software ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- Metalna špatula
- Metalna žličica za vaganje
- Mikropipete Eppendorf, volumena 10  $\mu$ L, 100  $\mu$ L i 1000  $\mu$ L
- Viala, volumena 1,5 mL (navoj N9, ravno dno, 11,6  $\times$  32 mm grad.)
- Plastični čep sa septom za vialu
- Plastične posude
- Sita, promjer očica 1,6 mm, 1 mm i 450  $\mu$ m
- Staklene čaše, volumena 100 i 250 mL
- Stakleni čep za tikvicu s okruglim dnom
- Stakleni lijevak
- Tikvice s okruglim dnom, volumena 250 i 500 mL

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Frakcioniranje uzorka prema veličini čestica

U svrhu frakcioniranja prema veličini čestica, odvagano je otprilike 500 g sjemenki gorkog komorača, a nakon toga iste su samljevene u električnom mlincu. S obzirom na veličinu čestica uzorka, prije samog početka bilo je potrebno odabrati sita odgovarajućih veličina. Postupak se izvodi ručno, višekratnim prosijavanjem kroz sita čiji je promjer očica bio 1,6 mm, 1 mm te 0,45 mm, a započinje tako da se usitnjene sjemenke istresu na sito s najvećim promjerom očica (1,6 mm). Materijal koji je zaostao na situ nakon prosijavanja predstavljao je uzorak čestica veličine >1,6 mm (slika 7d), a čestice koje su prošle kroz to sito prosijavane su kroz sito manjeg promjera očica (1 mm). Zatim su sjemenke zaostale na manjem situ predstavljale uzorak čestica veličine 1-1,6 mm (slika 7c), dok je ostatak čestica opet prosijavan kroz sito manjeg promjera očica (0,45 mm). Na kraju, sjemenke zaostale na situ s najmanjim promjerom očica predstavljale su uzorak čestica veličine 0,45-1 mm (slika 7b), a čestice koje su prošle kroz

mrežicu tog sita predstavljale su uzorak veličine  $<0,45$  mm (slika 7a). Dakle, ovim postupkom dobivene su četiri frakcije sjemenki različite veličine čestica:  $<0,45$  mm,  $0,45-1$  mm,  $1-1,6$  mm te  $>1,6$  mm.



**Slika 7.** Frakcije sjemenki komorača (a)  $<0,45$  mm, (b)  $0,45-1$  mm, (c)  $1-1,6$  mm i (d)  $>1,6$  mm dobivene ručnim prosijavanjem (vlastita fotografija)

### 3.2.2. Određivanje veličine čestica

Veličina čestica četiri frakcije sjemenki komorača analizirana je laserskom difrakcijom na uređaju Malvern Panalytical Mastersizer 2000 (Malvern Panalytical, Malvern, UK). Mjerenje veličine čestica na ovom uređaju temelji se na metodi raspršivanja laserskog svjetla u području od 20 nm do 2 mm te obradom rezultata pomoću software-a Mastersizer 2000 (verzija 5.61), a provodi se pomoću suhe (Sciocco) disperzijske jedinice. Prije početka mjerenja, metalnom žličicom uzme se potrebna količina sjemenki i stavi se u kadu unutar mjerne ćelije, a nakon toga pokreće se programski paket. Mjerenje je odrađeno u dva ponavljanja za svaku frakciju nakon čega je izračunata srednja vrijednost.

### 3.2.3. Vodena destilacija

Izolacija eteričnog ulja iz sjemenki komorača postupkom vodene destilacije izvedena je u aparaturi po Clevengeru (slika 8). Uvjeti koji su prilikom destilacije bili varirani su veličina čestica i vrijeme destilacije, čime je dobiveno 12 uzoraka (tablica 1). Prema prethodno definiranim optimalnim uvjetima destilacije sjemenki komorača za dobivanje maksimalnog prinosa eteričnog ulja omjer biljnog materijala i vode iznosio je 1:10 (Tonković, 2021). Pomoću analitičke vage odvažuje se 20 g svake frakcije sjemenki te se one kvantitativno prenese u tikvicu s okruglim dnom volumena 500 mL. Zatim se u tikvicu s uzorkom doda 200 mL destilirane vode. Sadržaj tikvice se promiješa te se tikvica postavi u električni grijač, a na nju se vertikalno složi aparatura po Clevengeru u koju je dodana destilirana voda. Nakon sastavljanja aparature, uključen je odgovarajući protok vode, a tikvica se kontinuirano zagrijava.



**Slika 8.** Aparatura po Clevengeru (vlastita fotografija)

Vrijeme destilacije mjeri se od trenutka kada se prva kap destilata kondenzira u vodenom hladilu. Tijekom procesa, hlapljivi spojevi zajedno s vodenom parom uzdižu se kroz cijevi do hladila gdje se kondenziraju i potom se sakupljaju u središnjem dijelu aparature. Nakon isteka

vremena destilacija, tikvica se odvoji od aparature, a nakon hlađenja (otprilike 20 min) očita se volumen izdvojenog eteričnog ulja u graduiranom separatoru. Iz separatora se potom najprije ispusti hidrolat, a potom se eterično ulje sakupi u vijalu u koju se doda ~1 g bezvodnog natrijevog sulfata radi uklanjanja mogućih ostataka vode. Zatim se pipetom izdvoji eterično ulje u čistu vijalu te se ono skladišti pri -18 °C do provođenja analize hlapljivih spojeva. Nakon destilacije potrebno je isprati aparaturu na način da se provede destilacija etanola (96 %-tni), a potom destilirane vode. Postupak vodene destilacije proveden je u dva ponavljanja za svaki uzorak.

**Tablica 1.** Plan eksperimenta i popis uzoraka

<b>ŠIFRA UZORKA</b>	<b>VELIČINA ČESTICA (mm)</b>	<b>VRIJEME DESTILACIJE (min)</b>
<b>A40</b>	<0,45	40
<b>A80</b>	<0,45	80
<b>A120</b>	<0,45	120
<b>B40</b>	0,45-1	40
<b>B80</b>	0,45-1	80
<b>B120</b>	0,45-1	120
<b>C40</b>	1-1,6	40
<b>C80</b>	1-1,6	80
<b>C120</b>	1-1,6	120
<b>D40</b>	>1,6	40
<b>D80</b>	>1,6	80
<b>D120</b>	>1,6	120

### 3.2.4. Određivanje prinosa eteričnog ulja

Prinos eteričnog ulja računa se prema jednadžbi [1]:

$$\text{prinos (\%)} = \frac{V_{(\text{eteričnog ulja})}}{m_{(\text{uzorka})}} \times 100$$

[1]

gdje je:

V (eteričnog ulja) = volumen eteričnog ulja (mL)

m (uzorka) = masa usitnjenih sjemenki komorača (g)

### 3.2.5. Analiza hlapljivih spojeva

*Princip metode:*

Analiza hlapljivih spojeva provedena je primjenom plinske kromatografije uz masenu spektrometriju (GC-MS). Sastavnice eteričnog ulja se unutar plinskog kromatografa prevode u plinovito stanje nakon čega se raspodjeljuju između stacionarne i mobilne faze u koloni. Kroz kolonu se transportiraju pomoću inertnog plina, a kvalitativna analiza provodi se u masenom spektrometru.

*Priprema uzorka:*

U vialu se otpipetira 10  $\mu\text{L}$  eteričnog ulja, 100  $\mu\text{L}$  otopine internog standarda (nerol) i 890  $\mu\text{L}$  *n*-heksana.

*Postupak određivanja:*

Prethodno pripremljen uzorak ulja analizira se na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) s masenim detektorom tipa Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector (MS) (slika 9). Uvjeti kromatografske analize prikazani su u tablici 2.

**Tablica 2.** Uvjeti analize za određivanje hlapljivih spojeva na plinskom kromatografu

<b>Kolona</b>	kapilarna Agilent HP-5MS [(5%-fenil)-metilpolisiloksan; 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm]
<b>Volumen injektiranog uzorka</b>	1,0 μL
<b>Omjer razdjeljenja (eng. <i>split ratio</i>)</b>	100:1
<b>Plin nosioc</b>	helij
<b>Protok plina nosioca</b>	1 mL min <sup>-1</sup>
<b>Temperaturni program kolone</b>	početna temperatura 60 °C
	60 - 145 °C (3 °C min <sup>-1</sup> )
	145 - 250 °C (30 °C min <sup>-1</sup> )
	zadržavanje 3 min na maksimalnoj temperaturi (250 °C)
<b>Trajanje analize</b>	34,83 min
<b>Temperatura injektora</b>	250 °C
<b>Temperatura premosnice</b>	280 °C
<b>Temperatura MS izvora</b>	230 °C
<b>Temperatura kvadripola</b>	150 °C
<b>Energija elektrona za ionizaciju molekula uzoraka</b>	70 eV
<b>Način rada</b>	praćenje odabranih iona (eng. <i>selected ion monitoring</i> , SIM)
<b>Brzina očitavanja (maseni spektrometar)</b>	1 očitavanje s <sup>-1</sup> (scan s <sup>-1</sup> )
<b>Opseg razdvajanja mase i naboja (<i>m/z</i>) (maseni spektrometar)</b>	30 – 550



**Slika 9.** Plinski kromatograf Agilent Technologies 6890N Network GC System s masenim detektorom tipa 5973 *inert* Mass Selective Detector (Medved i Tonković, 2020)

### *Identifikacija i kvantifikacija hlapljivih spojeva:*

Identifikacija hlapljivih spojeva se provodi usporedbom retencijskih vremena i masenih spektara ( $m/z$ ) ispitivanih spojeva s retencijskim vremenima i masenim spektrom komercijalnih standarada kao i usporedbom dobivenih masenih spektara s onima u NIST bazi podataka uz pomoć softvera MSD ChemStation Data Analysis. Za potvrdu identificiranih spojeva dodatno se izračunava njihov retencijski indeks koji se uspoređi s dostupnim podacima u literaturi. Da bi se izračunao retencijski indeks izdvojenih hlapljivih spojeva, potrebno je pripremiti standardnu smjesu C<sub>7</sub> – C<sub>30</sub> alkana i analizirati ju pod istim kromatografskim uvjetima kao i uzorke. Za pojedinačne hlapljive spojeve kvantitativne vrijednosti izračunavaju se iz jednadžbi baždarnih pravaca standardnih spojeva (tablica 3) pri čemu se u obzir uzima faktor razrjeđenja (FR=100), a spojevi za koje nisu dostupni standardi kvantificiraju se preko spoja najsličnije kemijske strukture iz iste kemijske skupine spojeva.

**Tablica 3.** Jednadžbe baždarnih pravaca za hlapljive spojeve eteričnog ulja sjemenki komorača

Spoj	Jednadžba baždarnog pravca	R <sup>2</sup>
$\alpha$ -pinen	$y = 1,4289x + 0,0277$	0,999
kamfen	$y = 0,5818x - 0,0023$	0,998
$\beta$ -pinen	$y = 2,4216x - 0,0104$	0,998
mircen	$y = 0,784x - 0,0169$	0,996
$\alpha$ -felandren	$y = 3,0566x - 0,0485$	0,999
3-karen	$y = 2,05x - 0,0075$	0,999
$\alpha$ -terpinen	$y = 0,436x - 0,0005$	0,998
<i>p</i> -cimen	$y = 5,5476x - 0,0472$	0,999
limonen	$y = 1,2779x - 0,0094$	1,000
eukaliptol	$y = 0,5776x - 0,0018$	0,998
$\gamma$ -terpinen	$y = 2,0663x - 0,0247$	0,998
fenhon	$y = 2,5055x + 0,0883$	0,999
kamfor	$y = 1,3539x - 0,0054$	0,998
estragol	$y = 2,3108x + 0,0337$	0,998
karvon	$y = 1,5493x - 0,0162$	0,998
<i>p</i> -anisaldehyd	$y = 1,0737x - 0,0397$	0,998
<i>trans</i> -anetol	$y = 2,4576x + 0,9618$	0,999

Analitička mjerenja provode se u tri paralelna određivanja, a rezultati analize izražavaju se kao mg mL<sup>-1</sup> eteričnog ulja.

