

Utjecaj ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku na udio fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet u sjemenkama komorača

Tonković, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:166674>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij – Nutricionizam

Petra Tonković

7035/N

**UTJECAJ UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI POVIŠENOM
TLAKU NA UDIO FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKI
KAPACITET U SJEMENKAMA KOMORAČA**

ZAVRŠNI RAD

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

Mentor: 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

Utjecaj ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku na udio fenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet u sjemenkama komorača

Petra Tonković, 0058206599

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je optimirati uvjete ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (PLE) za izolaciju ukupnih fenola i ukupnih flavonoida iz odmašćenih sjemenki komorača uzastopnom ekstrakcijom 30 %-tnom vodenom otopinom acetona te 30 %-tnom vodenom otopinom metanola. Također, u svim dobivenim ekstraktima određen je antioksidacijski kapacitet. Koncentracije ukupnih fenola u acetonskim ekstraktima određene su u rasponu od 302,66 - 469,10 mg/100 g, a u metanolnim ekstraktima od 87,19 - 107,00 mg/100 g. Najveći prinosi ukupnih fenola uz 30 %-tni aceton kao ekstrakcijsko otapalo dobiveni su pri 100 °C/3 ciklusa, a uz 30 %-tni metanol pri 100 °C/1 ciklus. Koncentracije ukupnih flavonoida u acetonskim ekstraktima određene su u rasponu od 41,90 - 76,90 mg/100 g, a u metanolnim ekstraktima od 12,78 - 19,01 mg/100 g. Najveći prinosi ukupnih flavonoida dobiveni su pri 100 °C/3 ciklusa u ekstrakciji s oba otapala. Znatno viši antioksidacijski kapacitet određen je u acetonskim ekstraktima, gdje se ujedno pokazala vrlo visoka korelacija između antioksidacijskog kapaciteta i udjela ukupnih fenola te ukupnih flavonoida.

Ključne riječi: antioksidacijski kapacitet, fenoli, flavonoidi, komorač, PLE

Rad sadrži: 31 stranica, 11 slika, 6 tablica, 43 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: 15. srpnja 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

The impact of pressurized liquid extraction on total phenols, total flavonoids and antioxidant capacity of fennel seeds
Petra Tonković, 0058206599

Abstract: The aim of this study was to optimize the conditions of pressurized liquid extraction (PLE) for total phenols and total flavonoides isolation from defatted fennel seeds by successive extraction with 30 % aqueous acetone solution and 30 % aqueous methanol solution. Furthermore, antioxidant capacity was determined in all obtained extracts. Concentrations of total phenols in acetone extracts were determined in the range of 302.66 – 469.10 mg/100 g and in methanol extracts they were in range of 87.19 – 107.00 mg/100 g. The highest yields of total phenols with 30 % acetone solution as extraction solvent were obtained at 100 °C/3 cycles and with 30 % methanol solution at 100 °C/1 cycle. Concentrations of total flavonoids in acetone extracts were determined in the range of 41.90 – 76.90 mg/100 g and in methanol extracts they ranged from 12.78 – 19.01 mg/100 g. The highest yields of total flavonoids were obtained at 100 °C/3 cycles by extraction with both solvents. Considerable higher antioxidant capacity was determined in acetone extracts, where very strong correlation between the antioxidant capacity and content of total phenols as well as total flavonoid content was observed.

Keywords: antioxidant capacity, fennel, flavonoids, phenols, PLE

Thesis contains: 31 pages, 11 figures, 6 tables, 43 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, Assistant Professor

Defence date: July 15th, 2019

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. KOMORAČ | 2 |
| 2.1.1. KEMIJSKI SASTAV KOMORAČA | 3 |
| 2.2. FENOLNI SPOJEVI SJEMENKI KOMORAČA | 3 |
| 2.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET SJEMENKI KOMORAČA | 5 |
| 2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA | 6 |
| 2.4.1. UBRZANA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU | 7 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 9 |
| 3.1. MATERIJALI | 9 |
| 3.1.1. SJEMENKE GORKOG KOMORAČA | 9 |
| 3.1.2. KEMIČALIJE I STANDARDI | 9 |
| 3.1.3. APARATURA I PRIBOR | 11 |
| 3.2. METODE RADA | 12 |
| 3.2.1. IZOLACIJA FENOLNIH SPOJEVA | 12 |
| 3.2.2. ODREĐIVANJE UDJELA UKUPNIH FENOLA | 13 |
| 3.2.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA | 15 |
| 3.2.4. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA FRAP (<i>ENG. FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER</i>) METODOM | 17 |
| 3.2.5. STATISTIČKA OBRADA | 18 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 19 |
| 4.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA | 19 |
| 4.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA | 22 |
| 4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA | 24 |
| 5. ZAKLJUČAK | 27 |
| 6. LITERATURA | 28 |

1. UVOD

Komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) je višegodišnja biljka zeljaste stabljike i spada u porodicu štitarki (*Apiaceae*). Poznat je po svojim ljekovitim svojstvima i ugodnoj aromi, a raste na području Sredozemlja. Koristi se u veterini te farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Ekstrakt komorača ima antimikrobna, antioksidativna i protuupalna svojstva te sadrži hlapljive spojeve poput trans-anetola, estragola, fenhona i limonena. Analize metanolnih ekstrakata sjemenki komorača pokazuju da sjeme sadrži i ružmarinsku i klorogensku kiselinu kao najzastupljenije fenolne spojeve, a kvercetin i apigenin predstavljaju najzastupljenije flavonoide.

Fenolni spojevi strukturno se značajno razlikuju te je za njihovu izolaciju važno izabrati učinkovitu tehniku ekstrakcije te optimirati uvjete pri kojima se dobivaju najveći prinosi. Izolacija fenola iz biljnog materijala, pa tako i komorača, postiže se primjenom tradicionalnih ili novijih ekstrakcijskih tehnika. S obzirom na dugotrajnost i ekonomičnost tradicionalnih tehnika, znanstvenici teže razvijanju automatiziranih metoda koje osiguravaju uštedu vremena, energije, kemikalija i materijala koji se ispituje. Jedna od takvih metoda je ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *Pressurized-liquid extraction*, PLE) koja omogućuje izmjenu parametara ekstrakcije, što pridonosi većoj učinkovitosti i bržoj izolaciji bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj parametara ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku na udio ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima odmašćenih sjemenki komorača dobivenih uzastopnom ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona, a zatim s 30 %-tnom vodenom otopinom metanola te u dobivenim ekstraktima odrediti antioksidacijski kapacitet. Ispitivani parametri ekstrakcije bili su: temperatura (75 i 100 °C) te broj ciklusa (1, 2 i 3). Udjeli fenolnih spojeva te antioksidacijski kapacitet određivani su spektrofotometrijski, a statističkom analizom dobivenih rezultata određeni su parametri ekstrakcije pri kojima se postižu najviši udjeli određivanih fenolnih spojeva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOMORAČ

Komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) spada u carstvo *Plantae*, koljeno *Tracheophyta*, razred *Magnoliopsida*, red *Apiales*, porodicu *Apiaceae* i rod *Foeniculum*. Drugi nazivi za ovu biljku su koromač, morač, slatki kopar, anason i rezen (Grić, 1990). Prema Šilješ i sur. (1992) najznačajnije vrste komorača su:

- *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* (divlji ili gorki komorač)
- *Foeniculum vulgare* var. *dulce* (slatki ili rimski komorač)
- *Foeniculum vulgare* var. *azoricum* (firentinski komorač)

Korijen komorača je prljavo bijele boje, mesnat je i raste duboko pod zemljom. Stabljika je uspravna, visoka 150-200 cm i vrlo je razgranata. Listovi se nalaze isprekidano po biljci, glatki su i mekani te su sastavljeni od nitastih tamnozelenih nastavaka. Cvjetovi (slika 1) su sitni, žutonarančasti, skupljeni u šitaste cvatove promjera 10-15 cm. Plod je dug 6-10 mm, širok 2-3 mm i sadrži dvije sjemenke. Sjeme (slika 2) je zelenkaste ili sivosmeđe boje (Bernath i sur., 1996).

Sjeme komorača proklija za 14 do 20 dana u povoljnim uvjetima, a počinje klijati pri temperaturi 6-8 °C te je najveća klijavost pri 15-16 °C. Komoraču su potrebne visoke temperature tijekom vegetacije, dok razvoj zahtjeva umjerenu klimu s toplim ljetima i blagim zimama. Visoki prinosi ploda i eteričnog ulja postižu se dodatkom gnojiva koje sadrži visok udio fosfora i manji udio dušika. Životni vijek komorača je 6 do 7 godina. Stabljika komorača sadrži eterično ulje u cijelom nadzemnom dijelu što uzrokuje ugodan miris, a dozrelo sjeme ima karakteristična uzdužna rebra u kojima je nakupljeno najviše eteričnog ulja (Šilješ i sur., 1992).



