

Izolacija frakcija fenolnih spojeva iz sjemenki komorača primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku

Medved, Ana Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:344927>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij – Nutricionizam

Ana Marija Medved

7094/N

**IZOLACIJA FRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ SJEMENKI KOMORAČA PRIMJENOM
UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU**

ZAVRŠNI RAD

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

Mentor: doc. dr. sc. Maja Repajić

Zagreb, 2019.



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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

Izolacija frakcija fenolnih spojeva iz sjemenki komorača primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku

Ana Marija Medved, 0058206856

Sažetak: Komorač je bogat izvor različitih skupina fenolnih spojeva, a za povećanje učinkovitosti njihove ekstrakcije razvijaju se nove tehnike. Stoga je cilj ovog istraživanja bio optimirati uvjete izolacije hidroksicimetnih kiselina, flavonola i flavan-3-ola iz odmašćenih sjemenki gorkog komorača sukcesivnim iscrpljivanjem 30 %-tnom otopinom acetona i 30 %-tnom otopinom metanola primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (PLE) uz varirane parametre: temperatura (75 i 100 °C) te broj ciklusa (1, 2 i 3 ciklusa). Optimalni PLE uvjeti pri kojima su dobiveni najveći prinosi hidroksicimetnih kiselina bili su ekstrakcija s 30 %-tnim acetonom pri temperaturi od 100 °C i 3 ciklusa te ekstrakcija s 30 %-tnim metanolom pri 100 °C i 2 ciklusa. Najveći prinosi flavonola dobiveni su ekstrakcijom s 30 %-tnim acetonom te 30 %-tnim metanolom pri 100 °C i 3 ciklusa, dok je najveći prinos flavan-3-ola dobiven ekstrakcijom s 30 %-tnim acetonom pri 100 °C te 2 ciklusa.

Ključne riječi: flavan-3-oli, flavonoli, hidroksicimetne kiseline, komorač, PLE

Rad sadrži: 32 stranice, 13 slika, 6 tablica, 46 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Maja Repajić

Datum obrane: 7. lipnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Nutrition

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

Isolation of polyphenols fractions from fennel seeds using pressurized liquid extraction

Ana Marija Medved, 0058206856

Abstract: Fennel is a rich source of different groups of phenolic compounds and new techniques are being developed in order to increase the efficiency of their extraction. Therefore, the aim of this study was to optimize the conditions for the isolation of hydroxycinnamic acids, flavonols and flavan-3-ols from defatted bitter fennel seeds by successive exhaustion with 30 % acetone solution and 30 % methanol solution using pressurized liquid extraction (PLE) with varied parameters: temperature (75 and 100 °C) and number of cycles (1, 2 and 3 cycles). The optimal PLE conditions for obtaining the highest yields of hydroxycinnamic acids were extraction with 30 % acetone at 100 °C and 3 cycles and extraction with 30 % methanol at 100 °C and 2 cycles. The highest flavonol yields were obtained by extraction with 30 % acetone and 30 % methanol at 100 °C and 3 cycles, while the highest yield of flavan-3-ols was obtained by extraction with 30% acetone at 100 °C and 2 cycles.

Keywords: flavan-3-ols, flavonols, hydroxycinnamic acids, fennel, PLE

Thesis contains: 32 pages, 13 figures, 6 tables, 46 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Maja Repajić

Defence date: June 7, 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KOMORAČ	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV KOMORAČA	3
2.3. FENOLNI SPOJEVI KOMORAČA	4
2.3.1. FENOLNE KISELINE	4
2.3.1.1. HIDROKSICIMETNE KISELINE	4
2.3.1.2. HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE	5
2.3.2. FLAVONOIDI	6
2.3.2.1. FLAVONOLI	6
2.3.2.2. FLAVAN-3-OLI	7
2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ KOMORAČA	8
2.4.1. UBRZANA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU	9
2.4.2. UTJECAJ POLARNOSTI OTAPALA NA EKSTRAKCIJU	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJALI	11
3.1.1. SJEMENKE GORKOG KOMORAČA	11
3.1.2. KEMIKALIJE I STANDARDI	11
3.1.3. APARATURA I PRIBOR	12
3.2. METODE RADA	13
3.2.1. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA	13
3.2.2. PRIPREMA UZORKA I UVJETI EKSTRAKCIJE	14
3.2.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA	15
3.2.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOLA	16
3.2.5. ODREĐIVANJE FLAVAN-3-OLA VANILIN METODOM	18
3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE	20
4.2. UKUPNI FLAVONOLI	23
4.3. UKUPNI FLAVAN-3-OLI	25
5. ZAKLJUČAK	27
6. LITERATURA	28

1. UVOD

Komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) je višegodišnja aromatična biljka koja pripada porodici *Apiaceae*, a prema vrsti se dijeli na slatki i gorki komorač. Izvorno je biljka koja najbolje uspijeva i koja potječe iz mediteranskog podneblja, ali se u današnje vrijeme sve više kultivira u cijelome svijetu. Plodovi komorača su sjemenke duguljasta oblika. Od davnina se, uz sjemenke, koriste i ostali nadzemni dijelovi komorača u kulinarstvu i narodnoj medicini. Zbog svojih nutritivnih i funkcionalnih svojstava, komoraču se pripisuje antimikrobno, stimulatívno, karminativno, antikancerogeno te antioksidativno djelovanje.

Gorki komorač uzgaja se zbog plodova (sjemenki), eteričnog ulja te lišća koje se koristi kao začín. Kemijski sastav varira ovisno o klimi, morfotipu, porijeklu te fazi žetve. Sjemenke sadrže fitosterole, alkalioide, tanine, kumarine i fenole kao nehlapljive tvari. Od fenolnih spojeva su prisutne fenolne kiseline te flavonoidi. Najviše zastupljenje fenolne kiseline su klorogenska i ružmarinska kiselina, dok se iz skupine flavonoida izdvajaju kvercetin i apigenin.

Zbog značajnih razlika u molekularnoj strukturi i polarnosti fenolnih spojeva kao jednom od važnijih svojstava ovih molekula, sustavno se u okviru različitih znanstvenih istraživanja pristupa razvijanju jedinstvene metode koja će biti optimalna za ekstrakciju svih skupina polifenola. Uz konvencionalne metode ekstrakcije posljednjih godina razvijaju se nove, ekološki prihvatljivije metode izolacije fenolnih spojeva koje se usklađuju sa načelima zelene kemije, a neke od najčešćih su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkritičnim fluidima te ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku. U posljednje vrijeme sve se više ispituje mogućnost primjene tehnike ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (eng. *pressurized liquid extraction, PLE*). Prednosti ove metode su veća učinkovitost ekstrakcije, smanjena potrošnja energije te smanjena količina organskih otapala. Kako bi učinkovitost takve metode bila što veća, potrebno je optimirati parametre ekstrakcije kao što su temperatura, broj ciklusa i statičko vrijeme.

Zbog toga je cilj ovog rada bio odrediti optimalne uvjete izolacije hidroksicimetnih kiselina, flavonola i flavan-3-ola iz odmašćenih sjemenki gorkog komorača sukcesivnim iscrpljivanjem 30 %-tnom otopinom acetona i 30 %-tnom otopinom metanola primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku, pri čemu su varirani sljedeći uvjeti ekstrakcije: temperatura (75 i 100 °C) i broj ciklusa (1, 2 i 3 ciklusa).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOMORAČ

Komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) je dvogodišnja biljka iz porodice štitarki s aromatičnim i ljekovitim svojstvima (Malhotra, 2012). Njegova taksonomska podjela prikazana je u tablici 1. Dvije glavne vrste su slatki i gorki komorač (Seidemann, 2005). Iako se smatra autohtonom biljkom na obalama Mediteranskog mora, komorač se široko rasprostranio i u drugim dijelovima svijeta. Može se uzgajati ili rasti divlje, a najviše mu odgovara suho tlo u blizini morske obale ili obala rijeka. Komorač je uspravan i razgranat, njegovo lišće je pernato, a cvjetovi žuto-zelene boje. Može narasti i do visine od 2,5 metra. Plod predstavljaju suhe sjemenke duge 4-10 mm. One se nerijetko koriste kao začini u kulinarstvu te se vrlo često njihova aroma uspoređuje s aromom anisa. Kada su svježije, sjemenke su smeđe ili zelene boje, a starenjem se njihova boja mijenja u sivu (Rather i sur., 2016; Badgujar i sur., 2014; Díaz-Maroto i sur., 2002).

Tablica 1. Taksonomska podjela komorača (Badgujar i sur., 2014)

Carstvo	<i>Plantae</i>
Koljeno	<i>Tracheophyta</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Red	<i>Apiales</i>
Porodica	<i>Apiaceae</i>
Rod	<i>Foeniculum</i>
Vrsta	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.

Osim sjemenki, u kuhinji se tradicionalno koristi i korijen te lišće komorača. Sva tri dijela biljke mogu se konzumirati kuhani ili u svježem obliku. Najčešće se koristi kao dodatak različitim prilozima i salatama, tjestenini te povrću. U industriji se primjenjuje za aromatiziranje i poboljšavanje organoleptičkih svojstva bezalkoholnih pića, likera, pekarskih proizvoda i sladoleda. Komorač ima široku primjenu i u medicini. Zbog svojeg kemijskog

sastava ima izrazito jak antioksidacijski potencijal, a može djelovati i antimikrobno, antikancerogeno i hepatoprotektivno. Također, povoljno utječe na opuštanje mišića, stres te mučnine (Malhotra, 2012).