### 3.2.6. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav XLSTAT 2021.23.2.1141.0 (Addisoft, Pariz, Francuska). Eksperimenti su dizajnirani kao puni faktorijalni dizajn na tri (vrijeme destilacije) odnosno četiri razine (veličina čestica sjemenki komorača). S ciljem optimiranja izolacije eteričnog ulja sjemenki komorača postupkom vodene destilacije ispitan je utjecaj veličine čestica sjemenki komorača i vrijeme destilacije na prinos i



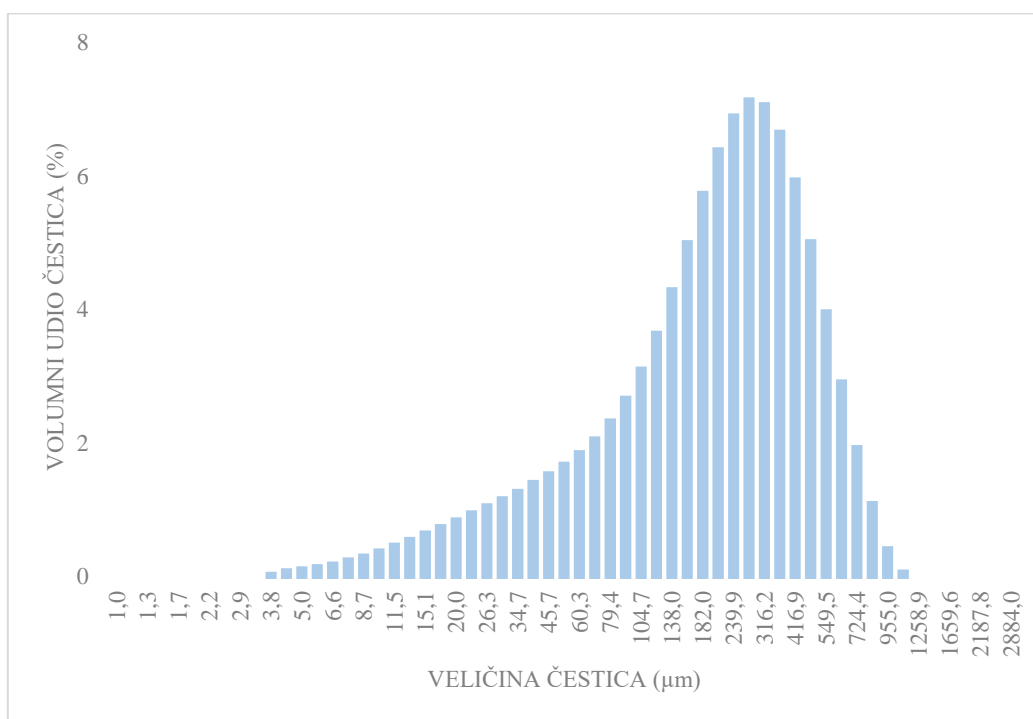
sastav eteričnog ulja. Za usporedbu uzoraka korištena je multifaktorska analiza varijance (MANOVA), a svi marginalni prosjeci uspoređeni su s Tukey HSD testom. Statistički značajna razlika razmatrana je na razini  $p \leq 0,05$  (95 %-tni interval pouzdanosti).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

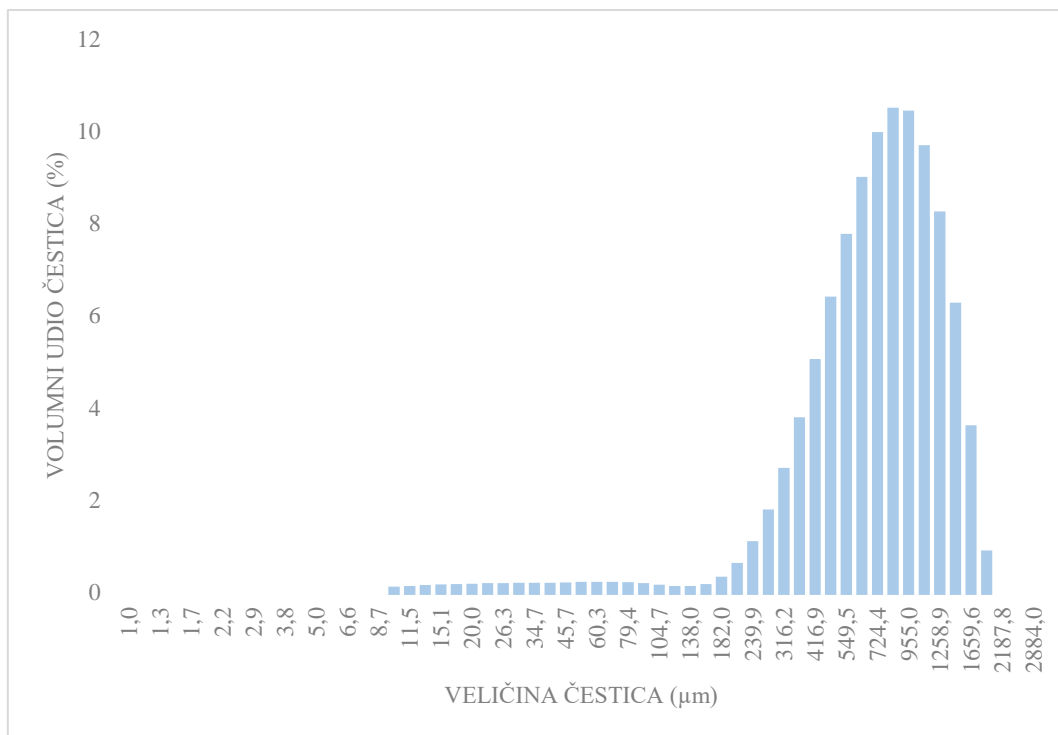
Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj veličine čestica i vremena destilacije na izolaciju eteričnog ulja sjemenki komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) postupkom vodene destilacije. Prije provođenja destilacije, usitnjene sjemenke prosijane su kroz sita različitih promjera očica te su dobivene 4 frakcije: (A) <0,45 mm, (B) 0,45-1 mm, (C) 1-1,6 mm i (D) >1,6 mm. Dodatno, mjerenje veličine čestica frakcija provedeno je na uređaju Malvern Panalytical Mastersizer 2000. Izolacijom eteričnog ulja primjenom vodene destilacije te variranjem parametara (veličine čestica i vremena destilacije) dobiveno je 12 uzoraka eteričnog ulja sjemenki komorača. Za svaki je uzorak određen prinos eteričnog ulja te je analiziran njegov kemijski sastav primjenom GC-MS analize. Na kraju, statističkom analizom ispitane su razlike između uzoraka te utjecaj veličine čestica samljevenih sjemenki komorača i vremena destilacije na prinos i sastav eteričnog ulja.

### 4.1. VELIČINA ČESTICA

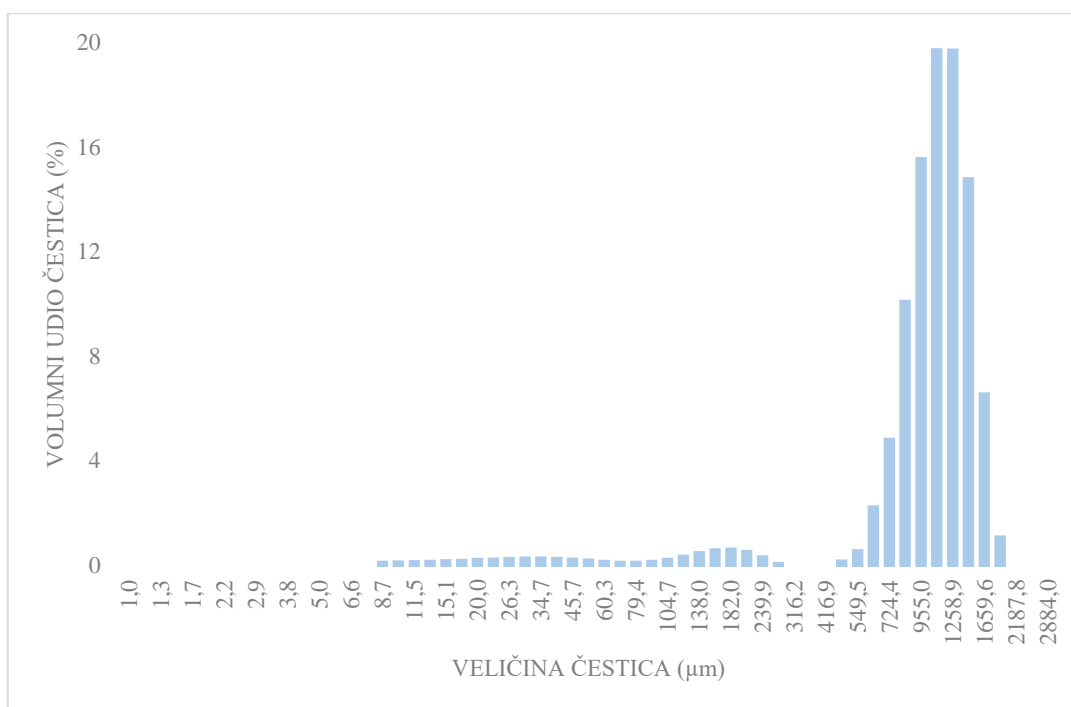
Prije provedbe vodene destilacije, postupkom laserske difrakcije izmjerena je veličina čestica četiri frakcije dobivenih konvencionalnom metodom prosijavanja kroz sita. Rezultati su prikazani na slikama 10, 11, 12 i 13.



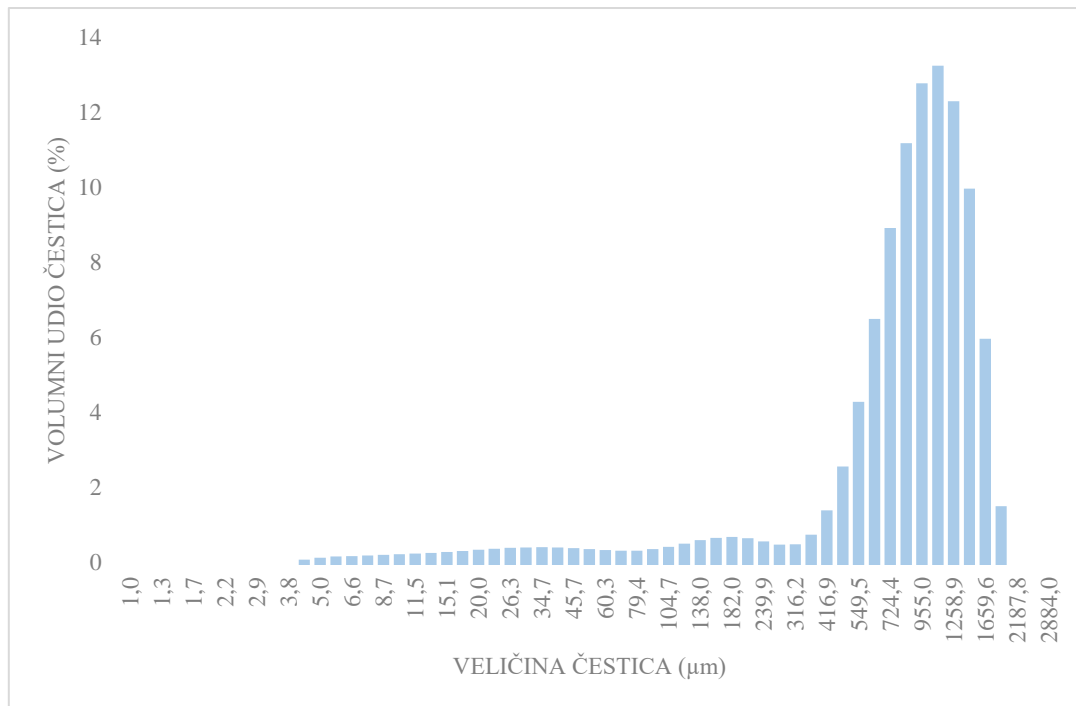
**Slika 10.** Distribucija veličine čestica usitnjenih sjemenki komorača u frakciji A (<0,45 mm)



**Slika 11.** Distribucija veličine čestica usitnjenih sjemenki komorača u frakciji B (0,45-1 mm)



**Slika 12.** Distribucija veličine čestica usitnjenih sjemenki komorača u frakciji C (1-1,6 mm)



**Slika 13.** Distribucija veličine čestica usitnjenih sjemenki komorača u frakciji D (>1,6 mm)

Prva frakcija (A) predstavljala je sjemenke veličine čestica <0,45 mm (slika 10) iako je njihova stvarna veličina bila u rasponu od 3,8 do 1095,5 μm. Srednja vrijednost veličine 50 % čestica te frakcije,  $d(0,5)$ , iznosila je 235,5 μm. Distribucija veličine čestica za frakciju B (0,45-1 mm) prikazana je na slici 11. Izmjereni raspon tog uzorka bio je od 10,0 do 1905,5 μm, dok je srednja vrijednost,  $d(0,5)$ , iznosila 824,5 μm. Na slici 12 vidljivo je da se veličina čestica frakcije C (1-1,6 mm) kretala između 8,7 i 1905,5 μm, ali 50 % čestica bilo je veličine 1192,0 μm. Zadnja frakcija, D (>1,6 mm), imala je raspon veličine čestica od 4,4 do 1905,5 μm (slika 13). Međutim, srednja vrijednost veličine 50 % čestica iznosila je 1013,7 μm, ali je 90 % čestica,  $d(0,9)$ , bilo veličine 1590,8 μm. Analiza laserskom difrakcijom dodatno je potvrdila veličinu čestica svake od frakcija dobivenih prosijavanjem kroz sita.