Slika 1. Cvijet komorača (Anonymous 1)



Slika 2. Sjemenke komorača (Anonymous 2)

Aromatičnost komorača je svojstvo zaslužno za upotrebu ove biljke u prehrani diljem svijeta. Najčešće se koristi kao začim koji se u starom Rimu upotrebljavao s prethodnim namakanjem u ocat i sol, a danas se poslužuje kao dio salata, umaka i variva. Komorač je i sirovina za proizvodnju likera, rakija, parfema, gumenih bombona i guma za žvakanje (Grić, 1990). Stabljike, peteljke, listovi i plodovi mogu se konzumirati uz prethodnu termičku obradu ili uz dodatak drugih sirovih namirnica poput voća i povrća (Toplak Galle, 2001)

Koristi se u mnogim dijelovima svijeta i za liječenje bolesti kao što su bolovi u trbuhu, artritis, rak, kolike u djece, konjunktivitis, konstipacija, proljev, groznica, nadutost, gastritis, nesanic, sindrom iritabilnog crijeva, bolesti bubrega te bol u jetri (Badgujar i sur., 2014). Komorač također ima antimikrobna, antioksidativna, protuupalna, antikancerogena, hepatoprotektivna i estrogena svojstva (Kooti i sur., 2015).

2.1.1. KEMIJSKI SASTAV KOMORAČA

Stabljika i listovi komorača sadrže 1-1,5 %, a plodovi 3-6 % eteričnog ulja. Korijen komorača ima manje od 1 % eteričnog ulja (Šilješ i sur., 1992). List i stabljika imaju najveći udio vode (77,46 %). Količina ugljikohidrata je 18,44 g/100 g lišća i 22,82 g/100 g cvata. Proteini su najmanje zastupljeni makronutrijenti i njihov udio iznosi otprilike 1 g/100 g lišća ili cvata (Barros i sur., 2010). Sjemenke sadrže 6,3 % vode, 9,5 % proteina, 10 % masti, 13,4 % mineralnih tvari, 18,5 % vlakana i 42,3 % ugljikohidrata (Rather i sur., 2016). S obzirom na skupine kemijskih spojeva, eterično ulje sjemenki komorača sastoji se u najvećem dijelu od oksidiranih monoterpena, te monoterpenskih i seskviterpenskih ugljikovodika, a najzastupljeniji spojevi su trans-anetol, estragol, fenhon i limonen. Neki od spojeva koji su također zastupljeni u sjemenkama komorača, ali u manjem udjelu, su pinen, anetol i 1,8-cineol (Anwar i sur., 2009)

2.2. FENOLNI SPOJEVI SJEMENKI KOMORAČA

Fenolni predstavljaju kemijske spojeve koji sadrže hidroksilnu skupinu vezanu za aromatski prsten. U prirodi su rasprostranjeni u više od 8000 različitih struktura čija se složenost kreće od niskomolekulskih, monoaromatskih pa sve do polifenolnih, taninskih vrsta (Crozier i sur., 2009). Strukture fenolnih spojeva razlikuju se po broju i položaju hidroksilnih skupina, broju, položaju i vrsti supstituenata te stupnju polimerizacije (Bravo, 1998). Osim po kemijskoj strukturi, fenolni spojevi razlikuju se i po podrijetlu te biološkoj funkciji.

Prema Rahimi i Ardekani (2013) najzastupljenije skupine fenolnih spojeva u komoraču su flavonoidi, fenolne kiseline, hidroksicimetne kiseline, kumarini i tanini. Analize metanolnih ekstrakata sjemenki komorača pokazuju da sjeme sadrži ružmarinsku i klorogensku kiselinu (slika 3) kao najzastupljenije fenolne spojeve i to u udjelima 14,9 % i 6,8 % (Roby i sur., 2013). Dua i sur. (2013) identificirali su fenolne spojeve u metanolnim ekstraktima sjemenki komorača. Prema tom istraživanju, sjemenka komorača sadrži 277,131 µg galne kiseline, 166,062 µg kafeinske kiseline, 99,476 µg elaginske kiseline, 781,986 µg kvercentina i 92,856 µg kempferola/g suhe sjemenke.

Brojna znanstvena istraživanja dokazala su pozitivno djelovanje fenolnih spojeva na ljudsko zdravlje, pa se tako prehranbenim unosom namirnica koje sadrže fenole prevenira razvoj karcinoma, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (Tsao, 2010).



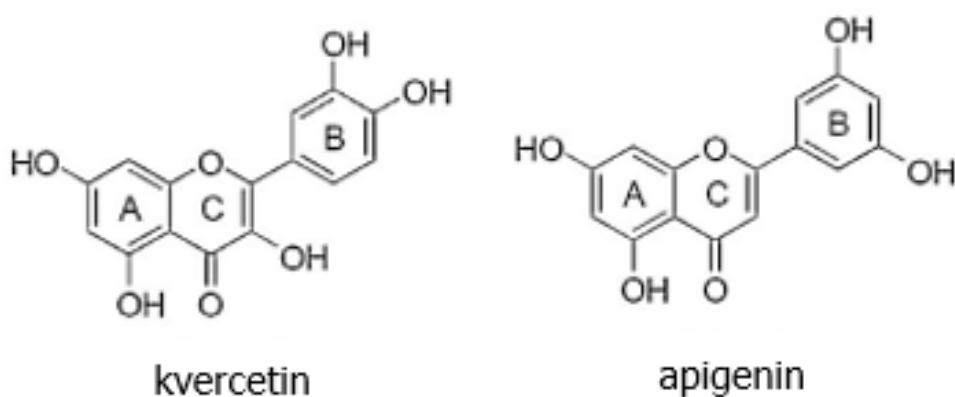
Slika 3. Struktura najzastupljenijih fenolnih spojeva komorača (Abdullah i sur., 2008)

Flavonoidi su fenolni spojevi čija se osnovna struktura sastoji od dva benzenska prstena, A i B, koji su povezani heterocikličkim piranskim prstenom C. Strukturu čini ukupno 15 ugljikovih atoma. Dijele se s obzirom na broj i položaj hidroksilnih skupina, stupanj nezasićenosti i stupanj oksidacije piranskog prstena. Glavne skupine su flavani, flavoni, antocijanidini i čalkoni, a spojevi unutar skupina razlikuju se po supstituentima vezanim na benzenske prstene (Kumar i Pandey, 2013).

S obzirom na topljivost, flavonoidi mogu biti hidrofilni zbog prisustva hidroksilne skupine dok je svojstvo lipofilnosti karakteristično kod spojeva s metilnim ili izopentilnim grupama (Crozier

i sur., 2009). Topljivi su u acetonu, metanolu, etanolu i dimetilformamidu (Robards i Antolovic, 1997).

Flavonoidi imaju protuupalna, antikancerogena i antialergijska svojstva (Baxter i sur., 1999) te djeluju antibakterijski čak i na antibiotik-rezistentne bakterije (Chen i sur., 1996). Kvercetin i apigenin (slika 4) predstavljaju najzastupljenije flavonoide u sjemenkama komorača i to u udjelima 17,1% i 12,5 % (Roby i sur., 2013). Također su identificirani eriodiktiol, kempferol, izokvercetin i izoramnetin (Parejo i sur., 2004).



Slika 4. Struktura najzastupljenijih flavonoida u sjemenci komorača (Dai i Mumper, 2010)

2.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET SJEMENKI KOMORAČA

Oksidacija je proces koji se odvija u biološkim sustavima prilikom čega nastaju slobodni radikali koji imaju nespareni elektron u vanjskoj ljusci. Kada je koncentracija slobodnih radikala u suvišku, dolazi do pojave oksidacijskog stresa. Hrana može biti podložna oksidacijskom procesu zbog prisutnosti kisika u okolišnim uvjetima pri čemu dolazi do spontane autooksidacije masti, a stanice ljudskog organizma mogu stvarati slobodne radikale kroz određene fiziološke procese ili uslijed utjecaja brojnih vanjskih čimbenika među kojima je i unos hrane (Burton i sur., 1985). Antioksidansi su spojevi koji neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i pritom popravljaju oštećenja nastala u stanici. Također onemogućuju daljnje djelovanje radikala i zaustavljaju lančane reakcije oksidacije (Halliwell, 1990).

Oktay i sur. (2003) određivali su antioksidacijski kapacitet sjemenki komorača i izrazili su ga kao postotak inhibicije lipidne peroksidacije koji je za etanolne ekstrakte sjemenki komorača

iznosio 98,6 %, a za vodene ekstrakte 91,6 %. Isto tako, u svim ekstraktima izmjeren je veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na α -tokoferol, butilhidroksitoluen i butilhidroksianisol čija masa odgovara masi uzorka sjemenki komorača. Christova-Bagdassarian i sur. (2013) određivali su antioksidacijski kapacitet u metanolnim ekstraktima sjemenki biljaka iz porodice *Apiaceae* te su zaključili da su u usporedbi s ostalim biljkama (*Anethum graveolens*, *Pimpinella anisum*, *Carum carvi* i *Coriandrum sativum*) ekstrakti sjemenki komorača pokazali najveći antioksidacijski kapacitet u iznosu od 113,19 mL/L ekstrakta.