Slika 1. *Foeniculum vulgare* Mill. (Anonymous 1)

2.2. KEMIJSKI SASTAV KOMORAČA

Sjemenke komorača prosječno sadrže (na 100 grama): 8,8 g vode, 36,6 g ugljikohidrata, 15,7 g prehrambenih vlakana, 15,8 g proteina te 14,9 g masti. Od mikronutrijenata najzastupljeniji su kalcij, željezo, magnezij, kalij, natrij, vitamin A, niacin i riboflavin. Bitne kemijske komponente sjemenki su još škrob, tanini, eterično ulje i masne kiseline od kojih su najbitnije oleinska, linolenska te palmitinska kiselina (Bernath i sur., 1994). Eterično ulje gorkog komorača sadrži 50 % trans-anetola, 10-20 % fenkona, 10-30 % limonena, 3-11 % alfa-felandrena, 12-16 % alfa-pinena te još estragol, beta-pinen, alfa-tujen i mircen (Malhotra, 2012). Od nehlapljivih komponenti izolirani su fenolni spojevi. Među deset najbitnijih antioksidativnih spojeva, komorač sadrži kafeoilkina, dikafeoilkina i ružmarinsku kiselinu te flavonoide (Parejo i sur., 2004a,b). U sjemenkama se nalazi 0,79 % eteričnog

ulja, 5,82 % nehlapljivog ulja i 1,17 mg/g suhe tvari ukupnih fenola (El-Awadi i Hassan, 2010).

2.3. FENOLNI SPOJEVI KOMORAČA

Fenolni spojevi su široko rasprostranjeni u biljnom carstvu te predstavljaju najveću skupinu sekundarnih biljnih metabolita. Građeni su od jednog ili više aromatskih prstena koji na sebi imaju jednu ili više hidroksilnih (-OH) skupina. Danas je poznato oko 8 000 fenolnih spojeva, od jednostavnih fenolnih kiselina do polimeriziranih molekula kao što su tanini. Fenoli sudjeluju u zaštiti biljaka od ultraljubičastog zračenja, parazita ili patogena, a također utječu i na boju (Dai i Mumper, 2010). Fenolni spojevi imaju antioksidativna svojstva te kod ljudi doprinose zaštiti od kardiovaskularnih bolesti, karcinoma i dijabetesa. Dvije glavne skupine fenolnih spojeva su fenolne kiseline i flavonoidi (Vinholes i sur., 2015; Tapiero i sur., 2002).

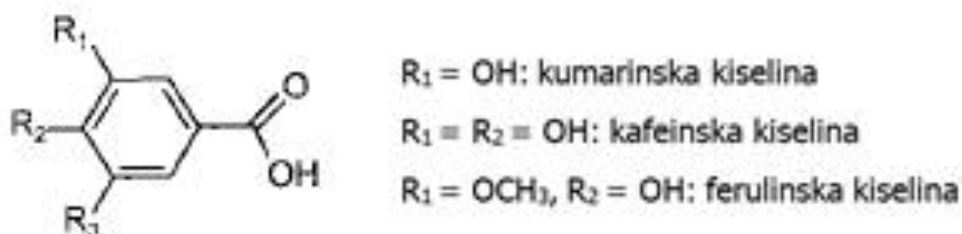
2.3.1. FENOLNE KISELINE

Fenolne kiseline pripadaju kategoriji neflavonoidnih spojeva. Dije se u dvije skupine, a to su hidroksicimetne kiseline i hidroksibenzojeve kiseline te njihovi derivati (Manach i sur., 2004). Voće i povrće sadrži velik udio slobodnih fenolnih kiselina, dok su u žitaricama i sjemenkama prisutne u vezanom obliku. Takve vezane fenolne kiseline mogu se osloboditi jedino kiselinskom ili alkalnom hidrolizom ili pomoću enzima (Tsao, 2010). Među značajnije fenolne kiseline nađene u komoraču spadaju galna, kafeinska, cimetna, klorogenska, ferulinska, vanilinska i taninska kiselina (Singh i sur., 2004).

2.3.1.1. HIDROKSICIMETNE KISELINE

Hidroksicimetne kiseline imaju jednostavnu kemijsku okosnicu koja se sastoji od fenilpropanoidne C6-C3 strukture (Teixeira i sur., 2013). Raznolikost njihove strukture ovisi o broju i položaju hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu (Vinholes i sur., 2015). Vrlo rijetko se nalaze u slobodnom obliku, osim u prerađenoj hrani koja je podvrgnuta fermentaciji, sterilizaciji ili smrzavanju (Manach i sur., 2004). Najpoznatiji derivati cimetne kiseline su kafeinska, kumarinska i ferulinska kiselina (Dai i Mumper, 2010). Prema Roby i

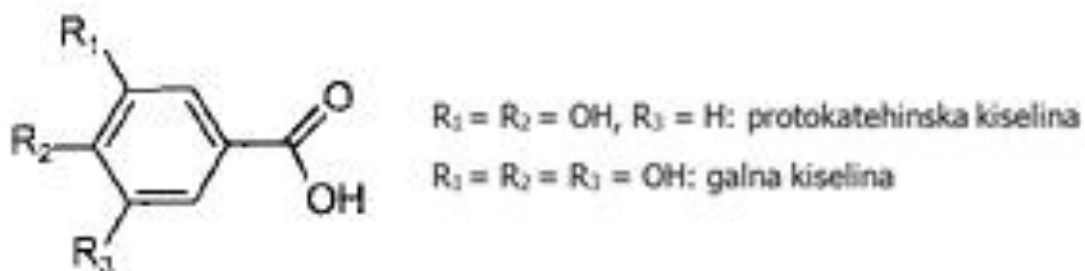
sur. (2013), komorač sadrži 6,873 % klorogenske kiseline, 4,325 % *p*-kumarinske kiseline, 2,96 % kafeinske kiseline i 3,555 % ferulinske kiseline.



Slika 2. Struktura hidroksicimetnih kiseline (Manach i sur., 2004)

2.3.1.2. HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE

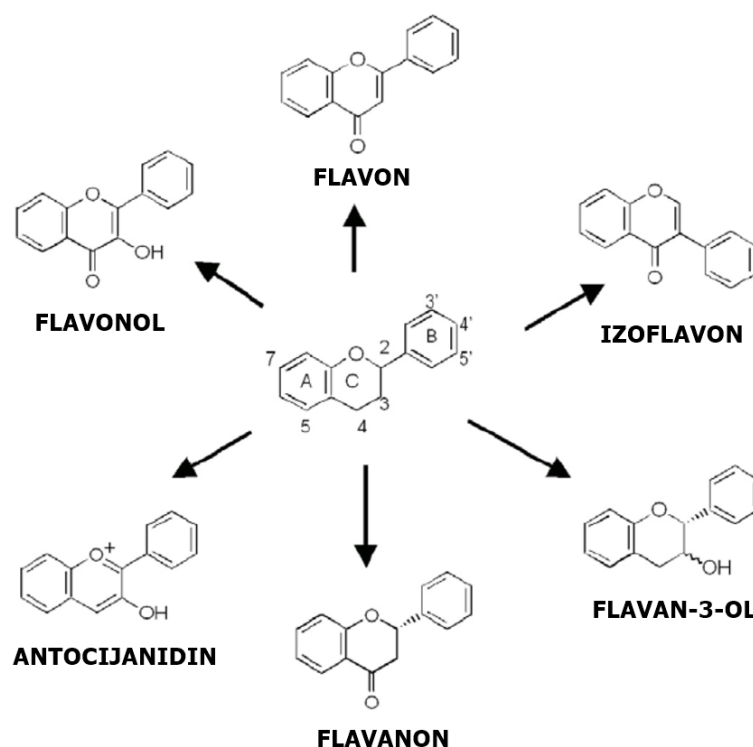
Hidroksibenzojeve kiseline se, za razliku od hidroksicimetnih kiseline, uglavnom nalaze u obliku glikozida (Herrmann i Nagel, 1989). Najpoznatiji derivat je galna kiselina (Dai i Mumper, 2010). Varijacije u strukturi hidroksibenzojevih kiseline prisutne su zbog metilacija i hidroksilacija aromatskog prstena. Mogu biti vezane za staničnu stijenku frakcije (npr. lignin) ili u topljivom obliku konjugirane sa šećerima ili organskim kiselinama (Strack, 1997). Vrlo važan izvor galne kiseline je čaj, dok komorač sadrži 0,169 %, odnosno 2,21 mg/100 g suhe tvari galne kiseline (Tomás-Barberán i Clifford, 2000; Roby i sur., 2013; Gaafar i sur., 2013).



Slika 3. Struktura hidroksibenzojevih kiseline (Manach i sur., 2004)

2.3.2. FLAVONOIDI

Flavonoidi su polifenolni sekundarni metaboliti niske molekulske mase. Njihova biosinteza započinje kondenzacijom tri molekule malonil-CoA sa *p*-kumaroil-CoA te uz pomoć enzima čalkon sintetaze nastaje spoj naringenin-čalkon. Čalkon se nakon toga izomerizira u flavanon uz prisutnost čalkon izomeraze, a put biosinteze se potom grana u nekoliko skupina flavonoida: flavone, izoflavone, flavonole, antocijanidine, flavan-3-ole te flavanone. Zahvaljujući strukturnoj i funkcionalnoj raznolikosti, ovi spojevi imaju široki spektar aktivnosti u biljkama, životinjama i mikroorganizmima (Khalid i sur., 2019).