## 4.2. PRINOS ETERIČNOG ULJA

**Tablica 4.** Prinos eteričnog ulja sjemenki komorača

Uzorak	Veličina čestica (mm)	Vrijeme destilacije (min)	Prinos (%)
A40	<0,45	40	11,50±0,07
A80	<0,45	80	12,25±0,07
A120	<0,45	120	12,50±0,01
B40	0,45-1	40	3,85±0,09
B80	0,45-1	80	4,70±0,03
B120	0,45-1	120	4,90±0,06
C40	1-1,6	40	1,55±0,08
C80	1-1,6	80	1,85±0,07
C120	1-1,6	120	2,05±0,07
D40	>1,6	40	1,50±0,07
D80	>1,6	80	1,80±0,05
D120	>1,6	120	2,15±0,07
<b>Prosječna vrijednost</b>			<b>5,05±4,31</b>

*Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.*

U tablici 4 prikazani su rezultati prinosa eteričnog ulja sjemenki komorača (%) koji su određeni u rasponu od 1,50±0,07 do 12,50±0,01 %, dok je prosječna vrijednost iznosila 5,05±4,31 %. Najviši prinos eteričnog ulja (12,50±0,01 %) zabilježen je u uzorku A120 čija je veličina čestica bila najmanja (<0,45 mm), a vrijeme destilacije najdulje (120 min). Suprotno tome, najniži prinos ulja (1,50±0,07 %) dobiven je u uzorku D40 čija je veličina čestica bila najveća (>1,6 mm), a vrijeme destilacije najkraće (40 min).

Belabdelli i sur. (2020) postupkom su vodene destilacije u trajanju od 5 h izolirali 1,42 % eteričnog ulja iz samljevenih sjemenki, dok su Napoli i sur. (2010) sjemenke podvrgli vodenoj destilaciji u trajanju od 3 h te su u 56 uzoraka dobili 0,4 do 7,5 % eteričnog ulja.

Mimica-Dukić i sur. (2003) istraživali su utjecaj različitih uvjeta vodene destilacije na prinos i kemijski sastav eteričnog ulja. Njihovi rezultati potvrđuju da dulje vrijeme destilacije utječe na povećani prinos ulja jer su destilacijom samljevenih sjemenki u trajanju od 6 h dobili 2,82±0,23

% eteričnog ulja, dok je destilacija od 12 h rezultirala višim prinosom ulja ( $3,38 \pm 0,19$  %). Miguel i sur. (2010) također su dobili viši prinos ulja duljim vremenom destilacije. Tako su destilacijom cijelih sjemenki u trajanju od 30 min dobili 0,31 %, a destilacijom od 3 h 0,87 % eteričnog ulja. Međutim, velike su razlike u prinosu ulja dobivenom u ovome radu u usporedbi s rezultatima u literaturi, što se može pripisati različitoj veličini čestica sjemenki, vremenu destilacije i porijeklu sjemenki.

**Tablica 5.** Rezultati statističke analize utjecaja veličine čestica sjemenki komorača i vremena destilacije na prinos eteričnog ulja

Izvor varijacije	Prinos (%)
<b>Veličina čestica (mm)</b>	$p < 0,001^*$
<0,45	$12,08 \pm 0,06a$
0,45-1	$4,48 \pm 0,06b$
1-1,6	$1,82 \pm 0,06c$
>1,6	$1,83 \pm 0,06c$
<b>Vrijeme destilacije (min)</b>	$p < 0,001^*$
40	$4,61 \pm 0,05c$
80	$5,15 \pm 0,05b$
120	$5,40 \pm 0,05a$

*Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.*

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

Prinosi ulja dobiveni u sklopu ovog istraživanja statistički su se značajno razlikovali ovisno o veličini čestice i vremenu destilacije (tablica 5). Signifikantno najviše prosječne vrijednosti prinosa određene su u uzorcima veličine čestica <0,45 mm ( $12,08 \pm 0,06$  %), dok su najniže prosječne vrijednosti imali uzorci veličine čestica 1-1,6 mm te >1,6 mm ( $1,82 \pm 0,06$  te  $1,83 \pm 0,06$  %). Dulje vrijeme destilacije utjecalo je na viši prinos ulja pa je tako on najviši u uzorcima čija je destilacija trajala 120 min (prosječna vrijednost  $5,40 \pm 0,05$  %), a najniži prinosi dobiveni su destilacijom u trajanju od 40 min (prosječna vrijednost  $4,61 \pm 0,05$  %). Zaključak ovih rezultata jest da se viši prinos ulja postiže destilacijom sjemenki manje veličine čestica i duljim vremenom destilacije. Utvrđeno je da mljevenje biljnog materijala rezultira

učinkovitijom ekstrakcijom ulja kao i višim prinosom zbog povećane kontaktne površine između biljnog materijala i vode (Ilić i sur., 2020). Kako je eterično ulje lokalizirano u uljnim kanalima od kojih se njih 4 nalazi na dorzalnoj, a 2 na ventralnoj strani merikarpa (Khan i Musharaf, 2014), mljevenjem sjemenki dolazi do razbijanja staničnih stijenki čime ulje postaje dostupnije i vodena para efikasnije prodire do njega (Guenther i Althausen, 1948). Smallfield i sur. (2001) istraživali su utjecaj mljevenja i vremena destilacije na prinos eteričnog ulja sjemenki korijandera. Njihovi su rezultati potvrdili da višim stupnjem mljevenja dolazi do razbijanja većeg broja uljnih kanala čime se postiže viši prinos ulja. Također, Bernáth i sur. (1999) navode da veliki utjecaj na prinos ulja imaju i strukturne promjene koje se događaju tijekom razvoja merikarpa sjemenke komorača. Sadržaj ulja poprilično je visok u ranim fazama razvoja ploda što potvrđuje prinos od 11,59 % kojeg su dobili u svojem istraživanju. Međutim, sazrijevanjem i intenzivnim rastom volumena ploda dolazi do stiskanja stanične stijenke kao i do nakupljanja asimilata čime se povećava volumen endosperma, a smanjuje se površina uljnih kanala. Zbog toga se prinos ulja daljnjim dozrijevanjem sjemenki smanjuje pa je tako on iznosio 7,58 % za fazu voštanih plodova i 6,61 % za zrele plodove (Bernáth i sur., 1999). Prinos eteričnog ulja dodatno može ovisiti i o vremenu destilacije. S obzirom da su takva ulja lako hlapljiva, veća je vjerojatnost njihovog isparavanja duljim vremenom ekstrakcije (Akhiehiero i sur., 2013).

### **4.3. KEMIJSKI SASTAV ETERIČNOG ULJA**

#### **4.3.1. Zastupljenost hlapljivih spojeva po kemijskim skupinama**

Kemijski sastav eteričnog ulja sjemenki komorača analiziran je primjenom GC-MS analize. Identificirano je ukupno 18 hlapljivih spojeva ( $\alpha$ -pinen, kamfen, sabinen,  $\beta$ -pinen, mircen,  $\alpha$ -felandren,  $\alpha$ -terpinen, *p*-cimen, D-limonen,  $\gamma$ -terpinen, *cis*-sabinen hidrat, eukaliptol, L-fenhon, kamfor, karvon, estragol, *trans*-anetol i *p*-anisaldehid) koji su svrstani u 4 skupine kemijskih spojeva: monoterpene, oksidirane monoterpene, fenilpropanoide i aromatske aldehide. Zastupljenost hlapljivih spojeva po kemijskim skupinama kao i rezultati statističke analize utjecaja veličine čestica sjemenki komorača i vremena destilacije na zastupljenost hlapljivih spojeva po kemijskim skupinama prikazani su u tablicama 6 i 7.

**Tablica 6.** Zastupljenost hlapljivih spojeva po kemijskim skupinama u eteričnom ulju sjemenki komorača izoliranom postupkom vodene destilacije

Uzorak	Veličina čestica (mm)	Vrijeme destilacije (min)	Monoterpeni (%)	Oksidirani monoterpeni (%)	Fenilpropanoidi (%)	Aromatski aldehidi (%)
<b>A40</b>	<0,45	40	3,98±0,06	16,02±0,06	79,58±0,13	0,41±0,02
<b>A80</b>	<0,45	80	4,00±0,04	15,97±0,04	79,57±0,04	0,45±0,00
<b>A120</b>	<0,45	120	4,01±0,03	16,18±0,03	79,33±0,05	0,48±0,00
<b>B40</b>	0,45-1	40	2,69±0,01	16,68±0,04	80,22±0,04	0,41±0,00
<b>B80</b>	0,45-1	80	2,83±0,04	15,36±0,02	81,35±0,06	0,45±0,00
<b>B120</b>	0,45-1	120	2,91±0,03	14,88±0,05	81,76±0,06	0,45±0,01
<b>C40</b>	1-1,6	40	2,81±0,03	16,74±0,02	80,07±0,07	0,38±0,02
<b>C80</b>	1-1,6	80	2,91±0,04	15,91±0,04	80,77±0,06	0,41±0,02
<b>C120</b>	1-1,6	120	2,75±0,04	14,76±0,01	82,08±0,05	0,41±0,01
<b>D40</b>	>1,6	40	2,82±0,04	15,77±0,03	81,06±0,07	0,35±0,01
<b>D80</b>	>1,6	80	2,84±0,02	15,87±0,02	80,88±0,06	0,40±0,01
<b>D120</b>	>1,6	120	2,90±0,05	15,58±0,02	81,13±0,05	0,40±0,01
<b>Prosječna vrijednost</b>			<b>3,12±0,52</b>	<b>15,81±0,59</b>	<b>80,65±0,87</b>	<b>0,42±0,04</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.



**Tablica 7.** Rezultati statističke analize utjecaja veličine čestica sjemenki komorača i vremena destilacije na zastupljenost hlapljivih spojeva po kemijskim skupinama u eteričnom ulju sjemenki komorača izoliranom postupkom vodene destilacije

Izvor varijacije	Monoterpeni (%)	Oksidirani monoterpeni (%)	Fenilpropanoidi (%)	Aromatski aldehidi (%)
<b>Veličina čestica (mm)</b>	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*
<0,45	4,00±0,02a	16,06±0,15a	79,49±0,15b	0,45±0,00a
0,45-1	2,81±0,02b	15,64±0,15a	81,11±0,15a	0,44±0,00a
1-1,6	2,82±0,02b	15,80±0,15a	80,97±0,15a	0,40±0,00b
>1,6	2,85±0,02b	15,74±0,15a	81,02±0,15a	0,38±0,00c
<b>Vrijeme destilacije (min)</b>	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*
40	3,07±0,02b	16,30±0,13a	80,23±0,13b	0,39±0,00b
80	3,15±0,02a	15,78±0,13b	80,64±0,13ab	0,43±0,00a
120	3,14±0,02a	15,35±0,13b	81,07±0,13a	0,43±0,00a

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  $p \leq 0,05$ .

Daleko najviši udio u analiziranim uzorcima eteričnog ulja činili su fenilpropanoidi, s prosječnom vrijednosti od  $80,65 \pm 0,87$  %. Slijede ih oksidirani monoterpeni ( $15,81 \pm 0,59$  %) i monoterpeni ( $3,12 \pm 0,52$  %), dok su aromatski aldehidi prisutni u najnižem udjelu ( $0,42 \pm 0,04$  %) (tablica 6).

Udio najzastupljenije skupine, fenilpropanoida, kretao se u rasponu od  $79,33 \pm 0,05$  do  $82,08 \pm 0,05$  %. Najviši i najniži udio dobiveni su destilacijom u trajanju od 120 min. Međutim, najviši je udio dobiven u uzorku veličine čestica 1-1,6 mm (C120), dok je najniži udio zabilježen u uzorku čija je veličina čestica bila  $<0,45$  mm (A120). Također, u uzorcima veličine čestica 0,45-1 mm (frakcija B) i 1-1,6 mm (frakcija C) zabilježen je trend porasta udjela fenilpropanoida s duljim vremenom destilacije. Najviši i najniži udio oksidiranih monoterpena dobiveni su u uzorcima veličine čestica 1-1,6 mm, s time da je najviši udio ( $16,74 \pm 0,02$  %) dobiven destilacijom od 40 min, a najniži ( $14,76 \pm 0,01$  %) destilacijom od 120 min. Kod ove je skupine također zabilježen trend porasta udjela u frakcijama B i C. Međutim, u ovome slučaju udio raste primjenom kraćeg vremena destilacije. U skupinama monoterpena i aromatskih aldehida, najviši udjeli ( $4,01 \pm 0,03$  % za monoterpena i  $0,48 \pm 0,00$  za aromatske aldehide) zabilježeni su u uzorcima najmanje veličine čestica ( $<0,45$  mm) i najduljeg vremena destilacije (120 min). Najniži udio monoterpena ( $2,69 \pm 0,01$  %) bio je u uzorku čije je vrijeme destilacije bilo 40 min, a veličina čestica 0,45-1 mm (B40), dok je najniži udio aromatskih aldehida ( $0,35 \pm 0,01$  %) bio u uzorku D40 koji je imao najveću veličinu čestica ( $>1,6$  mm) te najkraće vrijeme destilacije (40 min). Trend porasta koncentracije primjenom duljeg vremena destilacije zabilježen je unutar svake od frakcija za aromatske aldehide, dok je kod monoterpena taj trend zabilježen u frakciji A (veličina čestica  $<0,45$  mm) i frakciji D (veličina čestica  $>1,6$  mm).