2.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA

Ekstrakcija predstavlja proces prelaska određene tvari iz krute ili tekuće faze u otapalo. Omogućuje separaciju biološki aktivnih komponenti iz biljnog materijala tako što se za ekstrakciju odabire otapalo u kojem će željene komponente biti topljivije u odnosu na pripremljeni uzorak. Proces ekstrakcije karakterizira pojava odjeljivanja faza između kojih se događa prijelaz tvari. S obzirom na agregatno stanje faza, ekstrakcije se dijele na čvrsto tekuću i tekuće-tekuću. Cilj svake ekstrakcije je postići što veću dodirnu površinu kako bi prijelaz tvari bio što brži i učinkovitiji. Ekstrakcija se može provoditi na način da se ekstrahira željena tvar, a balastne tvari ostanu u uzorku ili se uklanjaju prigodnim otapalom (Rapić, 1994). Biljni materijali bogati su i jednostavnim i visokopolimeriziranim fenolnim spojevima, pa se zbog toga koriste i različite vrste ekstrakcije. Ekstrakti, uz fenole, često sadrže i razne šećere, organske kiseline i masti što zahtjeva dodatno dodatne analitičke postupke za izolaciju bioaktivnih tvari (Dai i Mumper, 2010). Na sam proces utječu različiti parametri poput temperature, veličine čestica, pH vrijednosti, omjera otapala i uzorka, polarnosti otapala te fizikalnih i kemijskih svojstava uzorka (Xu i Chang, 2007).

Ekstrakcija čvrsto-tekuće provodi se ukoliko su tražene komponente dio čvrste faze te je za njihovu izolaciju, osim natapanja u otapalu, potrebna primjena mehaničke sile ili zagrijavanja. Time se oslabi veza između traženih komponenti i nečistoća u krutom uzorku, tražene komponente prijeđu u otoplenu fazu, a ostatak krutog uzorka uklanja se filtriranjem (Rapić, 1994).

Različita polarnost fenolnih spojeva zahtjeva odabir ekstrakcijskih otapala različite polarnosti (tablica 1). Aceton se primjenjuje kao otapalo za ekstrakciju polarnih fenolnih spojeva i antioksidansa jer stvara vodikove veze i lako je hlapljiv. Heksan je lako hlapivo nepolaro otapalo i koristi se za ekstrakciju ulja i masti. Metanol spada u visoko polarna otapala i stvara vodikove veze. Od spomenutih otapala najniže vrelište ima aceton, a najviše heksan (Reichardt i Welton, 2011).

Soxhlet ekstraktor upotrebljava se za višekratne ekstrakcije pri povišenoj temperaturi. Pare otapala koje se zagrijava u tikvici prolaze kroz cijev te se kondenziraju i natapaju sadržaj tikvice. Modernim tehnikama pokušava se modificirati Soxhlet ekstrakcija i time skratiti vrijeme i utrošak otapala. Također se razvijaju automatizirane metode koje bi spriječile eventualnu termičku degradaciju molekula (De Castro i Priego-Capote, 2010).

Tablica 1. Polarnost otapala (Smallwood, 2012)

| Otapalo | Dielektrična konstanta (ϵ) | Indeks polarnosti |
|----------------|---------------------------------------|-------------------|
| Voda | 80,1 | 10,2 |
| Metanol | 32,7 | 5,1 |
| Aceton | 20,7 | 5,1 |
| Heksan | 1,88 | 0,1 |

2.4.1. UBRZANA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU

Ubrzana ekstrakcija otapalom pri povišenom tlaku (eng. *Pressurized-liquid extraction*, PLE) predstavlja alternativnu metodu Soxhlet ekstrakciji. Koristi se primjenom visokog tlaka čime se sprječava isparavanje otapala. Isto tako, omogućena je primjena visoke temperature koja uzrokuje povećanje kinetičke energije molekula u sustavu i na taj način se povećava brzina kemijskih reakcija (Heemken i sur., 1997). Ova metoda spada u ekološki prihvatljivu tehnologiju jer se, s obzirom na tradicionalne metode ekstrakcije, smanjuje volumen utrošenog otapala. Također rezultira smanjenjem vremena i troškova za izolaciju komponenti iz biljnog materijala ili prehrambenih proizvoda (Mustafa i Turner, 2011).

Ekstrakcija se provodi na automatiziranom ASE (eng. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE) uređaju (slika 5) što čini izvedbu ekstrakcije te varijaciju parametara lakšom (Rodríguez-Solana i sur., 2014). Heemken i sur. (1997) zaključuju da bi se za ubrzanu ekstrakciju trebalo koristiti isto otapalo koje bi se koristilo za Soxhlet ekstrakciju, a optimalna otapala za izolaciju bioaktivnih komponenti iz sjemenki komorača na ASE uređaju su organska polarna otapala.



Slika 5. Uređaj za ubranu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku Dionex™ ASE™ 350 (vlastita fotografija)

Da bi se pravilno provela ekstrakcija na ASE uređaju, uzorak treba biti usitnjen i homogeniziran. Na dno svake ćelije postavlja se celulozni filter. Osim uzorka, u ćelije od nehrđajućeg čelika stavlja se i dijatomejska zemlja koja povećava brzinu protoka, površinu uzorka i pospješuje apsorpciju vode te tako povećava učinkovitost same ekstrakcije (Losic i sur., 2009). Ćelije s uzorcima postavljaju se na rotirajuće utore. Na uređaju su predviđena mjesta za 3 boce s otapalima koja se odabiru ovisno o svojstvima ispitivanih komponenti. Parametri koji se podešavaju na zaslonu su statičko vrijeme (duljina trajanja ekstrakcijske faze), temperatura, volumen otapala za ispiranje ćelija između faza, broj ciklusa (faza ekstrakcije i ispiranje) te vrijeme u kojem se ćelije ispiru dušikom. Isto tako, moguće je podešavanje sekvence po kojoj se tijekom jedne ekstrakcije primjenjuju različiti parametri za svaki postavljen uzorak. Ekstrakti svakog uzorka sakupljaju se u boce postavljene na rotirajućem pladnju (Dionex, A. S. E. Manual, 2011).

Učinkovita izolacija bioaktivnih tvari iz sjemenke komorača postiže se primjenom metanola kao polarnog otapala. Rodríguez-Solana i sur. (2014) proveli su ekstrakciju na ASE uređaju i usporedili dobivene rezultate sa Soxhlet ekstrakcijom. Dobivene koncentracije nisu se razlikovale između ekstrakcijskih metoda, ali se ASE ekstrakcijom postiglo skraćeno vrijeme (30 minuta u odnosu na 4-8 sati), manje iskorištenje otapala te povećan udio hlapljivih komponenti u eteričnom ulju.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sjemenke gorkog komorača

U ovom istraživanju korištene su komercijalno dostupne suhe sjemenke gorkog komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) (Suban d.o.o., Hrvatska). Neposredno prije provođenja eksperimentalnog dijela, sjemenke su usitnjene pomoću električnog mlinca, a usitnjeni uzorak koristio se za izolaciju fenolnih spojeva primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (eng. *Pressurized-liquid extraction, PLE*) koja je provedena na ASE Dionex 350® uređaju.

3.1.2. Kemikalije i standardi

- Heksan, 95 %-tni
- Metanol, 30 %-tni
Priprema: U odmjernu tikvicu od 1000 mL prenese se 300 mL 100 %-tnog metanola te se tikvica nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- Aceton, 30 %-tni
Priprema: U odmjernu tikvicu od 1000 mL prenese se 300 mL 100 %-tnog acetona te se tikvica nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
- Zasićena otopina natrij karbonata (20 %-tna otopina)
Priprema: 200 g anhidrida natrij karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrij karbonata, nadopuni u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira.
- Standard galne kiseline
Priprema: Odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- Etanol, 96 %-tni
- Metanol, 100 %-tni
- Aluminij klorid, 10 %-tni

Priprema: 1 g aluminij klorida (aluminij-klorid–heksahidrat, p.a.) otopi se u 5 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Kalij acetat, 1 M

Priprema: 9,845 g kalijev acetata otopi se u 10 mL destilirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake destiliranom vodom.

- Standard kvercetin (100 mg/L)

Priprema: 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. Iz alikvotne otopine prirede se redom razrijeđenja od 10, 25, 50 i 75 mg/L.

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna

- Klorovodična kiselina, 40 mM

Priprema: Otpipetira se 330 μ L 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL.

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

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

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

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

- Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna

- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3,6

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

- FRAP reagens

Priprema: U staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens na način da se pomiješa 25 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

- Standard askorbinske kiseline (100 mg/L)

Priprema: Potrebno je pripremiti otopinu askorbinske kiseline koncentracije 100 mg/L. Odvažuje se 0,100 g askorbinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese s destiliranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 100 mL, te nadopuni destiliranom vodom do oznake.