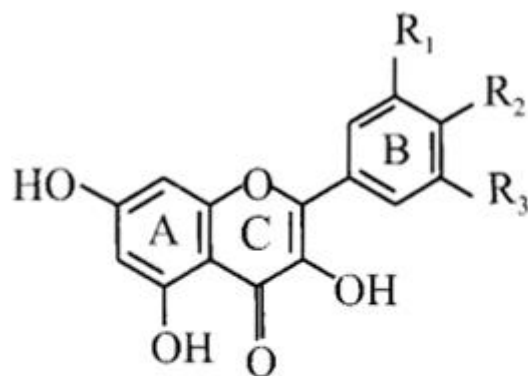


Slika 4. Osnovna struktura flavonoida i njegovih skupina (Nishiumi i sur., 2011)

2.3.2.1. FLAVONOLI

Flavonoli su najprisutniji flavonoidi u hrani, a glavni predstavnici ove skupine su kvercetin, mircetin i kempferol (Slika 5.). Uglavnom se nalaze u glikoliziranom obliku, najčešće s glukozom ili ramnozom kao vezanom šećernom skupinom. Nakupljaju se u vanjskom dijelu biljke jer je njihova biosinteza stimulirana svjetlom. Zbog različite izloženosti sunčevoj svjetlosti postoje razlike u koncentraciji flavonola između voćnih plodova na istom stablu te

čak i s različitih strana jednog ploda (Price i sur., 1995). Flavonoli su u najvećim koncentracijama prisutni u luku, poriluku, brokuli i borovnici (Manach i sur., 2004). U komoraču je pronađeno 9,71 mg/100 g suhe tvari mircetina te 2,63 mg/100 g suhe tvari kvercetina (Gaafar i sur., 2013).



Mircetin $R_1=R_2=R_3=OH$

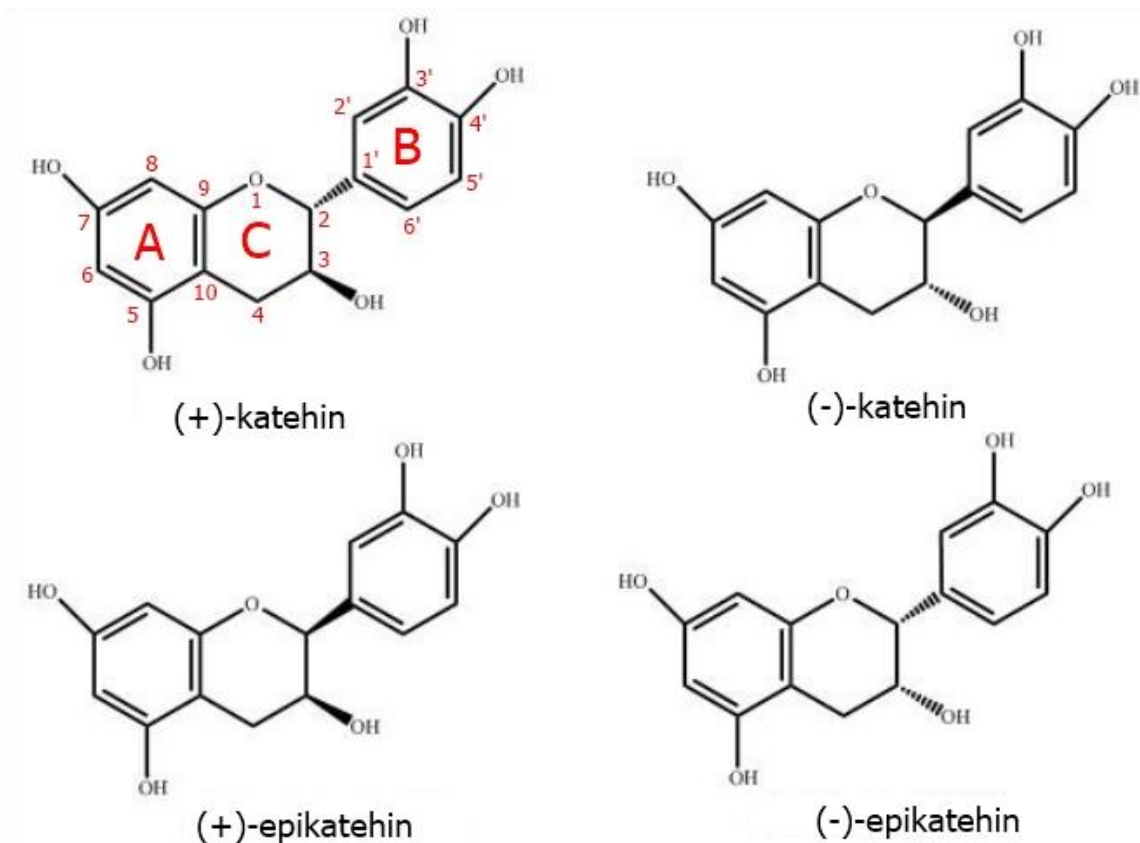
Kvercetin $R_1=R_2=OH, R_3=H$

Kempferol $R_2= OH, R_1=R_3=H$

Slika 5. Kemijska struktura glavnih predstavnika flavanola (Jakobek i sur., 2007)

2.3.2.2. FLAVAN-3-OLI

Flavan-3-oli ili flavanoli postoje u obliku monomera (katehina) te polimera (proantocijanidina) (Manach i sur., 2004). Ne posjeduju dvostruku vezu između C2 i C3, te nemaju karbonilnu skupinu na C4 u C prstenu flavanola (Slika 6.). Takva struktura i hidroksilacija na C3 im omogućuje dva kiralna središta na molekuli, zbog čega onda postoje četiri moguća diastereomera. Katehin je izomer s trans konfiguracijom, a epikatehin je izomer s cis konfiguracijom. Obje konfiguracije imaju po dva stereoizomera (Tsao, 2010). Oni su jedna od najčešće konzumiranih vrsta flavonoida te su njihovi prehrambeni izvori vrlo različiti, od čajeva do voća i povrća (Bai i sur., 2014; Otaki i sur., 2009). U komoraču je detektiran katehin kao predstavnik ove skupine spojeva (Allaithy, 2017).



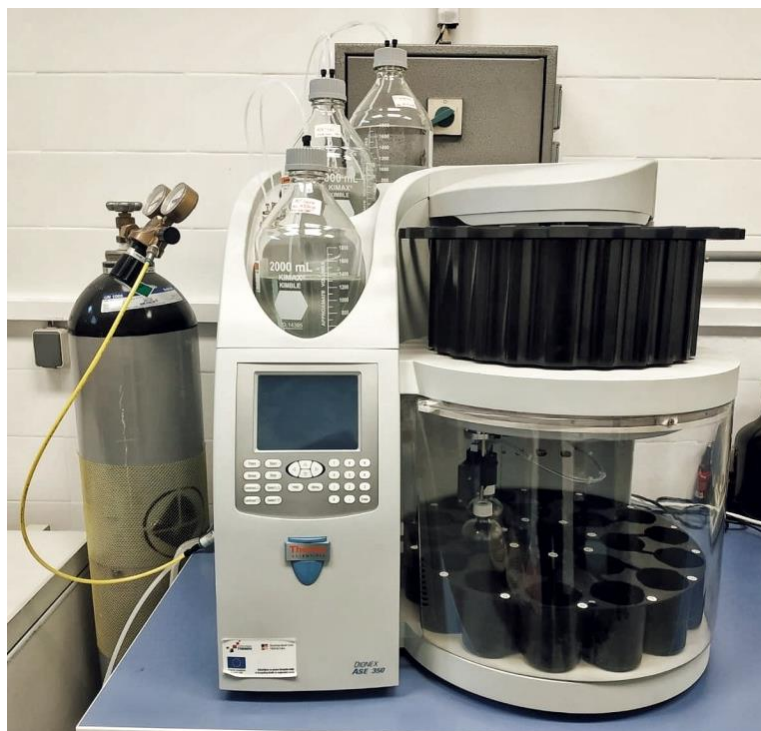
Slika 6. Kemijska struktura stereoizomera katehina i epikatehina (Silva i Costa, 2014)

2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA IZ KOMORAČA

Priprema i ekstrakcija fenolnih spojeva ovisi o njihovim kemijskim svojstvima te prirodi uzorka. Kemijska svojstva odnose se na koncentraciju jednostavnih i složenih polifenolnih spojeva, molekulske strukturi, polarnosti te broju aromatskih prstena i hidroksilnih skupina. Kompleksi s ugljikohidratima, proteinima i drugim elementima mogu dodatno otežati potpunu ekstrakciju nekih fenola. Također, za uzorke koji sadrže lipide mogu se primijeniti procesi odmaščivanja kako bi se uklonilo ulje, a najčešće korišteno otapalo za to jest heksan (Khoddami i sur., 2013). Raznolikosti u strukturi spojeva i nedostatak odgovarajućih standarda rezultiraju otežanom analizom fenolnih spojeva u biljnim uzorcima (Huang i sur., 2007). Zbog toga se u današnje vrijeme sve više koriste moderne ekstrakcijske metode koje, uz olakšavanje izolacije određenih spojeva, imaju i mnoge druge benefite. Neke od najčešćih modernijih metoda su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkričnim fluidima te ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (Zhang i sur., 2018).

2.4.1. UBRZANA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *accelerated solvent extraction, ASE*) je automatizirana ekstrakcija čvrstih i polučvrstih uzoraka. Proces ekstrakcije provodi se pri temperaturama višim od temperature vrenja otapala, što zahtijeva da tlak unutar ćelije bude visok (~ 10 MPa) kako bi se otapalo održalo u tekućem stanju. Visoka temperatura (do 200 °C) doprinosi većoj topljivosti i većoj brzini difuzije otopljenih tvari u otapalu (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001; Dean, 1998). Uređaj za ovakvu vrstu ekstrakcije omogućuje istovremeno ekstrahiranje 24 uzorka čije mase mogu biti u rasponu od 1 do 100 grama. Metoda je vrlo slična Soxhlet ekstrakciji. Međutim, njezine prednosti nad Soxhlet ekstrakcijom su velike. ASE omogućava kraće vrijeme ekstrakcije, koje je s 18 sati smanjeno na samo 22 minute. Također, učinkovitost je veća, smanjena je potrošnja energije te količina organskih otapala na 80 mL ili manje, a samim time je smanjena i količina stvaranja otpada (Raut i sur., 2015).