Mimica-Dukić i sur. (2003) pri različitim su uvjetima omjera biljnog materijala i vode te vremena destilacije u eteričnom ulju sjemenki komorača identificirali 76,05-79,47 % fenilpropanoida, 11,94-16,8 % oksidiranih monoterpena te 6,19-8,4 % monoterpena. Dulje vrijeme destilacije (12 h) rezultiralo je povećanjem udjela fenilpropanoida i monoterpena dok se udio oksidiranih monoterpena smanjio. Osim toga, došlo je i do promjena kemijskog sastava, gubitaka određenih spojeva iz skupina monoterpena i oksidiranih monoterpena, ali i do pojave dugolančanih ugljikovodika. U usporedbi s rezultatima ovog rada i prosječnim vrijednostima skupina spojeva, Mimica-Dukić i sur. (2003) dobili su viši udio monoterpena te nešto niži udio fenilpropanoida. Kemijski se sastav može razlikovati radi primjene različitog omjera biljnog materijala i vode, duljeg vremena destilacije te različite veličine čestica samljevenog uzorka.

Marotti i Piccaglia (1992) u svom su istraživanju ispitali utjecaj veličine čestica i uvjeta destilacije na kemijski sastav eteričnog ulja sjemenki komorača. Udio oksidiranih spojeva

povećavao se što je veličina čestica bila veća te je on iznosio 91,96 % za sjemenke samljevene u prah, 95,07 % za zgnječene sjemenke i 97,89 % za cijele sjemenke. Nasuprot tome, udio ugljikovodikovih spojeva povećavao se što je veličina čestica bila manja (1,82 % kod cijelih sjemenki, 4,8 % kod zgnječenih sjemenki te 7,55 % kod samljevenih sjemenki). Jednaki su rezultati dobiveni i u ovome radu gdje je udio oksidiranih spojeva (fenilpropanoida i oksidiranih monoterpena) viši što je veća veličina čestica, dok je udio monoterpena najviši pri najmanjoj veličini čestica (tablica 7).

Ispitivanjem utjecaja vremena destilacije (30 min, 1 h, 2 h i 3 h) na kemijski sastav sjemenki komorača, Miguel i sur. (2010) dobili su najviši udio fenilpropanoida (79,8-88,6 %), a slijede ih monoterpeni (7,8-15,9 %) te oksidirani monoterpeni (3,6-4,3 %). Vrijeme destilacije u trajanju od 30 min rezultiralo je najvišim udjelom fenilpropanoida u eteričnom ulju, dok se najniži udio dobio destilacijom od 2 h. Suprotno tome, udio monoterpena bio je najviši prilikom destilacije od 2 h, a najniži je udio zabilježen destilacijom u trajanju od 30 min. Također, udio oksidiranih monoterpena povećavao se duljim vremenom destilacije. U ovome su radu dobiveni drugačiji rezultati jer se udio fenilpropanoida povećavao, dok se udio oksidiranih monoterpena smanjivao duljim vremenom destilacije (tablica 7). Isto tako, u ovome je radu destilacijom od 120 min dobiveno  $81,07 \pm 0,13$  % fenilpropanoida,  $15,35 \pm 0,13$  % oksidiranih monoterpena te  $3,14 \pm 0,02$  % monoterpena (tablica 7). Pri jednakom vremenu destilacije, Miguel i sur. (2010) dobili su podjednak rezultat za fenilpropanoide (79,8 % fenilpropanoida), dok je udio monoterpena i oksidiranih monoterpena bio 15,9 i 4,2 %. Razlike u zastupljenosti pojedinih kemijskih skupina mogu se objasniti različitim varijetetima i porijeklom sjemenki kao i destilacijom cijelih odnosno samljevenih sjemenki.

Prema Kalleli i sur. (2019), najzastupljenija skupina spojeva eteričnog ulja sjemenki komorača dobivena vodenom destilacijom od 4 h bili su fenilpropanoidi (80,64-89,06 %). Slijede ih oksidirani monoterpeni (3,21-12,62 %) i monoterpeni (5,50-7,76 %). Također, kemijski sastav ovih ulja razlikuje se s obzirom na sortu sjemenki pa je tako udio monoterpena (6,8 %) viši od udjela oksidiranih monoterpena (3,21 %) u sjemenkama sorte Marseille, dok je kod sorte Villeneuve i tuniških sorti bio obrnuti slučaj gdje je udio oksidiranih monoterpena bio viši od udjela monoterpena. Isto tako, u sorti Marseille zabilježen je i najviši udio fenilpropanoida te najniži udio oksidiranih monoterpena. Jedan od razloga zbog kojeg se kemijski sastav ovih eteričnih ulja razlikuje jest taj da tuniške sorte sjemenki pripadaju vrsti *Foeniculum vulgare* var. *dulce* (slatki komorač), a francuske sorte *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* (gorki komorač). Iako nisu iste vrste, najbliži rezultati u usporedbi s ovim radom dobiveni su u uzorku porijeklom iz Korbe (slatki komorač) gdje je udio fenilpropanoida bio 80,64 %, oksidiranih

monoterpena 12,62 % te monoterpena 6,49 %. Razlike u kemijskom sastavu vrsta *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* koje su koristili Kalleli i sur. (2019) te one korištene u ovome radu mogu biti radi različitog geografskog porijekla i uvjeta kultivacije sorti te primjene različitog vremena destilacije.

Abdellaoui i sur. (2020) analizirali su eterično ulje sjemenki kultiviranog i samoniklog komorača dobiveno destilacijom vodenom parom u trajanju od 3 h. Kultivirani je komorač imao 82,54 % fenilpropanoide, 8,66 % oksidiranih monoterpena te 6,22 % monoterpena, dok je u samoniklom komoraču zabilježeno 87,92 % fenilpropanoide, 5,65 % oksidiranih monoterpena i 4,85 % monoterpena. Dakle, divlji je komorač imao viši udio fenilpropanoide u odnosu na kultivirani komorač koji je s druge strane imao viši udio monoterpena i oksidiranih monoterpena. U odnosu na rezultate ovog rada, udio fenilpropanoide izoliranih iz kultiviranog komorača približno je jednak. Međutim, udio monoterpena otprilike je dvostruko niži, a udio oksidiranih monoterpena otprilike dvostruko viši u ovome radu u usporedbi s rezultatima koje su dobili Abdellaoui i sur. (2020). Moguće razlike kemijskog sastava mogu biti zbog različitog geografskog porijekla sjemenki, primjene različitih metoda destilacije kao i vremenskog trajanja destilacije.

Ilić i sur. (2020) u eteričnom su ulju sjemenki, koje su nabavili u Novom Sadu, dobili znatno niži udio fenilpropanoide (67,57 % iz ulja samljevenih i 72,74 % iz ulja nesamljevenih sjemenki). Udio oksidiranih monoterpena u njihovom je istraživanju iznosio 23,1-23,64%, a udjeli monoterpena i aromatskih aldehida 2,68-6,82 % te 0,14-0,36 %. Prema tome, detektirali su viši udio monoterpena i oksidiranih monoterpena te niži udio aromatskih aldehida u usporedbi s rezultatima ovoga rada. Nadalje, mljevenje sjemenki imalo je signifikantan utjecaj na izolaciju monoterpena. Viši udio oksidiranih monoterpena također je zabilježen u ulju ekstrahiranom iz samljevenih sjemenki, dok je udio aromatskih aldehida kao i fenilpropanoide bio viši u ulju ekstrahiranom iz cijelih sjemenki. Razlike u udjelima u usporedbi s rezultatima u ovom radu moguće su zbog različitih varijeteta komorača, lokacije uzgoja i kultivacije biljke kao i različitog stupnja mljevenja sjemenki, veličine čestica i primjene duljeg vremena destilacije.

Veličina čestica i vrijeme destilacije imali su signifikantan utjecaj ( $p < 0,001$ ) na izolaciju pojedinih skupina spojeva (tablica 7). Najmanja veličina čestica rezultirala je izolacijom najvišeg udjela oksidiranih monoterpena ( $4,00 \pm 0,02$  %), monoterpena ( $16,06 \pm 0,15$  %) i aromatskih aldehida ( $0,45 \pm 0,00$  %). Iako su se najviši udjeli oksidiranih monoterpena dobili u uzorcima veličine čestica  $< 0,45$  mm, udjeli oksidiranih monoterpena u ostalim frakcijama nisu se značajno razlikovali. Za ekstrakciju najvišeg udjela fenilpropanoide, najveći je utjecaj imala

veličina čestica 0,45-1 mm ( $81,11 \pm 0,15$  %), dok je najniži udio od  $79,49 \pm 0,15$  % dobiven upravo kod čestica najmanje veličine ( $<0,45$  mm). Međutim, između frakcija B, C i D nisu zabilježene značajne razlike u udjelima fenilpropanoida. Također, kod fenilpropanoida zabilježen je trend povećanja udjela duljim vremenom destilacije pa je tako destilacijom od 120 min dobiven najviši udio fenilpropanoida ( $81,07 \pm 0,13$  %). Trend porasta koncentracije zabilježen je i kod skupine oksidiranih monoterpena, ali taj trend raste sa smanjenjem vremena destilacije. Stoga je najviši udio te skupine spojeva ( $16,30 \pm 0,13$  %) dobiven destilacijom od 40 min. Jednako najviši udjeli od  $0,43 \pm 0,00$  % dobiveni su u skupini aromatskih aldehida destilacijom od 80 i 120 min, dok su pri istim uvjetima vremena destilacije dobiveni i podjednaki udjeli monoterpena ( $3,15 \pm 0,02$  % za 80 min te  $3,14 \pm 0,02$  % za 120 min).

Zaključno, manja veličina čestica bila je efikasnija za izolaciju monoterpena ( $<0,45$  mm) i aromatskih aldehida ( $<0,45$  i  $0,45-1$  mm), dok se viši udio fenilpropanoida dobio u frakciji s većom veličinom čestica ( $>0,45$  mm). Iako je najviši udio oksidiranih monoterpena dobiven u uzorcima veličine čestica  $<0,45$  mm, udjeli u ostalim frakcijama bili su približno jednaki i nisu se statistički značajno razlikovali od dobivenog najvećeg udjela. Najkraće vrijeme destilacije (40 min) rezultiralo je izolacijom najvišeg udjela oksidiranih monoterpena, dok je najdulje vrijeme destilacije (120 min) bilo najefikasnije za izolaciju višeg udjela fenilpropanoida. Na ekstrakciju monoterpena i aromatskih aldehida, vrijeme destilacije od 80 i 120 min imalo je približno jednak utjecaj. Prema Roohinejad i sur. (2017), duljim vremenom destilacije dolazi do povećanja udjela fenilpropanoida te do nižeg stupnja razgradnje nekih monoterpena i oksidiranih monoterpena. Također, uljne komponente se najprije moraju otopiti u vodi da bi mogle ući u parnu fazu i na taj način biti destilirane. Zbog toga izolacija pojedinih komponenti neće ovisiti samo o temperaturi vrelišta, već i o njihovoj topljivosti u vodi (Smallfield i sur., 2001).

#### 4.3.2. Hlapljivi spojevi sjemenki komorača

Rezultati GC-MS analize sastava eteričnog ulja sjemenki komorača te koncentracije 18 identificiranih spojeva prikazane su u tablici 8. Statistička analiza utjecaja veličine čestica sjemenki komorača i vremena destilacije na koncentraciju pojedinih hlapljivih spojeva prikazana je u tablici 9.