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
- Kupelj od rotavapora (BÜCHI Heating Bath B-490, Švicarska)
- Električni mlinac (GT11, Tefal, Francuska)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern, Njemačka)
- Spektrofotometar VWR UV-1600PC Spectrophotometer (UV-1600PC, VWR, Belgija)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)

Pribor:

- Celulozni filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Staklene kivete
- Plastične kivete volumena 50 mL
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 10 mL, 25 mL, 100 mL, 500 mL i 1 L
- Menzura, volumena 100 mL i 1000 mL
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL i 200 mL)
- Stakleni lijevci
- Plastična žličica
- Staklene epruvete, stalak za epruvete
- Plastična lađica za vaganje
- Mikropipete Eppendorf, volumena 100 µL i 1000 µL
- Dijatomejska zemlja

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izolacija fenolnih spojeva

Izolacija fenolnih spojeva iz sjemenki gorkog komorača provedena je postupkom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku u tri uzastopne ekstrakcije otapalima različite polarnosti: heksan (95 %), vodena otopina acetona (30 %, v/v) i vodena otopina metanola (30 %, v/v). U tu svrhu na analitičkoj vagi odvagano je $8 \pm 0,0001$ g usitnjenih suhih sjemenki gorkog komorača te pomiješano s $\sim 1,5$ g dijatomejske zemlje. Na dno ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika volumena 34 mL stave se 2 celulozna filter papira te se doda pripremljena smjesa uzorka i dijatomejske zemlje. Ćelija se potom zatvori i postavi na predviđeno mjesto u ASE Dionex 350® uređaju. Svaki ekstrakcijski proces provodi se uz varijaciju parametara temperature i broja ciklusa ekstrakcije prikazanih u tablici 2 uz fiksne uvjete ekstrakcije: vrijeme ekstrakcije 5 min, tlak 10 MPa, volumen ispiranja 50 % te propuhivanje dušikom 30 s.

Prije izolacije fenolnih spojeva, provede se ekstrakcija nepolarnim otapalom (95 %-tni heksan) u cilju uklanjanja uljnih komponenti. Zatim se prethodno odmašćeni uzorci podvrgnu ekstrakciji 30 %-tnom vodenom otopinom acetona. Ekstrakti sakupljeni u staklenim bočicama uklone se iz uređaja i na taj način dobiva se prvi set od 6 uzoraka (tablica 2). Potom se isti uzorci podvrgnu ekstrakciji 30 %-tnom vodenom otopinom metanola. Ekstrakti sakupljeni u staklenim bočicama predstavljaju drugi set od 6 uzoraka (tablica 2).

Svi dobiveni ekstrakti se potom prenesu u odmjerne tikvice od 50 mL te se nadopune do oznake otapalom koje se koristilo za ekstrakciju. Pripremljeni ekstrakti prenesu se u plastične kivete volumena 50 mL i skladište se na temperaturi $+4$ °C do provođenja analiza.

Tablica 2. Plan pokusa izolacije fenolnih spojeva iz sjemenki gorkog komorača primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku

| UZORAK | OZNAKA UZORKA | OTAPALO | TEMPERATURA | BROJ CIKLUSA |
|--------|---------------|----------------|-------------|--------------|
| 1 | A1 | acetone (30 %) | 75 °C | 1 |
| 2 | A2 | acetone (30 %) | 75 °C | 2 |
| 3 | A3 | acetone (30 %) | 75 °C | 3 |
| 4 | A4 | acetone (30 %) | 100 °C | 1 |
| 5 | A5 | acetone (30 %) | 100 °C | 2 |
| 6 | A6 | acetone (30 %) | 100 °C | 3 |
| 7 | M1 | metanol (30 %) | 75 °C | 1 |
| 8 | M2 | metanol (30 %) | 75 °C | 2 |
| 9 | M3 | metanol (30 %) | 75 °C | 3 |
| 10 | M4 | metanol (30 %) | 100 °C | 1 |
| 11 | M5 | metanol (30 %) | 100 °C | 2 |
| 12 | M6 | metanol (30 %) | 100 °C | 3 |

3.2.2. Određivanje udjela ukupnih fenola

Princip metode:

Fenolni spojevi određuju se primjenom praktične spektrofotometrijske metode koja se zasniva na mjerenju intenziteta plave boje pri valnoj duljini 765 nm. Plavo obojeni spojevi, wolframov oksid i molbidenov oksid, nastaju kao produkti redukcije Folin-Ciocalteu reagensa, odnosno smjese fosforwolframove i fosfomolbidenske kiseline, a tvari koje pritom podliježu oksidaciji u blago alkalnim uvjetima su fenolni spojevi. Broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima proporcionalan je intenzitetu plave boje, odnosno broju stabilnih kompleksa koji se tvore redukcijom kiselina (Shortle i sur., 2014)

Priprema ekstrakta:

Ekstrakti u kojima se određuju ukupni fenolni spojevi dobiveni su ubrzanom ekstrakcijom otapalima pri povišenom tlaku na način opisan u poglavlju 3.2.1. Prije analize, uzorci se izvade iz hladnjaka i temperiraju 30 min pri sobnoj temperaturi. Za određivanje koncentracije ukupnih fenola uzorke koji su ekstrahirani acetonom potrebno je razrijediti 5 puta

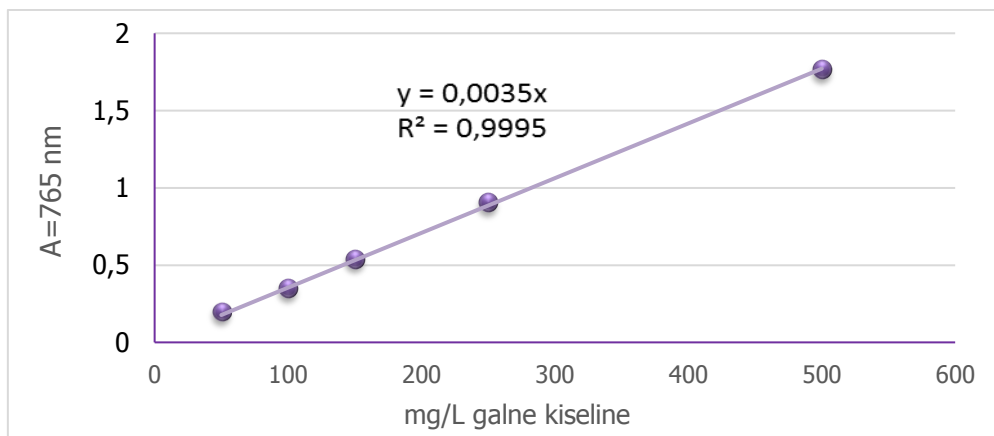
korištenjem ekstrakcijskog otapala (30 %-tni aceton), dok uzorke ekstrahirane 30 %-tnim metanolom nije potrebno razrijediti.

Postupak određivanja:

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

Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca, potrebno je odvagati 0,5 g galne kiseline koja se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL te nadopuniti tikvicu do oznake destiliranom vodom. Razrjeđenja se rade na način da se u svaku tikvicu od 100 mL otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota pripremljene standardne otopine galne kiseline i nakon toga se tikvice nadopune destiliranom vodom do oznake. Pripadne koncentracije galne kiseline u pripremljenim razrjeđenjima iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μ L otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 μ L Folin Ciocalteu reagensna i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrij karbonata. Slijepa proba priprema se dodatkom 100 μ L destilirane vode umjesto otopine standarda. Sadržaj staklene epruvete promiješa se pomoću Vortexa te se uzorci termostatiraju u vodenoj kupelji pri temperaturi od 50 °C 25 minuta. Nakon termostatiranja, mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm, a iz izmjerenih vrijednosti izrađuje se baždarni pravac u programu Microsoft Excel. Na apscisu se nanose koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinatu izmjerene pripadajuće apsorbancije pri 765 nm. Dobivena jednadžba pravca koristi se za izračunavanje koncentracije ukupnih fenola (slika 6).



Slika 6. Baždarni pravac za galnu kiselinu

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

Y- apsorbancija pri 765 nm

X- koncentracija galne kiseline (mg/L).

3.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Princip metode

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

Postupak određivanja

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

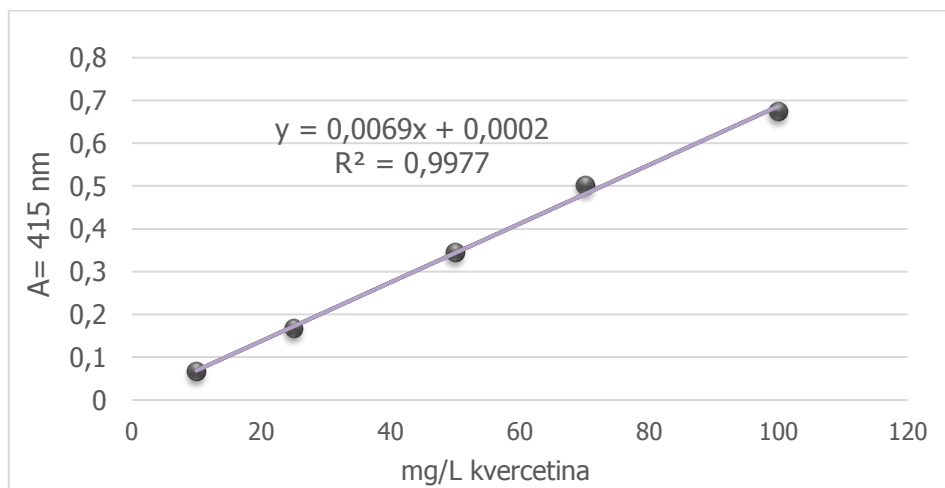
Izrada baždarnog pravca

Potrebno je pripremiti otopinu standarda kvercetina koncentracije 100 mg/L. Od te otopine standarda rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se otpipetira redom 1, 2,5, 5 i 7,5 mL alikvota standardne otopine kvercetina u svaku tikvicu i potom se

nadopunjavaju do oznake 100 %-tnim metanolom. Koncentracije kvercetina u tim tikvicama iznose 10, 25, 50 i 75 mg/L. Također se za analizu uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg/L.