Slika 7. Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku Dionex™ ASE™ 350 (osebna fotografija)

2.4.2. UTJECAJ POLARNOSTI OTAPALA NA EKSTRAKCIJU

Polifenolni spojevi su zbog svoje kemijske strukture i interakcije s drugim sastojcima hrane podložni zahtjevnijim postupcima ekstrakcije. Neki od faktora koji utječu na učinkovitost ekstrakcije takvih spojeva su temperatura, vrijeme ekstrakcije, veličina čestica te polarnost otapala. Polarnost polifenola je širokog raspona, od polarnih do nepolarnih spojeva pa su zbog toga za njihovu ekstrakciju potrebna i otapala različitih polarnosti (Dent i sur., 2013). ASE sustav uključuje korištenje širokog raspona otapala, osim onih koje su samozapaljujuće pri temperaturama od 40-200 °C (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001).

Heksan je otapalo koje zbog svoje nepolarnosti, izvrsne sposobnosti otapanja i uske točke vrenja (63-69 °C), ima široku upotrebu u ekstrakciji ulja, odnosno odmašćivanju uzoraka (Liu i Mamidipally, 2005). Vodene otopine acetona su vrlo dobra otapala za polarne polifenolne spojeve i spojeve većih molekulskih masa, ali i druge antioksidanse (Dai i Mumper, 2010). Metanol je polarno otapalo te se, prilikom ekstrakcije polifenola, pokazao najviše učinkovit za polifenolne spojeve niskih molekulskih masa (Do i sur., 2014).

Acetonski ekstrakt sjemenki komorača bogatiji je fenolima, dok metanolni ekstrakt sadrži veće količine flavonoida (Goswami i Chatterjee, 2014).

Tablica 2. Polarnost otapala (Anonymous 2)

OTAPALO	INDEKS POLARNOSTI	DIELEKTRIČNA KONSTANTA
Voda	10,2	80,1
Metanol	5,1	32,7
Aceton	5,1	20,7
Heksan	0,1	1,88

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. SJEMENKE GORKOG KOMORAČA

Za istraživanje su korištene suhe sjemenke gorkog komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) nabavljene od tvrtke SUBAN d.o.o. (Samobor, Hrvatska). Neposredno prije ekstrakcije, sjemenke komorača usitnjene su pomoću električnog mlinca te se tako dobiveni uzorak koristi za ekstrakciju fenolnih spojeva.

3.1.2. KEMIKALIJE I STANDARDI

- Heksan, 95 %-tni
- 30 % vodena otopina acetona (v/v)
Priprema: U odmjernu tikvicu od 1 L doda se 300 mL 100 %-tnog acetona i razrijedi do oznake destiliranom vodom.
- 30 % vodena otopina metanola (v/v)
Priprema: U odmjernu tikvicu od 1 L doda se 300 mL 100 %-tnog metanola i razrijedi do oznake destiliranom vodom.
- Dijatomejska zemlja
- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37 %-tna
- Etanol, 96 %-tni
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g/L HCl (u 96 % etanolu)
Priprema: 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni etanolom (96 %) do oznake.
- Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g/L HCl
Priprema: 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37 %) otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Standard klorogenske kiseline (100 mg/L)
Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda klorogenske kiseline u koncentraciji 100 mg/L. Odvaži se 10 mg standarda klorogenske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.
- Standard kvercetina (100 mg/L)

Priprema: Najprije se pripremi otopina standarda kvercetina u koncentraciji 100 mg/L. Odvažuje se 10 mg standarda kvercetina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

- Metanol, 100 %-tni
- 1 %-tna metanolna otopina vanilina

Priprema: 1 g vanilina se dodaje u odmjernu tikvicu od 100 ml i nadopuni 100 %-tnim metanolom do oznake.

- Koncentrirana 96 %-tna sumporna kiselina (H_2SO_4)
- 25 %-tna otopina sumporne kiseline

Priprema: 13,02 mL 96 %-tne sumporne kiseline prenese se u odmjernu tikvicu od 50 mL u koju je prethodno dodano malo 100 %-tnog metanola (cca 20 mL). Tikvica se obavezno drži u hladnoj vodenoj kupelji, a konc. sumporna kiselina se dodaje u malim obrocima. Po dodatku cijelog volumena kiseline, tikvica se do oznake nadopuni 100 %-tnim metanolom.

- Standard katehina (5 g/L)

Priprema: Odvažuje se 500 mg standarda katehina u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 100 %-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni metanolom.

3.1.3. APARATURA I PRIBOR

Aparatura:

- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern, Njemačka)
- Analitička vaga (AX224, Ohaus, SAD)
- Sustav za ubrzanu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku (Dionex ASE 350, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Električni mlinac (GT11, Tefal, Francuska)
- Spektrofotometar (UV-1600PC, VWR, Belgija)
- Ultrazvučna kupelj (DT 512 H, Bandelin, Njemačka)
- Vortex (MS 2 Minishaker, Ika, SAD)

Pribor:

- Celulozni filteri za ekstrakciju
- Čelije za ekstrakciju od nehrđajućeg čelika volumena 34 mL
- Menzure, volumena 100 mL i 1 L
- Mikropipete, volumena 100 μ L i 1000 μ L
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 25 mL i 100 mL
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL
- Plastična čašica
- Plastična ladica za vaganje
- Plastična žličica
- Plastične kivete
- Staklene boce
- Staklene epruvete
- Staklene kivete
- Stakleni lijevak
- Stalak za epruvete

3.2. METODE RADA

3.2.1. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz uzoraka sjemenki gorkog komorača provedena je uzastopnom frakcijskom ekstrakcijom primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku na uređaju Dionex ASE 350, uz prisutnost otapala različite polarnosti: heksan, aceton i metanol. Najprije je provedena ekstrakcija nepolarnim otapalom heksanom radi uklanjanja lipidne frakcije. Nakon toga su odmašćeni uzorci ekstrahirani polarnim otapalima i to slijedom povećanja polarnosti otapala, odnosno prva frakcija fenolnih spojeva ekstrahirana je pomoću vodene otopine acetona (30 %), nakon čega je slijedila frakcija ekstrahirana pomoću vodene otopine metanola (30 %). Na opisani način dobiveno je ukupno 12 ekstrakata fenolnih spojeva. Nakon provedene ekstrakcije, u dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su određeni ukupne hidroksicimete kiseline, ukupni flavonoli te ukupni flavan-3-oli.

3.2.2. PRIPREMA UZORKA I UVJETI EKSTRAKCIJE

Na analitičkoj vagi u plastičnoj čašici odvažuje se približno 8 g usitnjenih sjemenki komorača. U čašicu se doda i jedna mjerica dijatomejske zemlje (~ 1,5 g) u svrhu poboljšanja ekstrakcije te se sve dobro promiješa plastičnom žličicom. U ćelije za ekstrakciju stave se po dva celulozna filtera te prethodno promiješana smjesa sjemenki komorača i dijatomejske zemlje. Ćelije se nakon toga ručno zatvore. Prije same ekstrakcije, otapala za ekstrakciju odzračuje se u ultrazvučnoj kupelji 30 minuta. Na gornji dio uređaja Dionex ASE 350 zatim se postavlja šest pripremljenih ekstrakcijskih ćelija, a u donji dio uređaja postavi se šest staklenih bočica koje služe za sakupljanje ekstrakta. Pripremljeni uzorci prvo su podvrgnuti ekstrakciji s 95 %-tnim heksanom, radi odmašćivanja. Nakon toga, provedena je ekstrakcija istih uzoraka 30 %-tnom vodenom otopinom acetona, a zatim 30 %-tnom vodenom otopinom metanola pri različitim temperaturama i broju ciklusa ekstrakcije u cilju optimiranja uvjeta ekstrakcije bioaktivnih spojeva. Fiksni uvjeti ekstrakcije bili su: statičko vrijeme (eng. *static time*) 5 minuta, tlak ~ 10 MPa, ispiranje (eng. *rinse*) 50 % te propuhivanje (eng. *purge*) 30 s. Tablica 2. prikazuje varirane uvjete ekstrakcije.

Tablica 3. Eksperimentalni plan pokusa ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz sjemenki gorkog komorača primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku

OTAPALO	OZNAKA UZORKA	TEMPERATURA (°C)	BROJ CIKLUSA
30 % ACETON	A1	75	1
	A2	75	2
	A3	75	3
	A4	100	1
	A5	100	2
	A6	100	3
30 % METANOL	M1	75	1
	M2	75	2
	M3	75	3
	M4	100	1
	M5	100	2
	M6	100	3

Ekstrakti s acetonom i metanolom su prebačeni u odmjerne tikvice od 50 mL, dopunjeni otapalom do oznake te pohranjeni na +4 °C do provođenja analiza, a ekstrakti s heksanom su pripremljeni na odgovarajući način za analizu sastava masnih kiselina, što nije predmet ovog rada.

3.2.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH HIDROKSICIMETNIH KISELINA

Princip metode

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se u acetonskom i metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm (Howard et al., 2003).

Priprema ekstrakta

Ekstrakti u kojima se određuju ukupne hidroksicimetne kiseline dobiveni su ubrzanom ekstrakcijom otapalima pri povišenom tlaku na način opisan u poglavlju 3.2.1. Prije provedbe analize, uzorci se termostatiraju 30 min pri sobnoj temperaturi. Za određivanja koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina, sve uzorke koji su ekstrahirani acetonom potrebno je razrijediti 5 puta korištenjem ekstrakcijskog otapala (30 %-tni aceton), dok uzorke ekstrahirane 30 %-tnim metanolom nije potrebno razrijediti.