**Tablica 8.** Rezultati GC-MS analize sastava eteričnog ulja sjemenki komorača izoliranog postupkom vodene destilacije

Uzorak	Veličina čestica (mm)	Vrijeme destilacije (min)	Monoterpeni (mg mL <sup>-1</sup> )										
			$\alpha$ -pinen	Kamfen	Sabinen	$\beta$ -pinen	Mircen	$\alpha$ -felandren	$\alpha$ -terpinen	<i>p</i> -cimen	D-limonen	$\gamma$ -terpinen	<i>cis</i> -sabinen hidrat
<b>A40</b>	<0,45	40	6,00±0,05	1,93±0,10	0,83±0,00	0,87±0,03	12,99±0,04	3,06±0,02	0,27±0,06	1,21±0,00	10,75±0,03	5,46±0,04	0,93±0,03
<b>A80</b>	<0,45	80	6,31±0,11	1,93±0,13	0,82±0,04	0,85±0,01	12,20±0,25	3,03±0,01	0,26±0,05	1,20±0,01	10,74±0,06	5,49±0,08	0,86±0,01
<b>A120</b>	<0,45	120	5,84±0,04	1,80±0,04	0,80±0,01	0,82±0,01	11,50±0,14	2,94±0,03	0,23±0,05	1,19±0,01	10,21±0,14	5,21±0,03	0,85±0,01
<b>B40</b>	0,45-1	40	3,46±0,11	1,30±0,06	0,63±0,02	0,71±0,01	8,14±0,09	2,51±0,01	0,13±0,03	1,21±0,00	7,69±0,06	4,28±0,03	1,00±0,02
<b>B80</b>	0,45-1	80	4,04±0,09	1,36±0,03	0,64±0,02	0,71±0,01	8,22±0,10	2,56±0,01	0,11±0,00	1,23±0,01	7,74±0,07	4,32±0,06	0,91±0,03
<b>B120</b>	0,45-1	120	5,10±0,16	1,51±0,08	0,67±0,02	0,76±0,01	9,03±0,10	2,69±0,02	0,19±0,09	1,29±0,00	8,45±0,16	4,77±0,03	0,93±0,03
<b>C40</b>	1-1,6	40	5,75±0,20	1,65±0,07	0,67±0,01	0,73±0,01	7,88±0,09	2,48±0,01	0,15±0,06	1,16±0,01	7,26±0,05	3,92±0,03	0,92±0,05
<b>C80</b>	1-1,6	80	5,37±0,01	1,62±0,02	0,64±0,02	0,69±0,01	7,20±0,10	2,39±0,01	0,15±0,03	1,12±0,01	6,28±0,10	3,55±0,01	0,78±0,03
<b>C120</b>	1-1,6	120	6,08±0,16	1,73±0,04	0,67±0,01	0,72±0,02	7,44±0,04	2,43±0,02	0,11±0,00	1,16±0,01	6,55±0,10	3,69±0,07	0,82±0,01
<b>D40</b>	>1,6	40	7,77±0,23	1,95±0,04	0,70±0,01	0,76±0,01	8,16±0,12	2,49±0,02	0,11±0,00	1,12±0,01	6,96±0,04	3,70±0,04	0,89±0,02
<b>D80</b>	>1,6	80	6,80±0,16	1,79±0,08	0,67±0,02	0,72±0,01	7,24±0,09	2,35±0,01	0,15±0,03	1,08±0,00	6,12±0,15	3,26±0,05	0,79±0,02
<b>D120</b>	>1,6	120	7,28±0,16	1,96±0,12	0,68±0,03	0,75±0,00	7,76±0,07	2,46±0,02	0,13±0,03	1,12±0,01	6,60±0,07	3,54±0,04	0,81±0,03
<b>Prosječna vrijednost</b>			<b>5,82±1,20</b>	<b>1,71±0,23</b>	<b>0,70±0,07</b>	<b>0,76±0,06</b>	<b>8,98±1,99</b>	<b>2,62±0,25</b>	<b>0,17±0,07</b>	<b>1,17±0,06</b>	<b>7,95±1,67</b>	<b>4,27±0,77</b>	<b>0,87±0,07</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.

**Tablica 8.** Rezultati GC-MS analize sastava eteričnog ulja sjemenki komorača izoliranog postupkom vodene destilacije (nastavak)

Uzorak	Veličina čestica (mm)	Vrijeme destilacije (min)	Oksidirani monoterpeni (mg mL <sup>-1</sup> )				Fenilpropanoidi (mg mL <sup>-1</sup> )		Aromatski aldehidi (mg mL <sup>-1</sup> )
			Eukaliptol	L-fenhon	Kamfor	Karvon	Estragol	Trans-anetol	<i>p</i> -anisaldehyd
<b>A40</b>	<0,45	40	0,96±0,05	172,01±2,64	4,35±0,01	1,10±0,03	30,13±0,51	856,02±17,37	4,59±0,22
<b>A80</b>	<0,45	80	0,85±0,04	168,23±0,63	4,18±0,04	1,11±0,03	29,09±0,19	839,55±2,38	4,94±0,05
<b>A120</b>	<0,45	120	0,82±0,04	161,16±1,68	3,91±0,08	1,07±0,01	27,05±0,48	791,33±8,76	4,92±0,04
<b>B40</b>	0,45-1	40	0,76±0,01	186,01±1,97	4,64±0,06	1,10±0,05	32,49±0,34	893,58±6,77	4,73±0,04
<b>B80</b>	0,45-1	80	0,73±0,02	166,65±2,14	4,14±0,09	1,10±0,03	31,00±0,33	883,36±12,90	5,10±0,03
<b>B120</b>	0,45-1	120	0,77±0,02	174,75±3,37	4,42±0,05	1,10±0,05	33,55±0,46	960,99±17,92	5,49±0,03
<b>C40</b>	1-1,6	40	0,70±0,08	187,63±3,39	4,80±0,08	1,09±0,04	33,31±0,45	895,44±17,19	4,40±0,17
<b>C80</b>	1-1,6	80	0,63±0,05	157,00±2,85	4,03±0,06	1,15±0,03	28,72±0,44	798,02±13,42	4,25±0,25
<b>C120</b>	1-1,6	120	0,62±0,07	162,65±3,83	4,13±0,07	1,11±0,02	32,46±0,57	904,61±21,37	4,70±0,01
<b>D40</b>	>1,6	40	0,73±0,03	187,08±4,33	4,81±0,06	1,12±0,01	34,21±0,55	961,84±23,66	4,32±0,04
<b>D80</b>	>1,6	80	0,71±0,04	167,13±3,57	4,15±0,13	1,09±0,02	29,50±0,81	852,48±19,60	4,41±0,02
<b>D120</b>	>1,6	120	0,73±0,04	171,87±4,66	4,30±0,12	1,14±0,02	31,82±0,81	895,29±23,46	4,53±0,00
<b>Prosječna vrijednost</b>			<b>0,75±0,10</b>	<b>171,85±10,35</b>	<b>4,32±0,29</b>	<b>1,11±0,03</b>	<b>31,11±2,20</b>	<b>877,71±54,18</b>	<b>4,70±0,37</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.

**Tablica 9.** Rezultati statističke analize utjecaja veličine čestica sjemenki komorača i vremena destilacije na koncentracije hlapljivih spojeva eteričnog ulja sjemenki komorača izoliranog postupkom vodene destilacije

Izvor varijacije	Monoterpeni (mg mL <sup>-1</sup> )										
	$\alpha$ -pinen	Kamfen	Sabinen	$\beta$ -pinen	Mircen	$\alpha$ -felandren	$\alpha$ -terpinen	<i>p</i> -cimen	D-limonen	$\gamma$ -terpinen	<i>cis</i> -sabinen hidrat
Veličina čestica (mm)	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*
<0,45	6,05±0,15b	1,89±0,03a	0,82±0,01a	0,85±0,01a	12,23±0,14a	3,01±0,02a	0,25±0,02a	1,20±0,01b	10,56±0,11a	5,39±0,06a	0,88±0,01b
0,45-1	4,20±0,15c	1,39±0,03c	0,65±0,01c	0,73±0,01bc	8,46±0,14b	2,59±0,02b	0,15±0,02b	1,24±0,01a	7,96±0,11b	4,46±0,06b	0,94±0,01a
1-1,6	5,73±0,15b	1,67±0,03b	0,66±0,01bc	0,71±0,01c	7,51±0,14c	2,43±0,02c	0,14±0,02b	1,15±0,01c	6,70±0,11c	3,72±0,06c	0,84±0,01c
>1,6	7,29±0,15a	1,90±0,03a	0,68±0,01b	0,74±0,01b	7,72±0,14c	2,43±0,02c	0,13±0,02b	1,11±0,01d	6,56±0,11c	3,50±0,06c	0,83±0,01c
Vrijeme destilacije (min)	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*
40	5,75±0,13ab	1,71±0,03a	0,71±0,01a	0,77±0,01a	9,29±0,12a	2,64±0,02a	0,17±0,01a	1,18±0,01ab	8,16±0,10a	4,34±0,05a	0,94±0,01a
80	5,63±0,13b	1,68±0,03a	0,69±0,01a	0,74±0,01b	8,72±0,12b	2,58±0,02a	0,17±0,01a	1,16±0,01b	7,72±0,10b	4,15±0,05b	0,83±0,01b
120	6,08±0,13a	1,75±0,03a	0,71±0,01a	0,76±0,01ab	8,93±0,12ab	2,63±0,02a	0,17±0,01a	1,19±0,01a	7,95±0,10ab	4,30±0,05ab	0,85±0,01b

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  $p \leq 0,05$ .



**Tablica 9.** Rezultati statističke analize utjecaja veličine čestica sjemenki komorača i vremena destilacije na koncentracije hlapljivih spojeva eteričnog ulja sjemenki komorača izoliranog postupkom vodene destilacije (nastavak)

Izvor varijacije	Oksidirani monoterpeni (mg mL <sup>-1</sup> )				Fenilpropanoidi (mg mL <sup>-1</sup> )		Aromatski aldehydi (mg mL <sup>-1</sup> )
	Eukaliptol	L-fenhon	Kamfor	Karvon	Estragol	<i>Trans</i> -anetol	<i>p</i> -anisaldehid
<b>Veličina čestica (mm)</b>	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p=0,504	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*
<0,45	0,88±0,02a	167,14±1,79b	4,14±0,05b	1,09±0,01a	28,76±0,42b	828,97±12,31b	4,82±0,06b
0,45-1	0,75±0,02b	175,80±1,79a	4,40±0,05a	1,10±0,01a	32,35±0,42a	912,65±12,31a	5,11±0,06a
1-1,6	0,65±0,02c	169,09±1,79ab	4,32±0,05ab	1,12±0,01a	31,50±0,42a	866,02±12,31ab	4,45±0,06c
>1,6	0,72±0,02b	175,36±1,79a	4,42±0,05a	1,12±0,01a	31,84±0,42a	903,20±12,31a	4,42±0,06c
<b>Vrijeme destilacije (min)</b>	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p=0,504	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*
40	0,79±0,01a	183,18±1,55a	4,65±0,04a	1,10±0,01a	32,53±0,36a	901,72±10,66a	4,51±0,05b
80	0,73±0,01b	164,76±1,55b	4,12±0,04b	1,11±0,01a	29,58±0,36c	843,35±10,66b	4,68±0,05b
120	0,73±0,01b	167,61±1,55b	4,19±0,04b	1,11±0,01a	31,22±0,36b	888,05±10,66a	4,91±0,05a

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  $p \leq 0,05$ .

U najvećem su broju identificirani spojevi iz skupine monoterpena:  $\alpha$ -pinen, kamfen, sabinen,  $\beta$ -pinen, mircen,  $\alpha$ -felandren,  $\alpha$ -terpinen, *p*-cimen, D-limonen,  $\gamma$ -terpinen i *cis*-sabinen hidrat. Iz skupine oksidiranih monoterpena identificirani su eukaliptol, L-fenhon, kamfor i karvon, dok su iz skupine fenilpropanoida identificirani estragol i *trans*-anetol. Iz najmanje zastupljene skupine aromatskih aldehida identificiran je *p*-anisaldehid (tablica 8).

Najzastupljeniji spojevi bili su *trans*-anetol čija je prosječna vrijednost iznosila  $877,71 \pm 54,18$  mg mL<sup>-1</sup> te L-fenhon s prosječnom vrijednosti  $171,85 \pm 10,35$  mg mL<sup>-1</sup>. Slijede ih estragol (prosječno  $31,11 \pm 2,20$  mg mL<sup>-1</sup>), mircen (prosječno  $8,98 \pm 1,99$  mg mL<sup>-1</sup>), D-limonen (prosječno  $7,95 \pm 1,67$  mg mL<sup>-1</sup>),  $\alpha$ -pinen (prosječno  $5,82 \pm 1,20$  mg mL<sup>-1</sup>), *p*-anisaldehid (prosječno  $4,70 \pm 0,37$  mg mL<sup>-1</sup>), kamfor (prosječno  $4,32 \pm 0,29$  mg mL<sup>-1</sup>) i  $\gamma$ -terpinen (prosječno  $4,27 \pm 0,77$  mg mL<sup>-1</sup>). Ostali su spojevi identificirani u koncentracijama nižim od 3 mg mL<sup>-1</sup>.

*Trans*-anetol je, kao najzastupljeniji spoj, identificiran u rasponu od  $791,33 \pm 8,76$  do  $961,84 \pm 23,66$  mg mL<sup>-1</sup>. Najviša koncentracija ovog spoja dobivena je u uzorku D40 najveće veličine čestica (>1,6 mm) i primjenom najkraćeg vremena destilacije (40 min). Suprotno tome, najniža koncentracija dobivena je u uzorku A120 najmanje veličine čestica (<0,45 mm) i primjenom najduljeg vremena destilacije (120 min). Međutim, najviši udio *trans*-anetola dobiven je u uzorku B120 (79,29 %) čija je veličina čestica bila 0,45-1 mm, a vrijeme destilacije 120 min, dok je u uzorku D40 dobiveno 78,28 % *trans*-anetola. U usporedbi s tim, u uzorcima jednakog vremena destilacije, ali manje veličine čestica dobiveno je 1,08 % (C40), 0,87 % (B40) i 1,4 % (A40) manje *trans*-anetola. Dakle, manja veličina čestica nije imala utjecaja na izolaciju višeg udjela *trans*-anetola. S druge strane, uzorak s najnižom koncentracijom ujedno je i uzorak s najnižim udjelom *trans*-anetola (76,71 %). Nadalje, trend povećanja udjela ovoga spoja duljim vremenom destilacije postoji samo u frakcijama B (veličina čestica 0,45-1 mm) i C (veličina čestica 1-1,6 mm).