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

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije kvercetina (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 415 nm (slika 7). Koncentracija ukupnih flavonoida izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 7. Baždarni pravac za kvercetin

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

Y – apsorbancija pri 415 nm,

X – koncentracija kvercetina (mg/L).

3.2.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP (*eng. Ferric Reducing Antioxidant Power*) metodom

Princip metode:

Antioksidacijski kapacitet određuje se FRAP metodom koja se temelji na redukciji žuto obojenog kompleksa TPTZ-a (željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina) pri nižem pH, a kao produkt reakcije nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin (Shortle i sur., 2014). Antioksidansi u ispitivanom uzorku doniraju elektron i uzrokuju redukciju Fe^{3+} iona u TPTZ kompleksu u Fe^{2+} ione. Posljedičnim nastajanjem plavog obojenja u otopini, mjeri se apsorbancija pri 593 nm.

Priprema ekstrakta:

Ekstrakti u kojima se određuje antioksidacijski kapacitet dobiveni su ubrzanom ekstrakcijom otapalima pri povišenom tlaku na način opisan u poglavlju 3.2.1. Prije provedbe pokusa, uzorci se temperiraju 30 min pri sobnoj temperaturi. Prije određivanja antioksidacijskog kapaciteta sve uzorke koji su ekstrahirani acetonom potrebno je razrijediti 10 puta korištenjem 30 %-tnog acetona, a uzorke ekstrahirane metanolom potrebno je razrijediti 5 puta korištenjem 30 %-tnog metanola.

Postupak određivanja:

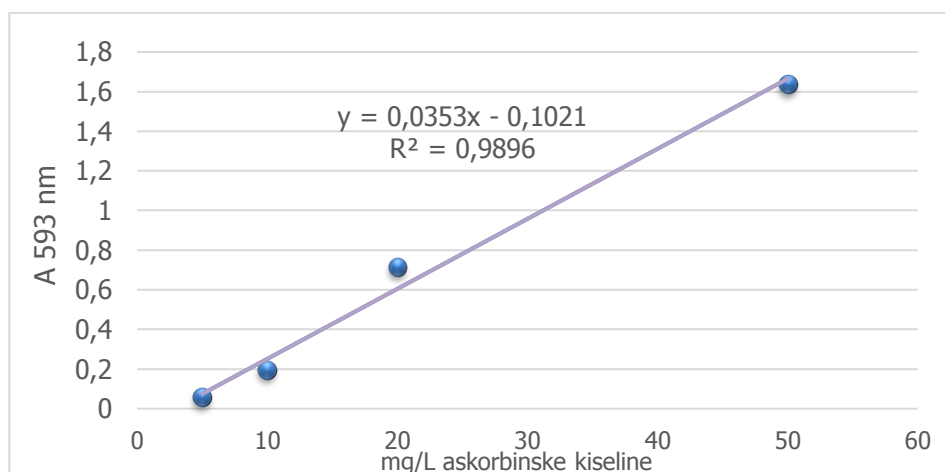
Prije početka rada sve reagense i standarde potrebno je inkubirati na 37 °C 10 minuta. Nakon toga potrebno je redom otpipetirati 300 μL ekstrakta i 2250 μL FRAP reagensa u staklene epruvete. Slijepa proba sadrži 300 μL otapala korištenog za ekstrakciju i 2250 μL FRAP reagensa. Sadržaj epruvete dobro se promiješa korištenjem Vortexa te se epruvete termostatiraju u vodenoj kupelji pri temperaturi 37 °C tijekom 10 minuta. Nakon termostatiranja, mjeri se apsorbancija pri 593 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta, potrebno je izraditi baždarni pravac s vrijednostima koncentracije askorbinske kiseline (mg/L) na apscisi i izmjerenim pripadajućim apsorbancijama na ordinati. Za izradu baždarnog pravca potrebno je napraviti razrjeđenja u koncentracijama koje redom iznose 5, 10, 20 i 50 mg/L na način da se u odmjerne tikvice od 10 mL redom otpipetira 0,5, 1, 2 i 5 mL alikvota otopine askorbinske kiseline. Tikvice se potom nadopune do oznake destiliranom vodom. Potom se u staklene epruvete otpipetira 300 μL otopine standarda te se dodaje 2250 μL FRAP reagensa. Sadržaj epruvete dobro se

promiješa te se 10 minuta termostatira u vodenoj kupelji pri temperaturi 37 °C. Slijepa proba sadržava destiliranu vodu umjesto uzorka i 2250 µL FRAP reagensa. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm, a iz dobivene jednadžbe pravca izračuna se antioksidacijski kapacitet (slika 8). S obzirom da u reakciji askorbinska kiselina može primiti dva elektrona, a za reakciju redukcije željeza Fe³⁺ u Fe²⁺ je potreban jedan elektron, dobivene ekvivalente askorbinske kiseline (AAE) je potrebno pomnožiti s 2 (Fegredo et al., 2009).

FRAP = Ekvivalenti askorbinske kiseline (AAE) × 2



Slika 8. Baždarni pravac za askorbinsku kiselinu

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi: $y = 0,0353X - 0,1021$

Y - apsorbancija pri 593 nm

X - ekvivalent askorbinske kiseline (AAE) (mg/L).

3.2.5. Statistička obrada

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 fenola (mg/100 g) i ukupnih flavonoida (mg/100 g) te antioksidacijski kapacitet (mg AAE/100 g). Za usporedbu uzoraka korištena je multivarijantna analiza varijance (MANOVA) te je izračunat Pearsonov koeficijent korelacije, pri čemu je statistički značajna razlika razmatrana na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedeno je određivanje ukupnih fenola, ukupnih flavonoida te antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima odmašćenih sjemenki komorača dobivenim uzastopnom ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona, a zatim s 30 %-tnom vodenom otopinom metanola primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku. Cilj istraživanja bio je optimirati parametre ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku pri kojima se dobivaju najveći prinosi fenolnih spojeva. Za određivanje ukupnih fenola i flavonoida primijenjene su spektrofotometrijske metode, a dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost dvaju mjerenja \pm standardna devijacija.

4.1. Određivanje ukupnih fenola

Prema podacima statističke obrade broj ciklusa i temperatura imaju signifikantan utjecaj na udio ukupnih fenola (mg/100 g) u sjemenkama komorača koje su ekstrahirane s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona, a potom 30 %-tnom vodenom otopinom metanola (tablica 3).

Tablica 3. Utjecaj temperature ekstrakcije i broja ciklusa na udio ukupnih fenola (mg/100 g) u ekstraktima sjemenki gorkog komorača dobivenih ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona, a zatim s 30 %-tnom vodenom otopinom metanola

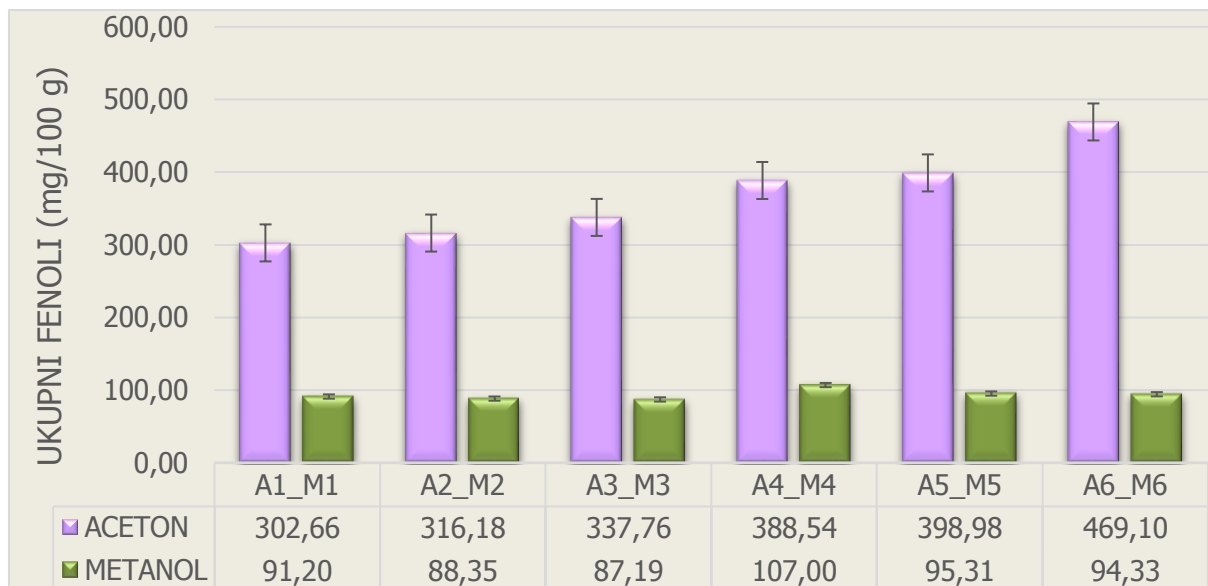
| Izvor varijacije | UKUPNI FENOLI (mg/100 g) | |
|-----------------------------|---------------------------|------------------|
| | 30 %-tni ACETON | 30 %-tni METANOL |
| Temperatura (°C) | $p \leq 0,01^*$ | $p \leq 0,01^*$ |
| 75 | 318,86 \pm 4,02 | 88,92 \pm 1,60 |
| 100 | 418,87 \pm 4,02 | 98,88 \pm 1,60 |
| Broj ciklusa | $p \leq 0,01^*$ | $p = 0,05^*$ |
| 1 | 345,59 \pm 4,92 | 99,10 \pm 1,96 |
| 2 | 357,58 \pm 4,92 | 91,83 \pm 1,96 |
| 3 | 403,43 \pm 4,92 | 90,76 \pm 1,96 |
| Prosječna vrijednost | 368,87 | 93,90 |