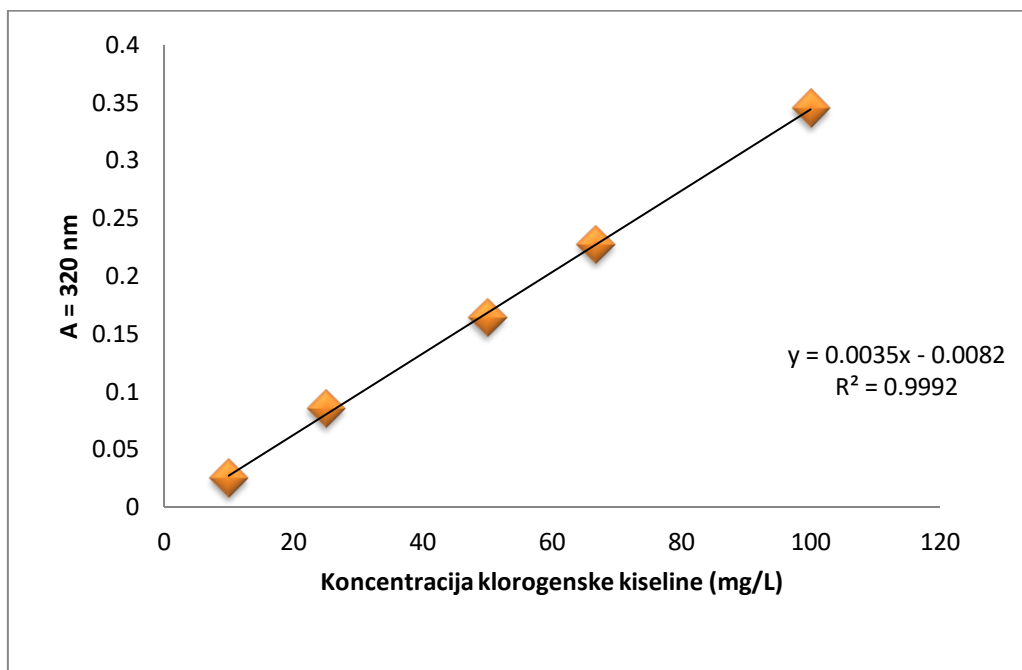
Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL ekstrakta, 250 µL 1 g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.

Izrada baždarnog pravca

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66,7 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 1, 2,5, 5 i 6,67 mL i nadopuni 80 %-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80 %-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μ L otopine standarda, 250 μ L 1 g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm.



Slika 8. Baždarni pravac za klorogensku kiselinu

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0035X - 0,0082$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 320 nm,

X – koncentracija klorogenske kiseline (mg/L)

3.2.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOLA

Princip metode

Određivanje se provodi u acetonskom i metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 360 nm (Howard et al., 2003).

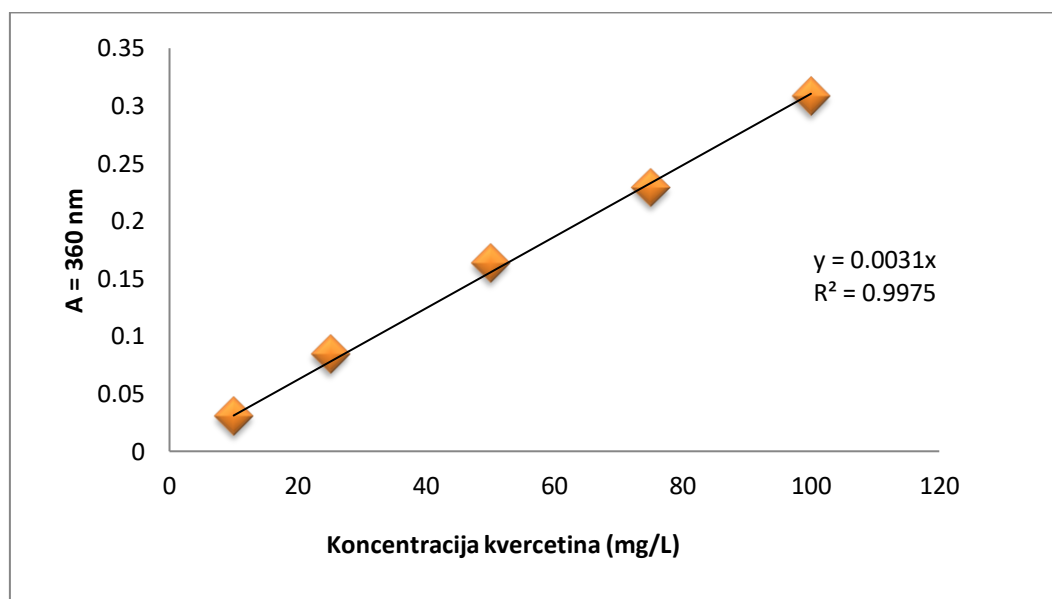
Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μ L ekstrakta, 250 μ L 1g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 320 i 360 nm. Na isti se način pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca

Kvantifikacija ukupnih flavonola provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin. Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 2,5, 5, 10, 25, i 50 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 0,25, 0,5, 1, 2,5 i 5 mL i nadopuni 100 %-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti se način pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100 %-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μ L otopine standarda, 250 μ L 1g/L HCl u 96 % etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm.



Slika 9. Baždarni pravac za kvercetin

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,0031 X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 360 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L).

3.2.5. ODREĐIVANJE FLAVAN-3-OLA VANILIN METODOM

Princip metode

Princip određivanja flavan-3-ola temelji se na specifičnosti spojeva iz skupine flavan-3-ola da reagiraju s vanilinom uslijed čega nastaju obojeni spojevi koji se kvantitativno određuju mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 500 nm (Sun et al., 1998).

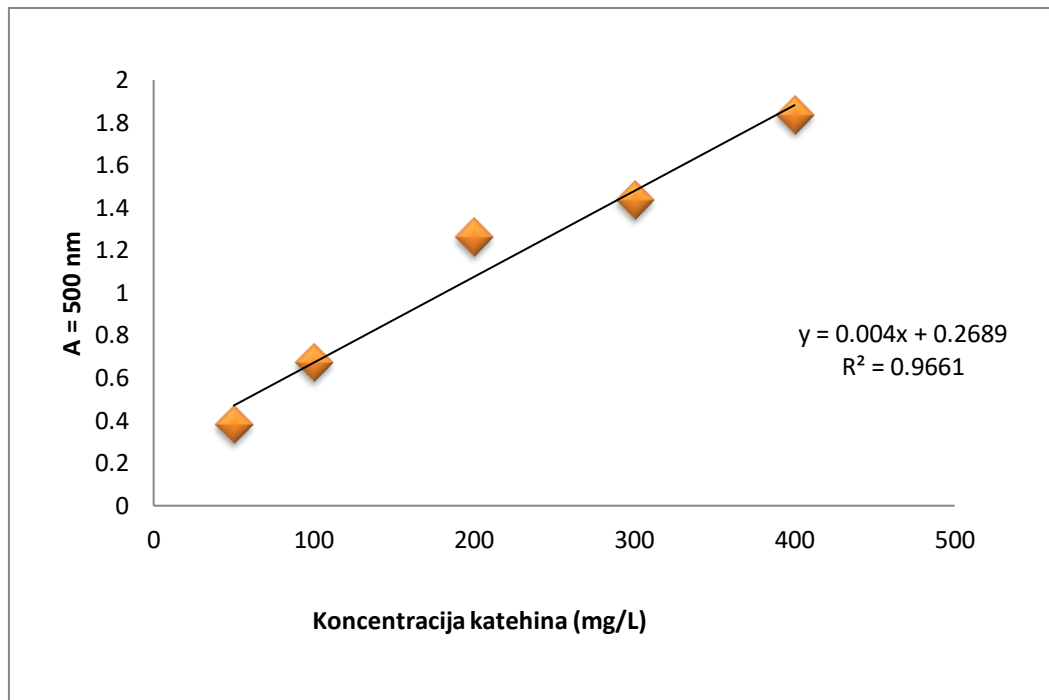
Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 2,5 mL 1 %-tne otopine vanilina, 2,5 mL 25 %-tne otopine H₂SO₄ i 1 mL ekstrakta. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 500 nm. Na isti se način pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se alikvotna otopina standarda katehina koncentracije 5g/L (500 mg/100 mL). Od te otopine prirede se slijedeća razrijeđenja: 50, 100, 200, 300 i 400 mg/100 mL na način da se otpipetira redom: 1, 2, 4, 6 i 8 mL alikvotne otopine u odmjerne tikvice od 10 mL, te se do oznake nadopune 100 %-tnim metanolom.

Iz svake tikvice otpipetira se 1 mL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje 2,5 mL 1 %-tne otopine vanilina i 2,5 mL 25 %-tne otopine H₂SO₄. Uzorci se ostave stajati 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 500 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima metanol.



Slika 10. Baždarni pravac za katehin

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$Y = 0,004X + 0,2689$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 500 nm,

X – koncentracija katehina (mg/L).

3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Eksperimenti su dizajnirani kao puni faktorijalni dizajn. Nezavisne varijable bile su: temperatura ekstrakcije (75 i 100 °C) i broj ciklusa ekstrakcije (1, 2 i 3). Kao zavisne varijable promatrane su: udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina (mg/100 g), ukupnih flavonola (mg/100 g) i flavan-3-ola (mg/100 g). Za usporedbu uzoraka korištena je multivarijantna analiza varijance (MANOVA), pri čemu je statistički značajna razlika razmatrana na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U radu su prikazani rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih hidroksicimetnih kiselina, ukupnih flavonola te ukupnih flavan-3-ola u ekstraktima odmašćenih sjemenki komorača dobivenim sukcesivnim iscrpljivanjem 30 %-tnom otopinom acetona i 30 %-tnom otopinom metanola primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (PLE). Cilj je bio optimirati PLE uvjete (temperatura i broj ciklusa) za izolaciju fenolnih spojeva sjemenki komorača.