Udio L-fenhona kretao se u rasponu od  $157,00 \pm 2,85$  do  $187,63 \pm 3,39$  mg mL<sup>-1</sup>. Najviša se koncentracija dobila vodenom destilacijom u trajanju od 40 min, a najniža destilacijom u trajanju od 80 min. Obje su koncentracije dobivene u uzorcima veličine čestica 1-1,6 mm (frakcija C). Uzorak s najvišom koncentracijom ovog spoja (C40) ujedno je i uzorak s najvišim udjelom L-fenhona (16,18 %). Međutim, njegova najniža koncentracija dobivena je u uzorku C80, dok je najniži udio zabilježen u uzorku C120. U frakcijama B i D, čija je veličina čestica bila 0,45-1 mm te >1,6 mm, najviša koncentracija L-fenhona dobivena je destilacijom od 40 min ( $186,01 \pm 1,97$  mg mL<sup>-1</sup> u uzorku B40 i  $187,08 \pm 4,33$  mg mL<sup>-1</sup> u uzorku D40), dok je najniža koncentracija dobivena dvostruko duljom destilacijom ( $166,65 \pm 2,14$  mg mL<sup>-1</sup> u uzorku B80 i  $167,13 \pm 3,57$  mg mL<sup>-1</sup> u uzorku D80). Unatoč tome, viši udio L-fenhona dobiven je destilacijom

u trajanju od 80 min (15,33 %) u uzorku D80, za razliku od uzorka D40 gdje je dobiveno 0,1 % manje ovoga spoja. U svim su uzorcima, osim u onima veličine čestice  $<0,45$  mm, dobivene najniže koncentracije L-fenhona pri destilaciji od 80 min dok se njegova koncentracija u frakciji A smanjuje duljim vremenom destilacije. Suprotno tome, najviši je udio L-fenhona u frakciji A dobiven najduljim vremenom destilacije.

Jednako *trans*-anetolu, pri najkraćem vremenu destilacije (40 min) uzoraka s najvećom veličinom čestica ( $>1,6$  mm) u najvišim su koncentracijama identificirani i spojevi estragol ( $34,21 \pm 0,55$  mg mL<sup>-1</sup>) te kamfor ( $4,81 \pm 0,06$  mg mL<sup>-1</sup>). Najniže koncentracije istih spojeva ( $27,05 \pm 0,48$  mg mL<sup>-1</sup> za estragol i  $3,91 \pm 0,08$  mg mL<sup>-1</sup> za kamfor) dobivene su najduljim vremenom destilacije (120 min) uzoraka najmanje veličine čestica ( $<0,45$  mm). Međutim, najviši udjeli ovih spojeva zabilježeni su u uzorku C40 (2,87 % za estragol i 0,41 % za kamfor). S druge strane, najmanji udio estragola (2,62 %) bio je u uzorku A120 u kojem je ujedno identificirana i njegova najniža koncentracija, dok je najmanji udio kamfora (0,36 %) zabilježen u uzorcima B120 i C120.

U uzorku A40 veličine čestica  $<0,45$  mm i vremena destilacije 40 min, zabilježena je najviša koncentracija mircena ( $12,99 \pm 0,04$  mg mL<sup>-1</sup>), D-limonena ( $10,75 \pm 0,03$  mg mL<sup>-1</sup>),  $\alpha$ -felandrena ( $3,06 \pm 0,02$  mg mL<sup>-1</sup>),  $\beta$ -pinena ( $0,87 \pm 0,03$  mg mL<sup>-1</sup>), sabinena ( $0,83 \pm 0,00$  mg mL<sup>-1</sup>),  $\alpha$ -terpinena ( $0,27 \pm 0,06$  mg mL<sup>-1</sup>) i eukaliptola ( $0,96 \pm 0,05$  mg mL<sup>-1</sup>). Iz uzorka C80 (veličina čestica 1-1,6 mm i vrijeme destilacije 80 min) izolirane su najniže koncentracije mircena, *p*-anisaldehida, *cis*-sabinen hidrata i  $\beta$ -pinena.

Postoji nekoliko kemotipova eteričnog ulja koji označavaju kemijsku karakterizaciju populacije jedne vrste koja se nalazi na određenom geografskom području, a razlikuju se prema dominaciji glavnih spojeva (Krüger i Hammer, 1999). Iz tog razloga postoji nekoliko kemotipova eteričnog ulja: anetol, estragol, anetol/estragol i anetol/fenhon (Mota i sur., 2015; Cavaleiro i sur., 1993). Eterično ulje komorača dobiveno u ovome istraživanju može se klasificirati kao anetol kemotip.

Marotti i Piccaglia (1992) ispitali su utjecaj veličine čestica na izolaciju pojedinih hlapljivih spojeva sjemenki komorača. Za istraživanje su koristili cijele i zgnječene sjemenke te sjemenke samljevene u prah. Najzastupljeniji spoj u svim uzorcima eteričnog ulja bio je *trans*-anetol (81,78-89,52 %). Njegov je udio bio najviši u cijelim sjemenkama, a najmanji u sjemenkama samljevenima u prah. Od ostalih su spojeva u većem udjelu identificirali fenhon (5,49-10,21%), estragol (1,72-2,66 %) i limonen (1,33-6,65 %). Udio fenhona i limonena bio je najviši kod samljevenih sjemenki, dok je udio estragola, ovisno o omjeru biljnog materijala i vode, bio najviši u cijelim i zgnječenim sjemenkama. Udio spojeva u ovome radu dobivenim destilacijom

od 120 min može se usporediti s udjelom kojeg dobili Marotti i Piccaglia (1992). Tako je u ovome istraživanju, u uzorku D120, koji bi veličinom čestica odgovarao veličini cijelih sjemenki, dobiveno manje *trans*-anetola (78,36 %) i D-limonena (0,58 %), a više L-fenhona (15,04 %) i estragola (2,79 %). Uzorak C120 veličine čestica 1-1,6 mm može se usporediti s rezultatima zgnječenih sjemenki jer su Marotti i Piccaglia (1992) utvrdili da je 61,4 % čestica bilo veličine >1 mm. Tako je u uzorku C120 identificirano 79,23 % *trans*-anetola, 14,25 %, L-fenhona, 2,84 % estragola i 0,57 % D-limonena. I u ovome je slučaju kod Marotti i Piccaglia (1992) identificirano više *trans*-anetola i limonena te manje fenhona i estragola, a jednaki su rezultati dobiveni uspoređujući uzorak najmanje veličine čestica (A120) sa sjemenkama samljevenima u prah. Eterična ulja dobivena iz uzoraka najmanje veličine čestica sadržavala su više koncentracije limonena u oba istraživanja. Međutim, u ovome je radu koncentracija *trans*-anetola, estragola i limonena bila najviša u uzorcima veličine čestica 0,45-1 mm.

Košar i sur. (2007) ispitali su utjecaj mljevenja sjemenki komorača na kemijski sastav eteričnog ulja dobivenog vodenom destilacijom od 3 h te vodenom destilacijom potpomognutom mikrovalovima u trajanju od 1 h. U najvećem su udjelu identificirali *trans*-anetol, estragol, limonen i L-fenhon. Usitnjavanje sjemenki nije imalo signifikantnog utjecaja na povećanje koncentracije spojeva, osim na limonen čiji se udio povećao dvostruko u ulju koje je izolirano vodenom destilacijom potpomognutom mikrovalovima. Također, udio većine spojeva izoliranih vodenom destilacijom cijelih sjemenki bio je viši u odnosu na destilaciju samljevenih sjemenki. Jedina iznimka bio je *trans*-anetol čiji je udio bio viši u ulju dobivenim destilacijom sjemenki najmanje veličine čestica. Košar i sur. (2007) navode kako vruća voda omekšava biljni materijal i prodire u sjemenku pa komponente obogaćene kisikom difundiraju na površinu materijala i hlape zajedno s vodenom parom. Stoga je za izolaciju oksidiranih spojeva efikasnije kraće vrijeme destilacije.

Utjecaj mljevenja sjemenki na prinos, kemijski sastav i antimikrobnu aktivnost eteričnog ulja komorača istraživali su i Ilić i sur. (2019). U njihovom je radu eterično ulje dobiveno vodenom destilacijom cijelih i usitnjene sjemenki u trajanju od 180 min. Kvalitativni sastav bio je identičan, dok se kvantitativni sastav eteričnog ulja razlikovao ovisno o tome je li ulje ekstrahirano iz cijelih ili usitnjenih sjemenki. Identificirali su 14 hlapljivih komponenti, a najzastupljeniji spoj bio je *trans*-anetol. Njegov je udio bio viši u ulju ekstrahiranom iz cijelih sjemenki ( $69,89 \pm 0,06$  %), u odnosu na usitnjene sjemenke ( $64,87 \pm 0,07$  %). Udio fenhona bio je za 0,55 % viši, dok je udio limonena bio dvostruko, a udio  $\alpha$ -pinena čak četverostruko viši u ulju dobivenom iz usitnjenih sjemenki. Dodatno, eterično ulje usitnjenih sjemenki pokazalo je znatno veću antimikrobnu aktivnost. U ovome su radu gotovo jednaki rezultati

dobiveni su za spojeve fenhon i D-limonen. Udio fenhona bio je za 0,58 % viši, a udio D-limonena gotovo dvostruko viši u uzorku najmanje veličine čestica (A120), u usporedbi s uzorkom najveće veličine čestica (D120). S druge strane, udio *trans*-anetola bio je najviši u uzorku B120 (veličina čestica 0,45-1 mm i vrijeme destilacije 120 min) te je on iznosio 79,29 %. Jednakim vremenom destilacije, u ostalim frakcijama dobiveno je 79,23 % (C120), 78,36 % (D120) i 76,71 % (A120) *trans*-anetola. Također, manja veličina čestica nije imala utjecaj na dobivanje višeg udjela  $\alpha$ -pinena pa je tako viši udio dobiven u uzorku D120 (0,61 %) u odnosu na uzorak najmanje veličine čestica (0,57 %). Razlike u dobivenim rezultatima mogu se pripisati različitom porijeklu i stupnju zrelosti sjemenki te različitom vremenu destilacije.

Anwar i sur. (2009) analizirali su kemijski sastav eteričnog ulja sjemenki gorkog komorača različitog stupnja zrelosti. Prije ekstrakcije eteričnog ulja, sjemenke su usitnili u prah, a one su zatim podvrgnute vodenoj destilaciji u vremenskom razdoblju od 3 h korištenjem aparature po Clevengeru. Identificirali su 35 spojeva, od kojih su u najvećem udjelu bili *trans*-anetol (65,2-72,6 %), fenhon (8,81-10,99 %), estragol (6,68-7,17 %) i limonen (3,52-7,81 %). Stupanj zrelosti sjemenki imao je signifikantan utjecaj na izolaciju većine spojeva, što se može pripisati promjenama u eteričnom ulju zbog metabolizma biljke. Najviši udjeli *trans*-anetola, *cis*-anetola i fenhona zabilježeni su u eteričnom ulju zrelih sjemenki, dok je najviši udio limonena, sabinena,  $\alpha$ -pinena i  $\alpha$ -ocimena bio u sjemenkama najnižeg stupnja zrelosti. Varijacije u kemijskom sastavu eteričnog ulja komorača mogu se pripisati različitim agroklimatskim uvjetima, regiji u kojoj se biljka uzgajala te njenom adaptivnom metabolizmu (Anwar i sur., 2009).

Miguel i sur. (2010) vodenom su destilacijom u aparaturi po Clevengeru izolirali eterično ulje sjemenki komorača, a vrijeme trajanja destilacije bilo je 30 min te 1, 2 i 3 h. U najvećim su udjelima izolirali estragol (79,3-88 %) i limonen (6,9-12,3 %). Udio estragola se, za razliku od udjela limonena, smanjivao duljim vremenom destilacije. Najviši udio limonena dobiven je vodenom destilacijom u trajanju od 2 h. Također, koncentracija  $\alpha$ -pinena, mircena i fenhona povećavala se duljim vremenom destilacije.