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

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

Parametri koji osiguravaju uvjete ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku pri kojima se postiže najveći prinos ukupnih fenola u sjemenkama komorača su sljedeći:

- 30 %-tna vodena otopina acetona: 100 °C i 3 ciklusa
- 30 %-tna vodena otopina metanola: 100 °C i 1 ciklus



Slika 9. Udio ukupnih fenola u ekstraktima sjemenki komorača dobivenih ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona, a zatim s 30 %-tnom vodenom otopinom metanola

Slika 9 prikazuje udjele ukupnih fenola (mg/100 g) u ekstraktima sjemenki komorača koji su dobiveni uzastopnim ekstrakcijama uz primjenu 30 %-tne vodene otopine acetona, a potom 30 %-tne vodene otopine metanola. Najviša koncentracija u acetonskim ekstraktima određena je u uzorku A6 i iznosi 469,10 mg/100 g, a najniža koncentracija određena je u uzorku A1 i iznosi 302,66 mg/100 g. Može se primijetiti da se porastom temperature i broja ciklusa prilikom ekstrakcije acetonom, koncentracija ukupnih fenola povećava. Uzorak u kojem je određena najniža koncentracija ukupnih fenola nakon ekstrakcije metanolom je M3 (87,19 mg/100 g). Najviša koncentracija u metanolnim ekstraktima određena je u uzorku M4 i iznosi 107,00 mg/100 g. Koncentracija ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima raste s porastom temperature, dok se povećanjem broja ciklusa smanjuje. Kako se u ovom istraživanju koristila uzastopna ekstrakcija acetonom u prvoj fazi, a zatim metanolom u drugoj fazi, dobivene niže koncentracije ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima su očekivane.

Anwar i sur. (2009) odredili su udio ukupnih fenola u sjemenkama slatkog komorača korištenjem 80 %-tnog i 100 %-tnog metanola te 80 %-tnog i 100 %-etanola kao ekstrakcijskih otapala, a uzorci su reekstrahirani još 2 puta. Ekstrakcija je provedena primjenom tresilice na sobnoj temperaturi tijekom 8 sati. Dobiveni raspon koncentracija iznosio je 627,21 – 967,50 mg/100 g. Zaključeno je da efikasnost ekstrakcije ukupnih fenolnih spojeva raste s porastom polarnosti otapala te da je najpogodnije otapalo za takvu ekstrakciju 80 %-tni etanol. Može se zaključiti da rezultati nisu u skladu s ovim istraživanjem zbog korištenja različitih otapala, vrste i vremena ekstrakcije te različite vrste komorača.

Souri i sur. (2008) koristili su za izolaciju i određivanje ukupnih fenola iz sjemenki komorača postupak maceracije. Ekstrakciju su proveli na sobnoj temperaturi tijekom nekoliko sati s 100 %-tnim metanolom kao otapalom u kojem su sjemenke bile natopljene. Ekstrakcija je ponovljena 2 puta. Koncentracija fenolnih spojeva iznosila je 165,07 mg/100 g.

Dua i sur. (2013) primijenili su ekstrakciju sjemenki komorača 80 %-tnim metanolom u trajanju od 4 sata, a ostatak uzorka nakon prve ekstrakcije podvrgli su dodatnoj ekstrakciji metanolom tijekom 2 sata. Eksperiment se odvijao pri sobnoj temperaturi, a kao ekstrakcijski uređaj koristila se tresilica. Koncentracija fenola u uzorku iznosila je 16,506 mg/g suhe tvari. U ovom istraživanju dobivene su više vrijednosti zbog upotrebe više temperature i uzastopne ekstrakcije različitim otapalima.

Soxhlet ekstrakcijom tijekom 6 sati uz korištenje metanola dobivena je koncentracija ukupnih fenola od 0,277 mg/g suhe tvari, a uz aceton kao ekstrakcijsko otapalo dobiveno je 0,364 mg ukupnih fenola/g suhe tvari. Pokus se provodio na sobnoj temperaturi. Koncentracija izražena na 100 g uzorka iznosila je 277 mg ukupnih fenola za metanolne ekstrakte i 364 mg ukupnih fenola za acetonske ekstrakte (Goswami i Chatterjee, 2014). Vrijednosti za acetonske ekstrakte odgovaraju vrijednostima dobivenim u ovom istraživanju. Međutim, u ovom istraživanju primijenjena je uzastopna ekstrakcija. Metanolom se zapravo ekstrahirao dio fenolnih spojeva zaostalih nakon ekstrakcije acetonom zbog čega su vrijednosti niže u usporedbi s vrijednostima u radu Goswami i Chatterjee (2014).

4.2. Određivanje ukupnih flavonoida

Tablica 4 sadrži podatke statističke obrade prema kojima se može zaključiti da broj ciklusa i temperatura ekstrakcije imaju signifikantan utjecaj na udio ukupnih flavonoida (mg/100 g) u acetonskim i metanolnim ekstraktima.

Tablica 4. Utjecaj temperature ekstrakcije i broja ciklusa na udio ukupnih flavonoida (mg/100 g) u ekstraktima sjemenki gorkog komorača dobivenih ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona, a zatim s 30 %-tnom vodenom otopinom metanola

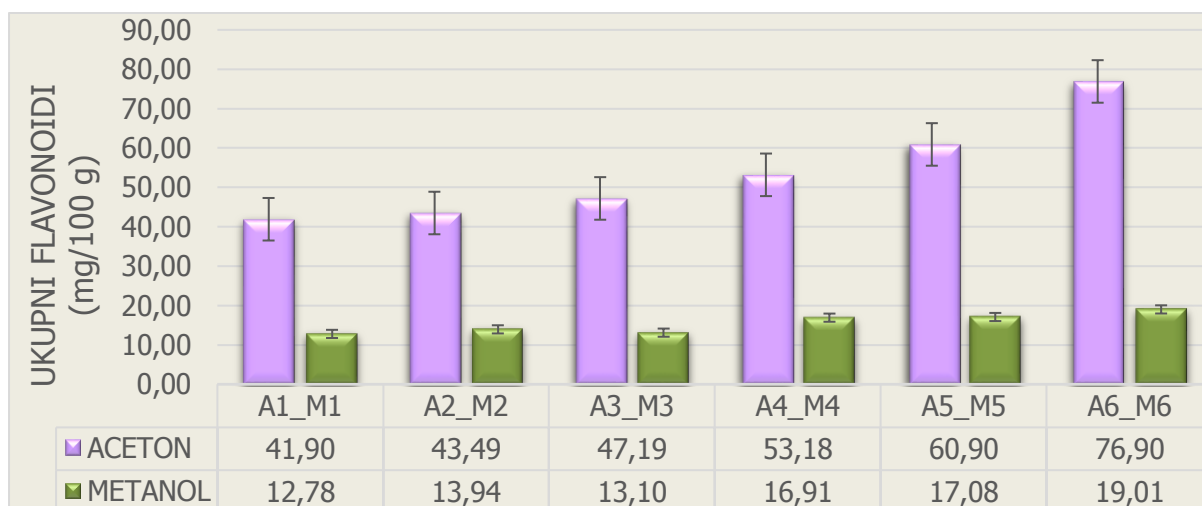
| Izvor varijacije | UKUPNI FLAVONOIDI (mg/100 g) | |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------|
| | 30 %-tni ACETON | 30 %-tni METANOL |
| Temperatura (°C) | p≤0,01* | p≤0,01* |
| 75 | 44,19±0,41 | 13,28±0,19 |
| 100 | 63,66±0,41 | 17,66±0,19 |
| Broj ciklusa | p≤0,01* | p=0,03* |
| 1 | 47,54±0,51 | 14,84±0,23 |
| 2 | 52,19±0,51 | 15,51±0,23 |
| 3 | 62,04±0,51 | 16,06±0,23 |
| Prosječna vrijednost | 53,93 | 15,47 |

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

**Statistički značajna varijacija kod p≤0,05.*

Optimalni uvjeti ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku za izolaciju ukupnih flavonoida pri kojima se postiže najveći prinos su:

- 30 %-tna vodena otopina acetona: 100 °C i 3 ciklusa
- 30 %-tna vodena otopina metanola: 100 °C i 3 ciklusa



Slika 10. Udio ukupnih flavonoida u ekstraktima sjemenki komorača dobivenih ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona, a zatim s 30 %-tnom vodenom otopinom metanola

Na slici 10 grafički su prikazani udjeli ukupnih flavonoida (mg/100 g) u ekstraktima sjemenki komorača koji su dobiveni uzastopnim ekstrakcijama uz primjenu 30 %-tne vodene otopine acetona, a potom 30 %-tne vodene otopine metanola. Vrijednosti ukupnih flavonoida za uzorke ekstrahirane 30 %-tnim acetonom kreću se od 41,90 mg/100 g do 76,90 mg/100 g, pri čemu je najviša vrijednost ukupnih flavonoida određena u uzorku A6, a najniža u uzorku A1. Može se uočiti da su porastom temperature i broja ciklusa u acetonskim ekstraktima rasli udjeli ukupnih flavonoida. Raspon koncentracija u metanolnim ekstraktima kreće se od 12,78 do 19,01 mg/100g. Najniža koncentracija ukupnih flavonoida određena je u uzorku M1, a najviša u uzorku M6. Kao i kod ekstrakcije acetonom, porast temperature i broja ciklusa u ekstrakciji metanolom rezultirali su porastom koncentracije ukupnih flavonoida.

Kaur i sur. (2009) određivali su ukupne flavonoide na način da su uzorke sjemenki komorača ekstrahirali 2 puta pri sobnoj temperaturi s 80 %-tnim metanolom. Ekstrakte su filtrirali i koncentrirali do konstantne mase. Prema rezultatima njihovog istraživanja udio ukupnih flavonoida u sjemenkama komorača iznosio je 15,06 % mase sjemenki. Rezultati se slažu s rezultatima ovog istraživanja.

Za izolaciju ukupnih fenola Dua i sur. (2013) primijenili su ekstrakciju suhih sjemenki komorača 80 %-tnim metanolom tijekom 4 sata te zatim ekstrakciju ostatka uzorka 80 %-tnim metanolom sljedećih 2 sata. Pri uvjetima sobne temperature i korištenjem tresilice, flavonoidi su izolirani u koncentraciji od 9,325 mg/g suhe tvari. Isto tako, primjenom HPLC-a provedena je i identifikacija flavonoida, gdje su određeni kvercetin (781,986 µg/g suhe tvari) te kempferol (92,856 µg/g suhe tvari). Usporedbom rezultata, može se primijetiti da je viši

udio ukupnih flavonoida određen u ovom radu, što je moguće uslijed primjene više temperature i različite metode ekstrakcije.

4.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

U tablici 5 prikazani su rezultati statističke obrade utjecaja temperature i broja ciklusa na antioksidacijski kapacitet (mg AAE/100 g) sjemenki komorača ekstrahiranih s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona, a potom 30 %-tnom vodenom otopinom metanola.

Tablica 5. Utjecaj temperature ekstrakcije i broja ciklusa na antioksidacijski kapacitet (mg AAE/100 g) u ekstraktima sjemenki gorkog komorača dobivenih ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona, a zatim s 30 %-tnom vodenom otopinom metanola

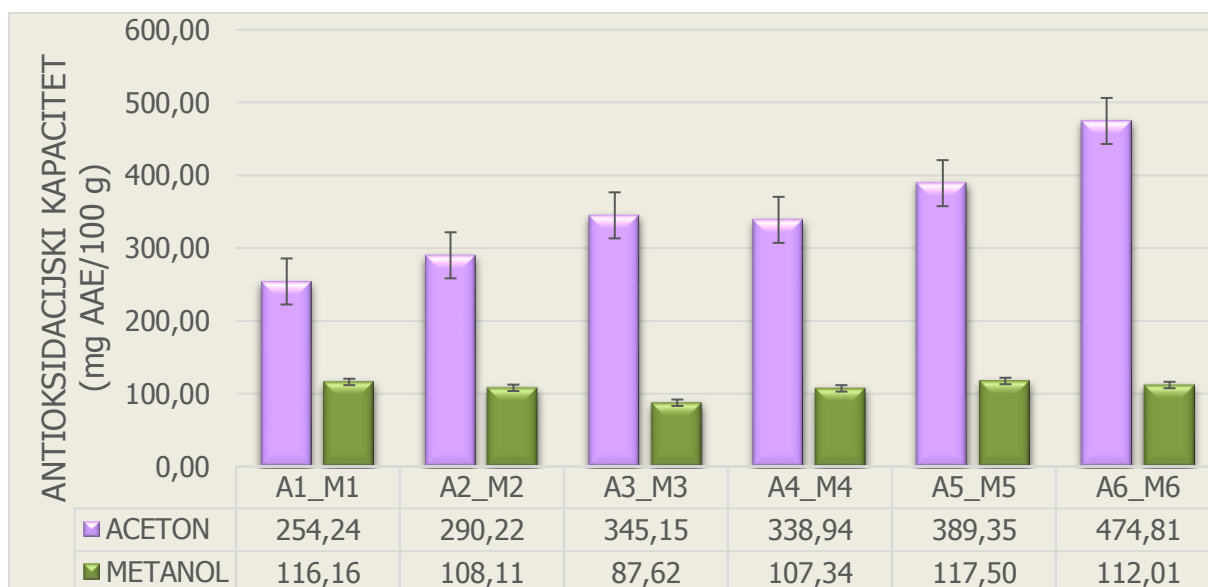
| Izvor varijacije | Antioksidacijski kapacitet (mg AAE/100 g) | |
|-----------------------------|---|------------------|
| | 30 %-tni ACETON | 30 %-tni METANOL |
| Temperatura (°C) | $p \leq 0,01^*$ | $p = 0,01^*$ |
| 75 | 296,54±4,94 | 103,96±1,38 |
| 100 | 401,03±4,94 | 112,28±1,38 |
| Broj ciklusa | $p \leq 0,01^*$ | $p \leq 0,01^*$ |
| 1 | 296,59±6,05 | 111,75±1,68 |
| 2 | 339,78±6,05 | 112,80±1,68 |
| 3 | 409,98±6,05 | 99,81±1,68 |
| Prosječna vrijednost | 348,78 | 108,12 |

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

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

Broj ciklusa i temperatura ekstrakcije imaju signifikantan utjecaj na antioksidacijski kapacitet, pri čemu je najviši antioksidacijski kapacitet određen u ekstraktima dobivenim pri sljedećim uvjetima:

- 30 %-tna vodena otopina acetona: 100 °C i 3 ciklusa
- 30 %-tna vodena otopina metanola: 100 °C i 2 ciklusa



Slika 11. Antioksidacijska aktivnost u ekstraktima sjemenki komorača dobivenih ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona, a zatim s 30 %-tnom vodenom otopinom metanola

Slika 11 prikazuje antioksidacijski kapacitet određen u ekstraktima sjemenki komorača koji su dobiveni uzastopnim ekstrakcijama uz primjenu 30 %-tne vodene otopine acetona, a potom 30 %-tne vodene otopine metanola. Najniža određena vrijednost antioksidacijskog kapaciteta za uzorke ekstrahirane 30 %-tnim acetonom iznosila je 254,24 mg AAE/100 g (A1), a najviša 474,81 mg AAE/100 g (A6). Nadalje, porastom temperature i broja ciklusa, raste i vrijednost antioksidacijskog kapaciteta. Najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u metanolnim ekstraktima određena je u uzorku M5 i iznosi 117,50 mg AAE/100g, a najniža vrijednost određena je u uzorku M3 i iznosi 87,62 mg AAE/100 g.

Goswami i Chatterjee (2014) određivali su antioksidacijski kapacitet u sjemenkama komorača FRAP metodom. Sjemenke komorača ekstrahirali su Soxhlet ekstrakcijom tijekom 6 sati, a kao ekstrakcijska otapala korišteni su metanol i aceton. Usporedno su proveli ekstrakciju destiliranom vodom na mehaničkoj tresilici tijekom 48 sati. Prema rezultatima njihova istraživanja antioksidacijski kapacitet određen u vodenim ekstraktima iznosio je 556,75 $\mu\text{mol/mL}$, u metanolnim ekstraktima 1172,97 $\mu\text{mol/mL}$ te 1059,45 $\mu\text{mol/mL}$ u acetonskim ekstraktima.

Chatterjee i sur. (2012) ekstrahirali su sjemenke komorača 90 %-tnim metanolom kroz 7 dana na sobnoj temperaturi. Ekstrakciju su ponovili još jednom, a dobiveni sadržaj su filtrirali i odredili antioksidacijski kapacitet FRAP metodom. Dobiveni rezultati kretali su se u rasponu od 7 do 48 mg AAE/g. Uspoređujući rezultate, u ovom istraživanju određen je viši

antioksidacijski kapacitet ekstrakata sjemenki komorača, što je moguće objasniti primjenom učinkovitije ekstrakcije fenolnih spojeva.