4.1. UKUPNE HIDROKSICIMETNE KISELINE

Tablica 4. Utjecaj temperature ekstrakcije i broja ciklusa na udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina (mg/100 g) u ekstraktima sjemenki gorkog komorača s 30 %-tnim acetonom i 30 %-tnim metanolom

Izvor varijacije	Ukupne hidroksicimetne kiseline (mg/100 g)	
	Aceton	Metanol
Temperatura (°C)	$p \leq 0,01^*$	$p \leq 0,01^*$
75	296,93±5,35	66,25±1,33
100	342,85±5,35	46,59±1,33
Broj ciklusa	$p \leq 0,01^*$	$p \leq 0,01^*$
1	295,26±6,55	49,72±1,63
2	314,54±6,55	68,43±1,63
3	349,87±6,55	51,11±1,63
Prosječna vrijednost	319,89	56,42

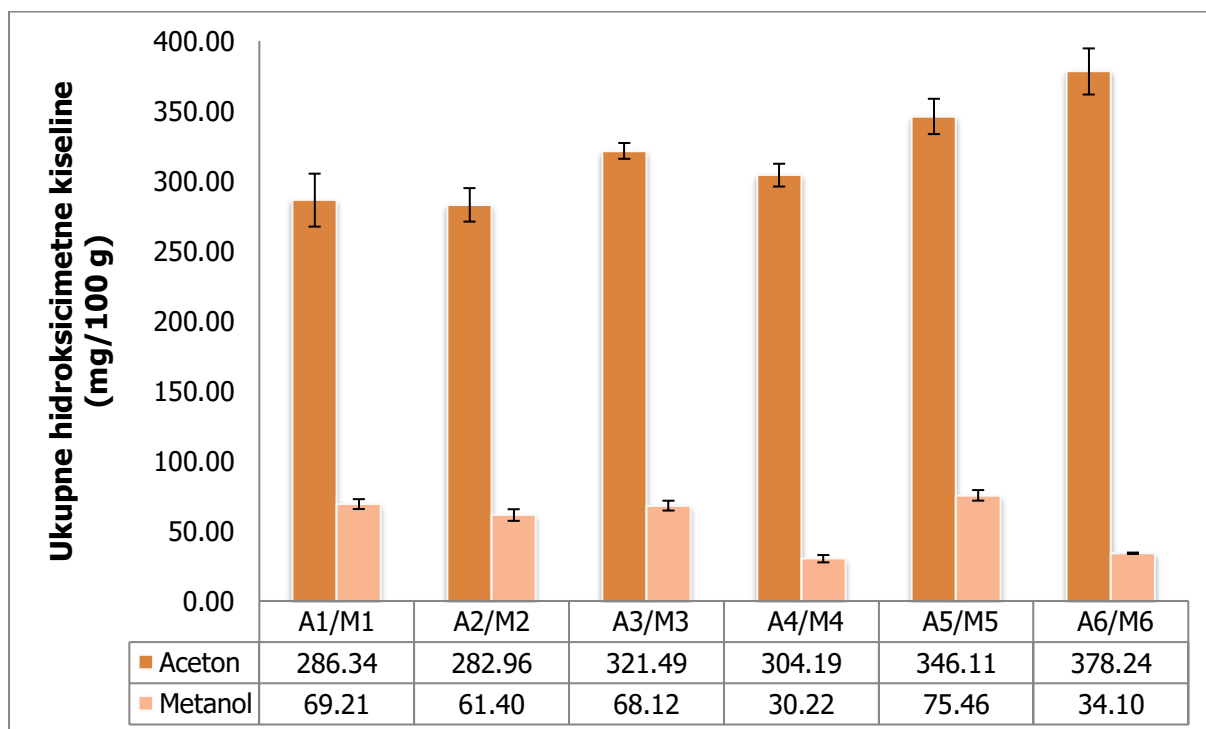
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna pogreška.

*Statistički značajna varijacija kod $p \leq 0,05$.

Tablica 4 prikazuje statistički obrađene podatke o utjecaju temperature i broja ciklusa na udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima sjemenki gorkog komorača s 30

%-tnim acetonom i 30 %-tnim metanolom. Rezultati prikazuju da temperatura i broj ciklusa imaju signifikantan utjecaj na udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u spomenutim ekstraktima. Prema podacima, optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih hidroksicimetnih kiselina u sjemenkama gorkog komorača pri kojima se dobivaju najveći prinosi su sljedeći:

- ekstrakcija s 30 %-tnim acetonom pri temperaturi od 100 °C te 3 ciklusa
- ekstrakcija s 30 %-tnim metanolom pri temperaturi od 100 °C te 2 ciklusa.



Slika 11. Udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u ekstraktima sjemenki gorkog komorača s 30 %-tnim acetonom i 30 %-tnim metanolom

Slika 11 prikazuje udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina u acetonskim i metanolnim ekstraktima sjemenki komorača izraženih kao srednja vrijednost dvaju paralela. Koncentracije u acetonskim ekstraktima kreću se u rasponu od 282,96 - 378,24 mg/100 g s prosječnom vrijednosti od 319,89 mg/100 g. Najviša koncentracija hidroksicimetnih kiselina određena je u uzorku A6, a najniža u uzorku A2. U metanolnim ekstraktima najviša koncentracija zabilježena je u uzorku M5 te iznosi 75,46 mg/100 g, dok je najniža koncentracija u vrijednosti 30,22 mg/100 g određena u uzorku M4. Prosječna vrijednost koncentracija hidroksicimetnih kiselina u metanolnom ekstraktu je 56,42 mg/100 g. Potrebno je naglasiti da se kao metoda koristila frakcijska ekstrakcija, odnosno da je nakon ekstrakcije

acetonom na istim uzorcima slijedila ekstrakcija metanolom. Metanol je, kao polarnije otapalo od acetona, još dodatno ekstrahirao preostale komponente iz uzorka sjemenki komorača.

Gaafar i sur. (2013) su u svojem istraživanju određivali fenolne spojeve slatkog komorača u ekstraktima s 80 %-tnim metanolom. Spojeve su identificirali pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography, HPLC*). U ekstraktima komorača određene su klorogenska kiselina (122,76 mg/100 g suhe tvari), kafeinska kiselina (15,99 mg/100 g suhe tvari) te ferulinska kiselina (1,63 mg/100 g suhe tvari). Križman i sur. (2007) također su pomoću HPLC metode identificirali fenolne spojeve, ali u ekstraktima s 20 %-tnim metanolom. U njihovom istraživanju određene su sljedeće hidroksicimetne kiseline: 3-kafeoilkina kiselina, klorogenska kiselina, 4-kafeoilkina, 1,3-dikafeoilkina kiselina, 1,5-dikafeoilkina kiselina i 1,4-dikafeoilkina kiselina. U najvišoj koncentraciji bila je prisutna 1,4-dikafeoilkvinska kiselina (377,8 mg/100 g suhe tvari), dok je najmanje bilo 3-kafeoilkvinske kiseline (13,7 mg/100 g suhe tvari). Ako se hidroksicimetne kiseline u navedenim istraživanjima promatraju kao ukupne hidroksicimetne kiseline, može se zaključiti da rezultati nisu u skladu s onima dobivenim u ovom istraživanju. Mogući razlozi tome mogu biti korištenje različitih metoda, otapala i uvjeta ekstrakcije, različitih vrsta i dijelova komorača te izražavanje koncentracije hidroksicimetnih kiselina s obzirom na suhu tvar.

4.2. UKUPNI FLAVONOLI

Tablica 5. Utjecaj temperature ekstrakcije i broja ciklusa na udio ukupnih flavonola (mg/100 g) u ekstraktima sjemenki gorkog komorača s 30 %-tnim acetonom i 30 %-tnim metanolom

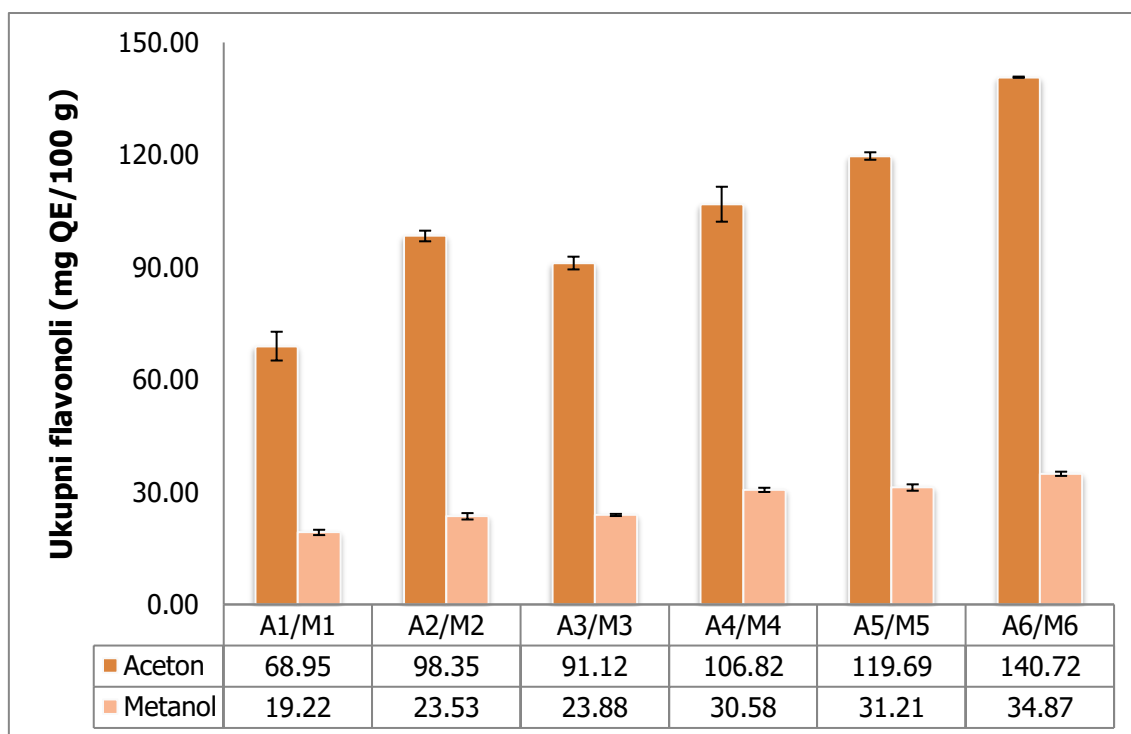
Izvor varijacije	Ukupni flavonoli (mg/100 g)	
	Aceton	Metanol
Temperatura (°C)	$p \leq 0,01^*$	$p \leq 0,01^*$
75	86,14±1,09	22,21±0,27
100	122,41±1,09	32,22±0,27
Broj ciklusa	$p \leq 0,01^*$	$p \leq 0,01^*$
1	87,88±1,33	24,90±0,33
2	109,02±1,33	27,37±0,33
3	115,92±1,33	29,38±0,33
Prosječna vrijednost	104,27	27,22