Prema istraživanju Kalleli i sur. (2019), kemijski sastav eteričnog ulja uvelike se razlikovao ovisno o porijeklu sjemenki. *Trans*-anetol bio je najzastupljeniji spoj u sjemenkama kultiviranima u Tunisu (63,41-78,26 %), dok je u sjemenkama porijeklom iz Francuske isti bio identificiran u udjelima od 36,31 te 0,14 %. Dodatno, u tuniškom su eteričnom ulju u višim udjelima zabilježeni i L-fenhon (10,64-12,09 %), estragol (4,67-17,06 %) te limonen (3,88-4,67 %). Ostali su spojevi identificirani u udjelima nižim od 0,5 %. U eteričnom ulju francuskog porijekla, najdominantniji spoj bio je estragol (44,72 i 88,92 %). L-fenhon izoliran je u udjelima

od 2,82 i 9,47 %, dok je udio limonena bio 5,65 i 6,32 %. Spojevi poput eukaliptola, karveola, *cis*-limonen oksida i *trans*-limonen oksida identificirani su samo u francuskom eteričnom ulju. Nadalje, rezultati provedene statističke analize pokazali su da postoje signifikantne razlike ( $p < 0,001$ ) s obzirom na utjecaj veličine čestica sjemenki komorača i vremena destilacije na koncentracije hlapljivih spojeva eteričnog ulja, osim za spoj karvon ( $p = 0,504$ ) (tablica 9). Najviše *trans*-anetola dobiveno je u uzorcima veličine čestica 0,45-1 mm ( $912,65 \pm 12,31 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i  $> 1,6$  mm ( $903,20 \pm 12,31 \text{ mg mL}^{-1}$ ) te primjenom vremena destilacije od 40 min ( $901,72 \pm 10,66 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i 120 min ( $888,05 \pm 10,66 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Jednaki su uvjeti bili efikasni i za izolaciju L-fenhona gdje je kod čestica veličine 0,45-1 mm kao i  $> 1,6$  mm dobiveno  $175,80 \pm 1,79$  odnosno  $175,36 \pm 1,79 \text{ mg mL}^{-1}$ , dok je najpogodnije vrijeme destilacije bilo 40 min ( $183,18 \pm 1,55 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Veličina čestica imala je signifikantan utjecaj na izolaciju kamfena, sabinena,  $\beta$ -pinena, mircena,  $\alpha$ -felandrena,  $\alpha$ -terpinena, D-limonena,  $\gamma$ -terpinena i eukaliptola čije su najviše koncentracije detektirane u uzorcima veličine čestica  $< 0,45$  mm, dok je veličina čestica 0,45-1 mm bila najpogodnija za izolaciju *p*-cimena, *cis*-sabinen hidrata i *p*-anisaldehida. S druge strane, najviša koncentracija  $\alpha$ -pinena dobivena je u uzorcima veličine čestica  $> 1,6$  mm, a za izolaciju kamfena najefikasnije su se pokazale najmanja ( $< 0,45$  mm) i najveća veličina čestica ( $> 1,6$  mm). Jednako tako, najviše koncentracije kamfora dobivene su u frakcijama B (0,45-1 mm) i D ( $> 1,6$  mm), a estragola u frakcijama B (0,45-1 mm), C (1-1,6 mm) i D ( $> 1,6$  mm).

Nadalje, najkraćim vremenom destilacije (40 min) dobivene su najviše koncentracije  $\beta$ -pinena, mircena, D-limonena,  $\gamma$ -terpinena, *cis*-sabinen hidrata, eukaliptola, kamfora i estragola. Najdulje vrijeme destilacije (120 min) bilo je efikasnije za izolaciju  $\alpha$ -pinena i *p*-anisaldehida, dok su podjednake koncentracije kamfena, sabinena,  $\alpha$ -felandrena,  $\alpha$ -terpinena i karvona dobivene tijekom sva tri vremena destilacije.

Prema ovim rezultatima može se zaključiti da manja veličina čestica ( $< 0,45$  mm) rezultira izolacijom većeg udjela lako i srednje hlapljivih spojeva. S druge strane, iz uzoraka veličine čestica 0,45-1 mm i  $> 1,6$  mm efikasnije se izoliraju teže hlapljivi spojevi. Također, najviše se koncentracije hlapljivih spojeva izoliraju destilacijom u trajanju od 40 i 120 min. Košar i sur. (2007) navode da, iako manje hlapljivi, oksidirani spojevi ulja u cijelim sjemenkama imaju veći afinitet prema vodi te se stoga pojavljuju u destilatu ranije nego drugi ugljikovodici. Ova činjenica može objasniti zbog čega se u ovome radu teško hlapljivi spojevi efikasnije izoliraju iz uzoraka veće veličine čestica.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Primjenom vodene destilacije te variranjem parametara (veličine čestica i vremena destilacije) određen je prinos eteričnog ulja sjemenki komorača u rasponu od  $1,50 \pm 0,07$  do  $12,50 \pm 0,01$  %. Veličina čestica i vrijeme destilacije pokazali su statistički značajan utjecaj na prinos ulja čiji se viši udio postiže manjom veličinom čestica i duljim vremenom destilacije. Signifikantno najviši prinos eteričnog ulja određen je u uzorcima najmanje veličine čestica ( $< 0,45$  mm) te primjenom najduljeg vremena destilacije (120 min). Signifikantno najniži prinosi ulja zabilježeni su u uzorcima veličine čestica 1-1,6 te  $> 1,6$  mm te primjenom destilacije od 40 min.
2. Kemijski sastav eteričnog ulja sjemenki komorača analiziran je primjenom GC-MS analize. Identificirano je ukupno 18 hlapljivih spojeva iz skupine monoterpena ( $\alpha$ -pinen, kamfen, sabinen,  $\beta$ -pinen, mircen,  $\alpha$ -felandren,  $\alpha$ -terpinen, *p*-cimen, D-limonen,  $\gamma$ -terpinen i *cis*-sabinen hidrat), oksidiranih monoterpena (eukaliptol, L-fenhon, kamfor i karvon), fenilpropanoida (estragol i *trans*-anetol) i aromatskih aldehida (*p*-anisaldehid).
3. Najzastupljenija skupina hlapljivih spojeva eteričnog ulja sjemenki komorača bili su fenilpropanoidi (prosječna vrijednost  $80,65 \pm 0,87$  %). Slijede ih oksidirani monoterpeni (prosječna vrijednost  $15,81 \pm 0,59$  %) i monoterpeni (prosječna vrijednost  $3,12 \pm 0,52$  %), dok su aromatski aldehidi bili prisutni u najnižem udjelu (prosječna vrijednost  $0,42 \pm 0,04$  %).
4. Najzastupljeniji pojedinačni hlapljivi spojevi bili su *trans*-anetol (prosječna vrijednost  $877,71 \pm 54,18$  mg mL<sup>-1</sup>) i L-fenhon (prosječna vrijednost  $171,85 \pm 10,35$  mg mL<sup>-1</sup>). Slijede ih estragol (prosječna vrijednost  $31,11 \pm 2,20$  mg mL<sup>-1</sup>), mircen (prosječna vrijednost  $8,98 \pm 1,99$  mg mL<sup>-1</sup>), D-limonen (prosječna vrijednost  $7,95 \pm 1,67$  mg mL<sup>-1</sup>),  $\alpha$ -pinen (prosječna vrijednost  $5,82 \pm 1,20$  mg mL<sup>-1</sup>), *p*-anisaldehid (prosječna vrijednost  $4,70 \pm 0,37$  mg mL<sup>-1</sup>), kamfor (prosječna vrijednost  $4,32 \pm 0,29$  mg mL<sup>-1</sup>) i  $\gamma$ -terpinen (prosječna vrijednost  $4,27 \pm 0,77$  mg mL<sup>-1</sup>). Kamfen, sabinen,  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -felandren,  $\alpha$ -terpinen, *p*-cimen, *cis*-sabinen hidrat, eukaliptol i karvon identificirani su u koncentracijama nižim od 3 mg mL<sup>-1</sup>.

5. Rezultati statističke analize utjecaja veličine čestica sjemenki komorača i vremena destilacije pokazali su signifikantne razlike u zastupljenosti pojedinih skupina hlapljivih spojeva. Za izolaciju fenilpropanoide efikasnijom se pokazala veća veličina čestica te dulje vrijeme destilacije. Najviše koncentracije monoterpena i aromatskih aldehida dobivene su u uzorcima manje veličine čestica te primjenom duljeg vremena destilacije. Približno jednake koncentracije oksidiranih monoterpena dobivene su u svim frakcijama, ali signifikantno viši udio ove skupine spojeva izoliran je primjenom najkraćeg vremena destilacije.
  
6. Rezultati statističke analize utjecaja veličine čestica sjemenki komorača i vremena destilacije pokazali su signifikantne razlike u zastupljenosti pojedinačnih hlapljivih spojeva. Manja veličina čestica (<0,45 mm) bila je efikasnija za izolaciju lako i srednje hlapljivih spojeva, a veličina čestica 0,45-1 mm i >1,6 mm za izolaciju teže hlapljivih spojeva. Vrijeme destilacije od 40 i 120 min bilo je podjednako efikasno za izolaciju najviših koncentracija pojedinačnih hlapljivih spojeva.



## 6. LITERATURA

- Abdellaoui M, Bouhlali E dine T, Derouich M, El-Rhaffari L (2020) Essential oil and chemical composition of wild and cultivated fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): A comparative study. *S Afr J Bot* **135**, 93–100. doi:10.1016/j.sajb.2020.09.004
- Ahmed AF, Shi M, Liu C, Kang W (2019) Comparative Analysis of Antioxidant Activities of Essential oils and Extracts of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Egypt and China. *Food Sci Hum Wellness* **8(1)**, 67-72. doi:10.1016/j.fshw.2019.03.004
- Akhihero ET, Ayodele BV, Akpojotor GE (2013) Effect of particle size and temperature variation on the yield of essential oil from lemongrass using steam distillation. *Afr J Phys* **6**, 105-112.
- Allen T (1997) Particle size measurement, 5. izd., Chapman and Hall, London, str. 112-186, 300- 486.
- Anonymous 1, <<https://image.shutterstock.com/image-vector/sieving-sifting-elimination-separation-mixtures-260nw-1315316345.jpg>>. Pristupljeno 10. listopada 2021.
- Anonymous 2, <<https://malvern.dist.sdlmedia.com/distributions/?o=e3e48bcf-ca01-49db-a212-5055aef71388>>. Pristupljeno 16. listopad 2021.
- Anwar F, Hussain AI, Sherazi STH, Bhangar MI (2009) Changes in Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Fruit at Different Stages of Maturity. *J Herbs Spices Med Plants* **15(2)**, 187-202. doi:10.1080/10496470903139488
- Badgujar SB, Patel VV, Bandivdekar AH (2014) *Foeniculum vulgare* Mill: a review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *BioMed Res Int* **2014**, 1-33. doi:10.1155/2014/842674
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol* **46(2)**, 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Balbino S, Repajić M, Obranović M, Medved AM, Tonković P, Dragović-Uzelac V (2021) Characterization of lipid fraction of Apiaceae family seed spices: Impact of species and extraction method. *J Appl Res Med Aromat Plants* **25**, 1-10. doi:10.1016/j.jarmap.2021.100326

Başer KHC, Demirci F (2007) Chemistry of essential oils. U: Berger RG (ured.) Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability, Springer Science & Business Media, New York, str. 70.

Belabdelli F, Piras A, Bekhti N, Falconieri D, Belmokhtar Z, Merad Y (2020) Chemical composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. *Chemistry Africa*, 1-6.

Bernáth J, Németh É, Petheõ F, Mihalik E, Kálmán K, Franke R (1999) Regularities of the Essential Oil Accumulation in Developing Fruits of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and Its Histological Background. *J Essent Oil Res* **11(4)**, 431–438. doi:10.1080/10412905.1999.9701177

Black CA, Day PR (1965) Particle Fractionation and Particle-Size Analysis. *Agronomy Monograph*, 545-567. doi:10.2134/agronmonogr9.1.c43

Burčul F, Blažević I, Radan M, Politeo O (2020) Terpenes, phenylpropanoids, sulfur and other essential oil constituents as inhibitors of cholinesterases. *Curr Med Chem* **27(26)**, 4297-4343. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180330092607>

Cavaleiro CMF, Roque OL, da Cunha AP (1993) Contribution for the Characterization of Portuguese Fennel Chemotypes. *J Essent Oil Res* **5(2)**, 223–225. doi:10.1080/10412905.1993.9698207

Cordell GA (1976) Biosynthesis of sesquiterpenes. *Chem Rev* **76(4)**, 425-460. doi:10.1021/cr60302a002

Dash N (2021) Fennel: Functional Food for Obesity. U: Bhadra P, Banerjee P, Deb A (ured.) An Anthology of Nutraceuticals, New Delhi Publishers, New Delhi, str. 82-97. DOI: 10.30954/anthnutraceuticals.8

Devappa RK, Makkar HP, Becker K (2011) Jatropha diterpenes: a review. *J Am Oil Chem Soc* **88(3)**, 301-322. doi:10.1007/s11746-010-1720-9

El-Awadi ME, Hassan EA (2010) Physiological Responses of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) Plants to Some Growth Substances: The Effect of Certain Amino Acids and a Pyrimidine Derivative. *J Am Sci* **6(7)**, 120-125.