Tablica 6. Koeficijenti korelacije između udjela ukupnih fenola (mg/100 g), ukupnih flavonoida (mg/100 g) i antioksidacijskog kapaciteta (mg AAE/100 g) u ekstraktima sjemenki gorkog komorača dobivenih ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona, a zatim s 30 %-tnom vodenom otopinom metanola

| | Antioksidacijski kapacitet (mg AAE/100 g) | |
|---|--|-------------------------|
| | 30 %-tni ACETON | 30 %-tni METANOL |
| Udio ukupnih fenola (mg/100 g) | 0,96* | 0,59 |
| Udio ukupnih flavonoida (mg/100 g) | 0,97* | 0,40 |

**Statistički značajno kod $p \leq 0,05$.*

U tablici 6 prikazani su koeficijenti korelacije između udjela ukupnih fenola (mg/100 g), udjela ukupnih flavonoida (mg/100 g) i antioksidacijskog kapaciteta (mg AAE/100 g) određenima u ekstraktima sjemenki komorača ekstrahiranih s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona, a potom s 30 %-tnom vodenom otopinom metanola. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da antioksidacijski kapacitet u acetonskim ekstraktima ima vrlo visoku korelaciju s udjelima ukupnih fenola i ukupnih flavonoida, dok u metanolnim ekstraktima nema korelacije između navedenih parametara.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja i provedene statističke obrade može se zaključiti:

- 1.** Primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku uzastopnom ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom acetona u prvoj fazi, odnosno u acetonskim ekstraktima odmašćenih sjemenki komorača izolirano je prosječno 368,87 mg/100 g ukupnih fenola, 53,93 mg/100 g ukupnih flavonoida te je određen antioksidacijski kapacitet u vrijednosti od 348,78 mg AAE/100 g.
- 2.** Primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku uzastopnom ekstrakcijom s 30 %-tnom vodenom otopinom metanola u drugoj fazi, odnosno u metanolnim ekstraktima odmašćenih sjemenki komorača izolirano je prosječno 93,90 mg/100 g ukupnih fenola, 15,47 mg/100 g ukupnih flavonoida te je određen antioksidacijski kapacitet u vrijednosti od 108,12 mg AAE/100 g.
- 3.** Najviša koncentracija ukupnih fenola u acetonskim ekstraktima iznosila je 469,10 mg/100 g, a određena je u ekstraktu dobivenom pri 100 °C i 3 ciklusa, dok je najviša koncentracija ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima iznosila 107,00 mg/100 g, a određena je u ekstraktu dobivenom pri 100 °C i 1 ciklusu.
- 4.** Najviša koncentracija ukupnih flavonoida u acetonskim ekstraktima iznosila je 76,90 mg/100 g, a određena je u ekstraktu dobivenom pri 100 °C i 3 ciklusa, dok je najviša koncentracija ukupnih flavonoida u metanolnim ekstraktima bila 19,01 mg/100 g, a određena je u ekstraktu dobivenom pri 100 °C i 3 ciklusa.
- 5.** Antioksidacijski kapacitet u acetonskim ekstraktima određen je u znatno višim vrijednostima u odnosu na antioksidacijski kapacitet određen u metanolnim ekstraktima, gdje se ujedno pokazala vrlo visoka korelacija između antioksidacijskog kapaciteta i udjela ukupnih fenola te ukupnih flavonoida.

6.LITERATURA

Anonymous 1 i 2, <<https://pixabay.com/images/search/fennel/.html>>. Pristupljeno 28. svibnja 2019.

Abdullah Y., Schneider B., Petersen M. (2008) Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species. *Phytochemistry Letters* **1(4)**: 199 - 203.

Anwar F., Alia M., Hussaina A. I., Shahida M. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour and Fragrance Journal* **24**: 170 - 176.

Badgujar S. B., Patel V. V., Bandivdekar A. H. (2014) *Foeniculum vulgare* Mill: a review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *BioMed Research International* **2014**: 1 - 32.

Barros L., Carvalho A. M., Ferreira I. (2010) The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): Shoots, leaves, stems and inflorescences. *Food Science and Technology* **43**: 814 – 818.

Baxter H., Harborne J. B. (1999) *Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants*, 2. izd., Moss G.P., ur., Taylor & Francis, Abingdon. str. 407 - 428.

Bernath J., Nemeth E., Kattaa A., Hethelyi E. (1996) Morphological and chemical evaluation of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) populations of different origin. *Journal of Essential Oil Research* **8(3)**: 247 - 253.

Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56(11)**: 317 - 333.

Burton G. W., Foster D. O., Perly B., Slater T. F., Smith I. C. P., Ingold K. U. (1985) Biological antioxidants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences* **311(1152)**: 565 - 578.

Chatterjee S., Goswami N., Bhatnagar P. (2012) Estimation of Phenolic Components and in vitro Antioxidant Activity of Fennel (*Foeniculum vulgare*) and Ajwain (*Trachyspermum ammi*) seeds. *Advances in BioResearch* **3(2)**: 109 - 118.

Chen Z. Y., Chan P. T., Ho K. Y., Fung K. P., Wang J. (1996) Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids* **79(2)**: 157 - 163.

Christova-Bagdassarian V. L., Bagdassaria K. S., Atanassova M. S. (2013) Phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activities from the Apiaceae family (dry seeds). *Mintage Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences* **2(4)**: 26 - 31.

Crozier A., Jaganath I. B., Clifford M. N. (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* **26(8)**: 1001 - 1043.

Dai J., Mumper R. J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15(10)**: 7313 - 7352.

De Castro M. L., Priego-Capote F. (2010) Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography* **1217(16)**: 2383 - 2389.

Dionex A. S. E. (2011) 350 Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual.

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.

Fegredo J. A., Wong M. C. Y., Wiseman H., Preedy V. R. (2009) Manual and robotic methods for measuring the total antioxidant capacity of beers. *Beer in Health and Disease Prevention*. Preedy V. R., ur., *Academic Press*, str. 991 - 1002.

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.

Grić Lj. (1990) Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, 2.izd., August Cesarec, Zagreb. str. 225 - 226.

Halliwell B., (1990) How to Characterize a Biological Antioxidant. *Free Radical Research Communications* **9(1)**: 1 - 32.

- Heemken O. P., Theobald N., Wenclawiak B. W. (1997) Comparison of ASE and SFE with Soxhlet, sonication, and methanolic saponification extractions for the determination of organic micropollutants in marine particulate matter. *Analytical Chemistry* **69(11)**: 2171 - 2180.
- Kaur G. J., Arora D. S. (2009) Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **9(1)**: 30.
- Kooti W., Moradi M. T., Ali-Akbari S., Sharafi-Ahvazi N., Asadi-Samani M., Ashtary-Larky D. (2015) Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: a review. *Journal of HerbMed Pharmacology*, **4(1)**: 1 - 9.
- Kumar S., Pandey A. K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* **2013**: 1 - 16.
- Losic D., Mitchell J. G., Voelcker N. H. (2009) Diatomaceous lessons in nanotechnology and advanced materials. *Advanced Materials* **21(29)**: 2947 - 2958.
- Mustafa A., Turner C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta* **703(1)**: 8 - 18.
- Oktay M., Gülçin İ., Küfrevioğlu Ö. İ. (2003) Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT-Food Science and Technology* **36(2)**: 263 - 271.
- Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Schmeda-Hirschmann G., Burillo J., Codina, C. (2004) Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52(7)**: 1890 - 1897.
- Rahimi R., Ardekani M. R. S. (2013) Medicinal properties of *Foeniculum vulgare* Mill. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy. *Chinese Journal of Integrative Medicine* **19(1)**: 73 - 79.
- Rapić V. (1994) Postupci priprave i izolacije organskih spojeva. Školska knjiga, Zagreb. str. 52 - 60.

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.

Reichardt C., Welton T. (2011) Solvents and solvent effects in organic chemistry. John Wiley & Sons, Inc. str. 1 - 30.

Robards K., Antolovich M. (1997) Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst* **122**: 11 - 34.

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.

Rodríguez-Solana R., Salgado J. M., Domínguez J. M., Cortés-Diéguez S. (2014) Characterization of fennel extracts and quantification of estragole: Optimization and comparison of accelerated solvent extraction and Soxhlet techniques. *Industrial Crops and Products* **52**: 528 - 536.

Shortle E., O'Grady M.N., Gilroy D., Furey A., Quinn N., Kerry J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Science* **98(4)**: 828 - 834.

Smallwood I. (2012) Handbook of organic solvent properties, Butterworth-Heinemann, Oxford. str. 7 - 301.

Souri E., Amin G., Farsam, H. (2008) Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* **16(2)**: 83 - 87.

Toplak Galle K. (2001) Hrvatsko Ljekovito Bilje, 1.izd., Mozaik knjiga, Zagreb. str. 106 - 107.

Tsao R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2(12)**: 1231 - 1246.

Xu B. J., Chang S. K. C. (2007) A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science* **72(2)**: 159 -166.

Šilješ I., Grozdanić D., Grgesina I. (1992) Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja, 1. izd., Školska knjiga, Zagreb. str. 53 - 58.

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.

Petra Jonković

ime i prezime studenta