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna pogreška.

**Statistički značajna varijacija kod $p \leq 0,05$.*

U tablici 5 prikazani su rezultati statističke obrade podataka o utjecaju temperature i broja ciklusa na udio ukupnih flavonola u ekstraktima sjemenki gorkog komorača s 30 %-tnim acetonom i 30 %-tnim metanolom. Prema statističkoj analizi, temperatura i broj ciklusa signifikantno utječu na udio ukupnih flavonola u navedenim ekstraktima. Optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih flavonola u sjemenkama gorkog komorača pri kojima se dobivaju najveći prinosi su:

- ekstrakcija s 30 %-tnim acetonom pri temperaturi od 100 °C te 3 ciklusa
- ekstrakcija s 30 %-tnim metanolom pri temperaturi od 100 °C te 3 ciklusa.



Slika 12. Udio ukupnih flavonola u ekstraktima sjemenki gorkog komorača s 30 %-tnim acetonom i 30 %-tnim metanolom

Na slici 12 prikazane su srednje vrijednosti dviju paralela dobivenih spektrofotometrijskim određivanjem ukupnih flavonola u acetonskom i metanolnom ekstraktu sjemenki komorača. Najnižu koncentraciju u vrijednosti od 68,95 mg/100 g u acetonskom ekstraktu ima uzorak A1. Najviša koncentracija određena je u uzorku A6 i iznosi 140,72 mg/100 g, dok je prosječna vrijednost za acetonske ekstrakte 104,27 mg/100 g. U metanolnim ekstraktima koncentracije se kreću od 19,22 - 34,87 mg/100 g uz prosječnu vrijednost 27,22 mg/100 g. Metanolni ekstrakti prate trend pa je tako najniža koncentracija ukupnih flavonola određena u uzorku M1, a najviša u uzorku M6.

Dua i sur. (2013) u svom su istraživanju odredili 782 mg kvercetina/100 g suhe tvari te 92,9 mg kempferola/100 g suhe tvari u sjemenkama komorača. Sjemenke su bile podvrgnute ekstrakciji s 80 %-tnim metanolom, a polifenolni spojevi određeni pomoću HPLC metode. Gledajući navedene spojeve kao ukupne flavonole, rezultat je bitno viši od onog dobivenog u ovom radu. Pricina i Karklina (2014) istraživale su fenolne spojeve različitih biljaka u ekstraktima s acetonom i etanolom, koji su identificirani spektrofotometrijski. Koncentracija ukupnih flavonola za peršin bila je $60,01 \pm 0,45$ mg RE/100 g suhe tvari, a za kopar $376,76 \pm 0,69$ mg RE/100 g suhe tvari. Obzirom da peršin i kopar pripadaju porodici *Apiaceae*,

kao i komorač, njihovi ukupni flavonoli uspoređeni su s onima u ovom radu. Razlike u rezultatima moguće su zbog korištenja drugačijih metoda ekstrakcije i identifikacije flavonola, upotreba različitih otapala, različito podrijetlo sjemenki te u konačnici usporedba rezultata s drugim vrstama biljaka iz iste porodice.

4.3. UKUPNI FLAVAN-3-OLI

Tablica 6. Utjecaj temperature ekstrakcije i broja ciklusa na udio ukupnih flavan-3-ola (mg/100 g) u ekstraktima sjemenki gorkog komorača s 30 %-tnim acetonom

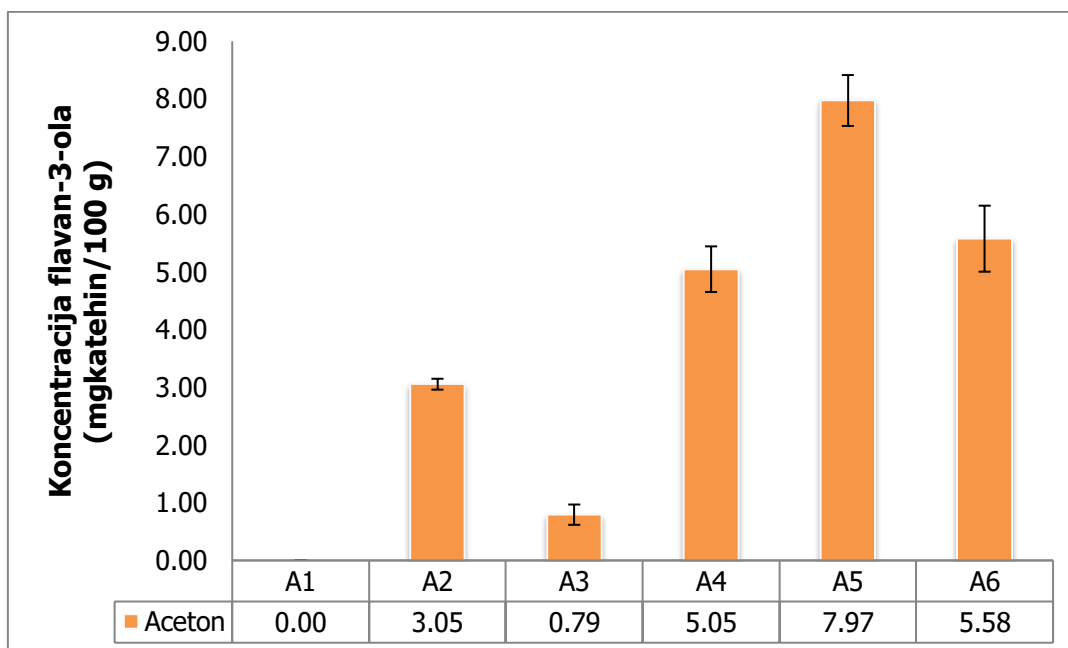
Izvor varijacije	Ukupni flavan-3-oli (mg/100 g)
	Aceton
Temperatura (°C)	$p \leq 0,01^*$
75	$1,36 \pm 0,76$
100	$6,20 \pm 0,76$
Broj ciklusa	$p = 0,14$
1	$2,52 \pm 0,93$
2	$5,51 \pm 0,93$
3	$3,30 \pm 0,93$
Prosječna vrijednost	3,78

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

**Statistički značajna varijacija kod $p \leq 0,05$.*

Tablica 6 prikazuje rezultate statističke obrade podataka o utjecaju temperature i broja ciklusa na udio ukupnih flavan-3-ola u ekstraktima sjemenki gorkog komorača s 30 %-tnim acetonom. Temperatura ima signifikantan utjecaj na udio ukupnih flavan-3-ola u acetonskom ekstraktu, za razliku od broja ciklusa koji nema signifikantan utjecaj. Optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih flavan-3-ola u sjemenkama gorkog komorača pri kojima se dobivaju najveći prinosi su:

- ekstrakcija s 30 %-tnim acetonom pri temperaturi od 100 °C te 2 ciklusa.



Slika 13. Udio ukupnih flavan-3-ola u ekstraktima sjemenki gorkog komorača s 30 %-tnim acetonom

Srednje vrijednosti koncentracije ukupnih flavan-3-ola u acetonskom ekstraktu prikazane su na slici 13. Koncentracije se kreću u rasponu od 0,79 mg/100 g u uzorku A3 do 7,97 mg/100 g u uzorku A5, s prosječnom vrijednosti od 3,78 mg/100g. U uzorku A1 flavan-3-oli nisu određeni. Također, određivanje flavan-3-ola provedeno je i u svim metanolnim ekstraktima, ali niti u jednom nisu određeni navedeni spojevi. Allaithy (2017) je u svom radu pomoću HPLC-a u metanolnim ekstraktima sjemenki komorača detektirala 1,736 mg/100 g katehina. Rezultat se ne razlikuje mnogo od onoga dobivenog u ovom radu, ali treba uzeti u obzir da se ne radi o ukupnim flavan-3-olima, već o samo jednom spoju unutar te skupine. Ukupni flavan-3-oli u svježim uzorcima biljaka iz porodice *Apiaceae* (peršin i kopar) nisu identificirani, dok je u sušenim uzorcima njihova koncentracija iznosila $5769,96 \pm 23,84$ mg CE/100 g suhe tvari za peršin te $5194,86 \pm 41,81$ mg CE/100 g suhe tvari za kopar (Pricina i Karklina, 2014). Rezultati su znatno viši od onih dobivenih u ovom radu zbog mogućih razlika u metodama ekstrakcije i otapalima koja su za nju korištena, različitim metodama identifikacije flavan-3-ola te različitim vrstama biljaka.