Eshel G, Levy GJ, Mingelgrin U, Singer MJ (2004) Critical Evaluation of the Use of Laser Diffraction for Particle-Size Distribution Analysis. *Soil Sci Soc Am J* **68(3)**, 736-743. doi:10.2136/sssaj2004.7360

- Fisher P, Aumann C, Chia K, O'Halloran N, Chandra S (2017) Adequacy of laser diffraction for soil particle size analysis. *PLOS One* **12(5)**, 1-20. doi:10.1371/journal.pone.0176510
- Galacgac JA, Ooi PSK (2018) Use of a Laser Diffractometer to Obtain the Particle Size Distribution of Fine-Grained Soils. *Transp Res Record*, 1-11. doi:10.1177/0361198118755712
- Guenther E, Althausen D (1948) The essential oils, Van Nostrand, New York, str. 106.
- Hammouda F, Saleh M, Abdel-Azim N, Shams K, Ismail S, Shahat A, i sur. (2014) Evaluation Of The Essential Oil Of *Foeniculum Vulgare* Mill (Fennel) Fruits Extracted By Three Different Extraction Methods By Gc/Ms. *Afr J Tradit Complem* **11(2)**, 277-279. doi:10.4314/ajtcam.v11i2.8
- Ilić DP, Stanojević LP, Troter DZ, Stanojević JS, Danilović BR, Nikolić VD i sur. (2019) Improvement of the yield and antimicrobial activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) essential oil by fruit milling. *Ind Crop Prod* **142**, 1-7. doi:10.1016/j.indcrop.2019.111854
- Javed R, Hanif MA, Ayub MA, Rehman R (2020) Fennel. U: Hanif MA, Nawaz H, Khan MM, Byrne HJ (ured.) *Medicinal Plants of South Asia*, Elsevier, Amsterdam, str. 241-256.
- Kalleli F, Bettaieb Rebey I, Wannes WA, Boughalleb F, Hammami M, Saidani Tounsi M i sur. (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(8)**, 1-14. doi:10.1111/jfbc.12935
- Kalođera Z, Blažević N, Salopek N, Jurišić R (1998) Eterična ulja (aetherolea). *Farm Glas* **54(6)**, 195-210.
- Kaye BH (1999) *Characterization of Powders and Aerosols*, 1.izd., Wiley-VCH, Weinheim, str. 69.
- Khan M, Musharaf S (2014) *Foeniculum vulgare* Mill. A medicinal herb. *Med Plant Res* **4(6)**, 46-54. doi: 10.5376/mpr.2014.04.0006
- Korkina LG (2007) Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell Mol Biol* **53(1)**, 15-25. <https://doi.org/10.1170/T772>

- Koşar M, Özek T, Kürkçüoğlu M, Başer KHC (2007) Comparison of Microwave-Assisted Hydrodistillation and Hydrodistillation Methods for the Fruit Essential Oils of *Foeniculum vulgare*. *J Essent Oil Res* **19(5)**, 426–429. doi:10.1080/10412905.2007.9699943
- Krüger H, Hammer K (1999) Chemotypes of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *J Essent Oil Res* **11(1)**, 79–82. doi:10.1080/10412905.1999.9701078
- Luque de Castro M, Jiménez-Carmona M, Fernández-Pérez V (1999) Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *TrAC - Trend Anal Chem* **18(11)**, 708-716. doi:10.1016/s0165-9936(99)00177-6
- Malhotra SK (2012) Fennel and fennel seed. U: Peter KV (ured.) Handbook of Herbs and Spices, 2. izd, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 275 – 302.
- Marotti M, Piccaglia R (1992) The Influence of Distillation Conditions on the Essential Oil Composition of Three Varieties of *Foeniculum vulgare* Mill. *J Essent Oil Res* **4(6)**, 569–576. doi:10.1080/10412905.1992.9698137
- Medved AM, Tonković P (2020) Kemijski sastav nehlapljivih ulja začinskih sjemenki: utjecaj vrste sjemenki i metode ekstrakcije (rad za Rektorovu nagradu), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Miguel MG, Cruz C, Faleiro L, Simões MTF, Figueiredo AC, Barroso JG, i sur. (2010) *Foeniculum vulgare* Essential Oils: Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Nat Prod Commun* **5(2)**, 319-328. doi:10.1177/1934578x1000500231
- Mimica-Dukić N, Kujundžić S, Soković M, Couladis M (2003) Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytother Res* **17(4)**, 368–371. doi:10.1002/ptr.1159
- Mota AS, Martins MR, Arantes S, Lopes VR, Bettencourt E, Pombal S, i sur. (2015) Antimicrobial Activity and Chemical Composition of the Essential Oils of Portuguese *Foeniculum vulgare* Fruits. *Nat Prod Commun* **10(4)**, 673-676. doi:10.1177/1934578x1501000437
- Muffler K, Leipold D, Scheller M-C, Haas C, Steingroewer J, Bley T, i sur. (2011) Biotransformation of triterpenes. *Process Biochem* **46(1)**, 1-15. doi:10.1016/j.procbio.2010.07.015

Napoli EM, Curcuruto G, Ruberto G (2010) Screening the essential oil composition of wild Sicilian fennel. *Biochem Syst Ecol* **38(2)**, 213-223. doi:10.1016/j.bse.2010.01.009

Paduch R, Kandefor-Szerszeń M, Trytek M, Fiedurek J (2007) Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Ex* **55(5)**, 315-327. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>

Perveen S (2018) Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. U: Perveen S, Al-Taweel A (ured.) *Terpenes and Terpenoids*, IntechOpen, London, str. 1-12. doi:10.5772/intechopen.79683

Pistelli L, Reidel RVB, Margari P, Chiappe C (2018) Phosphate and Phosphonate-Based Ionic Liquids as New Additives in *Foeniculum vulgare* Essential Oil Extraction. *Aust J Chem* **71(3)**, 127-132. doi:10.1071/ch17406

Rahfeld B (2009) *Mikroskopischer Farbatlas pflanzlicher Drogen*. Springer Science & Business Media, Heidelberg, str. 176-177.

Rao VP, Pandey D (2007) Extraction of essential oil and its applications (doktorski rad), National Institute of Technology Rourkela, Odisha.

Rather MA, Dar BA, Sofi SN, Bhat BA, Qurishi MA (2012) *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arab J Chem* **9**, 1-10. doi:10.1016/j.arabjc.2012.04.011

Reyes-Jurado F, Franco-Vega A, Ramírez-Corona N, Palou E, López-Malo A (2015) Essential oils: antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. *Food Eng Rev* **7(3)**, 275-297. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9099-2>

Roohinejad S, Koubaa M, Barba FJ, Leong SY, Khelifa A, Greiner R, i sur. (2017) Extraction Methods of Essential Oils From Herbs and Spices. U: Hashemi SMB, Khaneghah AM, de Souza Sant'Ana A.(ured.) *Essential oils in food processing: chemistry, safety and applications*. John Wiley & Sons, Oxford, str. 21–55. doi:10.1002/9781119149392.ch2

Rumpel H, Pope JM (1993) Chemical shift imaging in nuclear magnetic resonance: a comparison of methods. *Concept Magnetic Res* **5(1)**, 43-55. <https://doi.org/10.1002/cmr.1820050104>

- Ryżak M, Bieganowski A (2011) Methodological aspects of determining soil particle-size distribution using the laser diffraction method. *J Plant Nutr Soil Sc* **174(4)**, 624-633. doi:10.1002/jpln.201000255
- Saber JI, Eshra DH (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 Sci Exchange J* **40**, 406-414. DOI:10.21608/asejaiqsae.2019.44629
- Sadgrove N, Jones G (2015) A contemporary introduction to essential oils: chemistry, bioactivity and prospects for Australian agriculture. *Agriculture* **5(1)**, 48-102. <https://doi.org/10.3390/agriculture5010048>
- Seidemann J (2005) World spice plants: economic usage, botany, taxonomy, Springer Verlag, Berlin, str. 372–374.
- Seigler DS (1998) Plant secondary metabolism, Springer, Boston, str. 106-129.
- Shahat A, Ibrahim A, Hendawy S, Omer E, Hammouda F, Abdel-Rahman F, i sur. (2011) Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Organically Cultivated Fennel Cultivars. *Molecules* **16(2)**, 1366-1377. doi:10.3390/molecules16021366
- Smallfield B M, van Klink JW, Perry NB, Dodds KG (2001) Coriander Spice Oil: Effects of Fruit Crushing and Distillation Time on Yield and Composition. *J Agr Food Chem* **49(1)**, 118–123. doi:10.1021/jf001024s
- Stojanović ZS, Marković S, Uskoković D (2010) Merenje raspodele veličina čestica metodom difrakcije laserske svetlosti. *Tehnika-Novi materijali* **65(5)**, 1-15.
- Stratakos AC, Koidis A (2016) Methods for extracting essential oils. U: Preedy VR (ured.) Essential oils in food preservation, flavor and safety, Academic Press, San Diego, str. 31-38.
- Strehle MA, Rösch P, Baranska M, Schulz H, Popp J (2004) On the way to a quality control of the essential oil of fennel by means of Raman spectroscopy. *Biopolymers* **77(1)**, 44-52. doi:10.1002/bip.20178
- Tandon S (2008) Distillation Technology for Essential Oils. U: Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD (ured.) Extraction technologies for medicinal and aromatic plants,

United Nations Industrial Development Organisation and the International Centre for Science and High Technology, area Science Park, Padriciano, str. 116-118.

Tongnuanchan P, Benjakul S (2014) Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *J Food Sci* **79(7)**, R1231–R1249. doi:10.1111/1750-3841.12492

Tonković P (2021) Optimiranje procesa vodene destilacije za izolaciju eteričnog ulja sjemenki komorača (Diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

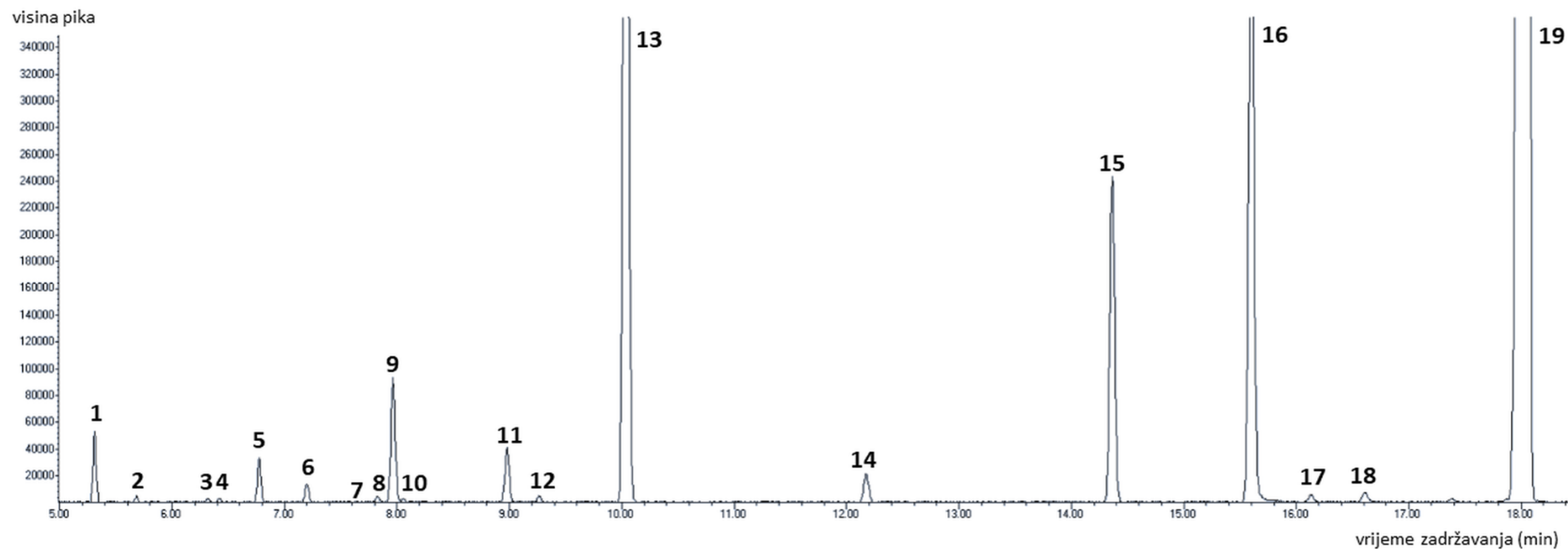
USDA (2019) Spices, fennel seed. USDA - U.S. Department of Agriculture, <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171323/nutrients>. Pristupljeno 17. listopada 2021.

Washington C (1992) Particle size analysis in pharmaceuticals and other industries, 1.izd., Elis Horwood Ltd., Chichester, str. 2-30, 71-90, 55-61.

Zhang QW, Lin LG, Ye WC (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin Med-UK* **13(1)**, 1-26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

Zuzarte M, Salgueiro L (2015) Essential oils chemistry. U: Pergentino de Sousa D (ured.) Bioactive essential oils and cancer, Springer, Cham, str. 19-61.

## 7. PRILOZI



**Prilog 1.** Kromatogram hlapljivih spojeva eteričnog ulja sjemenki komorača (uzorak A120)

(1= $\alpha$ -pinen, 2=kamfen, 3=sabinen, 4= $\beta$ -pinen, 5=mircen, 6= $\alpha$ -felandren, 7= $\alpha$ -terpinen, 8=*p*-cimen, 9=D-limonen, 10=eukaliptol, 11= $\gamma$ -terpinen, 12=*cis*-sabinen hidrat, 13=L-fenhon, 14=kamfor, 15=estragol, 16=nerol (IS), 17=karvon, 18=*p*-anisaldehid, 19=*trans*-anetol)



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Ana Marija Medved, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



---

Vlastoručni potpis