5. ZAKLJUČAK

1. Primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku sukcesivnim iscrpljivanjem u prvoj su fazi, odnosno u acetonskim ekstraktima odmašćenih sjemenki komorača izolirani fenolni spojevi s prosječnim vrijednostima 319,89 mg/100 g za ukupne hidroksicimetne kiseline, 104,27 mg/100 g za ukupne flavonole te 3,78 mg/100 g za ukupne flavan-3-ole, dok su u drugoj fazi u metanolnim ekstraktima odmašćenih sjemenki komorača izolirani fenolni spojevi s prosječnim vrijednostima 56,42 mg/100 g za ukupne hidroksicimetne kiseline te 27,22 mg/100 g za ukupne flavonole.
2. Najviša koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina u acetonskim ekstraktima iznosila je 378,24 mg/100 g, a određena je u ekstraktu dobivenom pri 100 °C i tri ciklusa, dok je najviša koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina u metanolnim ekstraktima iznosila 75,46 mg/100 g, a određena je u ekstraktu dobivenom pri 100 °C i dva ciklusa.
3. Najviša koncentracija ukupnih flavonola u acetonskim ekstraktima iznosila je 140,72 mg/100 g, dok je najviša koncentracija u metanolnim ekstraktima bila 34,87 mg/100 g, a određene su u ekstraktima dobivenim pri 100 °C i tri ciklusa.
4. Najviša koncentracija ukupnih flavan-3-ola u acetonskim ekstraktima iznosila je 7,97 mg/100 g, a određena je pri 100 °C i dva ciklusa. Flavan-3-oli nisu određeni u metanolnim ekstraktima.

6. LITERATURA

Allaithy S. A. (2017) Chemical compound of cumin and fennel seed extracts against some types of pathogenic bacteria. *Iraq Medical Journal* **1(1)**: 1 - 6.

Anonymous 1, <<https://www.stvarukusa.rs/zacini/komorac-za-zdravlje-i-dobru-liniju/>>. Pristupljeno 1. svibnja 2019.

Anonymous 2, <<https://people.chem.umass.edu/xray/solvent.html>>. Pristupljeno 21. svibnja 2019.

Badgujar S. B., Patel V. V., Bandivdekar A. H. (2014) Foeniculum vulgare Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology Shamkant. *BioMed Research International* **2014**: 1 - 32.

Bai W., Wang C., Ren C. (2014) Intakes of total and individual flavonoids by US adults. *International journal of food sciences and nutrition* **65(1)**: 9 - 20.

Bernath J., Kattaa A., Nemeth E., Frank R (1994) Production-biological investigation of fennel (*Foeniculum vulgare*) populations of different genotypes. *Atti del Convegno Internazionale* 287 – 292.

Dai J., Mumper R. J. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **15(10)**: 7313 – 7352.

Dean J. R. (1998) Extraction methods for environmental analysis, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, str. 35 – 46.

Dent M., Dragović-Uzelac V., Penić M., Brnčić M., Bosiljkov T., Levaj B. (2013) The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food technology and biotechnology* **51(1)**: 84 - 91.

Díaz-Maroto M. C., Pérez-Coello M. S., González Viñas M. A., Cabezudo M. D. (2002) Flavour components of Mediterranean spices. *Res. Adv. Food Sci* **3**: 101 - 120.

Do Q. D., Angkawijaya A. E., Tran-Nguyen P. L., Huynh L. H., Soetaredjo F. E., Ismadji S., Ju Y. H. (2014) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid

content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* **22(3)**: 296 – 302.

Dua A., Garg G., Mahajan R. (2013) Polyphenols, flavonoids and antimicrobial properties of methanolic extract of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). *European Journal of Experimental Biology* **3(4)**: 203 – 208.

El-Awadi M. E., Hassan E. A. (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.

Gaafar A. A., Salama Z. A., El-Baz F. K. (2013) Characterization of phenolics in two cultivars of broccoli and fennel grown under organic and bio-organic fertilization by high performance liquid chromatography (HPLC). *Natural Products: An Indian Journal* **9(9)**: 367 – 374.

Giergielewicz-Możajska H., Dąbrowski Ł., Namieśnik J. (2001) Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples — Some Aspects of Theory and Practice. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31(3)**: 149 – 165.

Goswami N., Chatterjee S. (2014) Assessment of free radical scavenging potential and oxidative DNA damage preventive activity of *Trachyspermum ammi* L.(carom) and *Foeniculum vulgare* Mill.(fennel) seed extracts. *BioMed Research International* **2014**: 1 – 8.

Herrmann K., Nagel C. W. (1989) Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **28(4)**: 315 – 347.

Howard L. R., Clark J. R., Brownmiller C. (2003) Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83(12)**: 1238 - 1247.

Huang Z., Wang B., Eaves D. H., Shikany J. M., Pace R. D. (2007) Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African Americans in the southeast United States. *Food Chemistry* **103(4)**: 1395 - 1402.

Jakobek L., Šeruga M., Novak I., Medvidović-Kosanović M. (2007) Flavonols, Phenolic Acids and Antioxidant Activity of Some Red Fruit. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **103(8)**: 369 – 378.

Khalid M., Rahman S., Bilal M., Huang D. F. (2019) Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens-A review. *Journal of Integrative Agriculture* **18(1)**: 211 – 230.

Khoddami A., Wilkes M., Roberts T. (2013) Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18(2)**: 2328 – 2375.

Križman M., Baričević D., Prošek M. (2007) Determination of phenolic compounds in fennel by HPLC and HPLC–MS using a monolithic reversed-phase column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **43(2)**: 481 – 485.

Liu S. X., Mamidipally P. K. (2005) Quality comparison of rice bran oil extracted with d-limonene and hexane. *Cereal chemistry* **82(2)**: 209 - 215.

Malhotra S. K. (2012) Fennel and fennel seed. U: Handbook of Herbs and Spices, 2.izd. (Peter K. V., ured.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 275 – 302.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* **79(5)**: 727 - 747.

Nishiumi S., Miyamoto S., Kawabata K., Ohnishi K., Mukai R., Murakami A., Ashida H., Terao J. (2011) Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Front Biosci* **3(3)**: 1332 - 1362.

Otaki N., Kimira M., Katsumata S. I., Uehara M., Watanabe S., Suzuki K. (2009) Distribution and major sources of flavonoid intakes in the middle-aged Japanese women. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* **44(3)**: 231 - 238.

Parejo I., Jauregui O., Sánchez-Rabaneda F., Viladomat F., Bastida J., Codina C. (2004b) Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography– negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* **52(12)**: 3679 - 3687.

Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Codina C. (2004a) Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of antioxidative

phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C18 column. *Analytica Chimica Acta* **512(2)**: 271 - 280.

Price S. F., Breen P. J., Valladao M., Watson B. T. (1995) Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **46(2)**: 187 - 194.

Priecina L., Karklina D. (2014) Natural antioxidant changes in fresh and dried spices and vegetables. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* **8(5)**: 492 - 496.

Rather M. A., Dar B. A., Sofi S. N., Bhat B. A., Qurishi M. A. (2016) *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry* **9**: 1574 – 1583.

Raut P., Bhosle D., Janghel A., Deo S., Verma C., Kumar S. S., Agrawal M., Amit N., Sharma M, Giri T., Tripathi D. K., Ajazuddin , Alexander A. (2015) Emerging Pressurized Liquid Extraction (PLE) Techniques as an Innovative Green Technologies for the Effective Extraction of the Active Phytopharmaceuticals. *Research Journal of Pharmacy and Technology* **8(6)**: 801 – 812.

Roby M. H. H., Sarhan M. A., Selim K. A. H., Khalel K. I. (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial crops and products* **(44)**: 437 - 445.

Seidemann J. (2005). *World spice plants: economic usage, botany, taxonomy*. Springer Science & Business Media. Berlin, str. 372 – 374.

Silva L. R., Costa R. (2014) Health benefits of nongallated and gallated flavan-3-ols: A prospectus. U: *Recent Advances in Gallate Research* (Kinsey A. L., ured.), Nova Science Publishers, New York, str. 1 - 49.

Singh U. P., Singh D. P., Maurya S., Maheshwari R., Singh M., Dubey R. S., Singh R. B. (2004) Investigation on the Phenolics of Some Spices Having Pharmacotherapeutic Properties. *Journal of Herbal Pharmacotherapy* **4(4)**: 27 – 42.

Strack D. (1997) Phenolic Metabolism. U: *Plant biochemistry* (Dey P. M. i Harborne J. B., ured.), Academic Press, San Diego, str. 399.

- Sun B.S., Ricardo-da-Silva J.M., Spranger I., (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46(10)**: 4267 - 4274.
- Tapiero H., Tew K. D., Ba G. N., Mathe, G. (2002) Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomedicine & pharmacotherapy* **56(4)**: 200 - 207.
- Teixeira J., Gaspar A., Garrido E. M., Garrido J., Borges F. (2013) Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *BioMed research international* **2013**: 1 - 11.
- Tomás-Barberán F. A., Clifford M. N. (2000) Dietary hydroxybenzoic acid derivatives—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80(7)**: 1024 - 1032.
- Tsao R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2(12)**: 1231 – 1246.
- Vinholes J., Silva B. M., Silva L. R. (2015) Hydroxycinnamic acids (HCAS): Structure, biological properties and health effects. *Advances in Medicine and Biology* **88**: 1 – 33.
- Zhang Q.-W., Lin L.-G., Ye W.-C. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* **13(1)**: 1 – 26.

Izjava o izvornosti

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

Ava Marija Medved

ime i prezime studenta