

Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva iz ploda kultiviranog komorača (Foeniculum vulgare) primjenom ultrazvuka

Marinčić, Ivona

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:350616>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Ivona Marinčić

7374/PT

**EKSTRAKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA IZ PLODA
KULTIVIRANOG KOMORAČA (*Foeniculum vulgare*)
PRIMJENOM ULTRAZVUKA**

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. Zoran Zorić

Zagreb, 2021.



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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

EKSTRAKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA IZ PLODA KULTIVIRANOG KOMORAČA (*Foeniculum vulgare*) PRIMJENOM ULTRAZVUKA

Ivona Marinčić, 0058210385

Sažetak: Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj različitih gnojidbenih tretmana (organsko, mineralno i organsko-mineralno gnojivo) kao i ekstrakcijskog otapala (H₂O, 50% etanol, 96% etanol) na udio ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijsku aktivnost u ekstraktima odmašćenih sjemenki komorača dobivenih ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (UAE). Ukupni fenoli, hidroksicimetne kiseline i antioksidacijska aktivnost određene su spektrofotometrijski. Statistička analiza pokazala je da su svi ispitani parametri ekstrakcije imali statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$) na masene udjele ispitivanih spojeva. Najveći prinos ukupnih fenola i hidroksicimetnih kiselina dobiven je kod tretmana s organsko-mineralnim gnojivom, a antioksidacijske aktivnosti kod tretmana mineralnim gnojivom. U ovisnosti upotrebe različitih ekstrakcijskih otapala, najveći prinos ukupnih fenola je dobiven upotrebom vode kao ekstrakcijskog otapala, a hidroksicimetnih kiselina i antioksidacijske aktivnosti upotrebom 96% etanola.

Ključne riječi: ultrazvučna ekstrakcija, bioaktivni spojevi, fenolni spojevi, hidroksicimetne kiseline, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 30 stranica, 12 slika, 05 tablica, 72 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Zoran Zorić

Rad predan: 08.rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Food Technology

Department of Food Engineering

Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM THE CULTIVATED FENNEL (*Foeniculum vulgare*)

Ivona Marinčić, 0058210385

Abstract: The aim of this study was to examine the effect of different fertilization treatments (organic, mineral and organic-mineral fertilizer) and extraction solvents (50% ethanol, 96% ethanol, H₂O) on mass fractions of total phenolic compounds, hydroxycinnamic acids and antioxidant activity in extracts obtained from defatted fennel seeds by ultrasound-assisted extraction (UAE). Total phenolic compounds, hydroxycinnamate acids and antioxidant activity were analysed by spectrophotometric methods. Statistical analysis showed that all examined extraction parameters significantly affected ($p \leq 0.05$) the mass fractions of the analysed compounds. The highest yield of total phenols and hydroxycinnamic acids was obtained in the treatment with organic-mineral fertilizer, and antioxidant activity in the treatment with mineral fertilizer. Depending on the use of different extraction solvents, the highest yield of total phenols was obtained by using water as the extraction solvent, while hydroxycinnamic acids and antioxidant activity using 96% ethanol.

Keywords: ultrasound-assisted extraction, bioactive compounds, phenolic compounds, hydroxycinnamic acids, antioxidant activity

Thesis contains: 30 pages, 12 figures, 5 tables, 72 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Ph.D. Zoran Zorić, Assistant professor

Thesis delivered: September 08th 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KOMORAČ	2
2.2. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI SJEMENKI KOMORAČA	3
2.2.1. Fenolni spojevi.....	3
2.2.2. Antioksidacijski kapacitet	6
2.3. GNOJIDBENI TRETMANI I NJIHOV UTJECAJ NA BILJKU	7
2.4. EKSTRAKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA PRIMJENOM ULTRAZVUKA	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. MATERIJALI	9
3.1.1. Sjemenke komorača.....	9
3.1.2. Kemikalije i standardi.....	9
3.1.3. Aparatura.....	10
3.1.4. Pribor	10
3.2. METODE RADA	11
3.2.1. Određivanje ukupne suhe tvari.....	11
3.2.2. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva uz primjenu ultrazvuka.....	11
3.2.3. Određivanje ukupnih fenola	12
3.2.4. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina	14
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom.....	15
3.2.6. Statistička obrada rezultata	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. UKUPNA SUHA TVAR	18
4.2. UKUPNI FENOLI I HIDROKSICIMETNE KISELINE	18
4.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET – DPPH METODA	20

4.4. STATISTIČKA ANALIZA – UTJECAJ TRETMANA I EKSTRAKCIJSKOG OTAPALA	22
5. ZAKLJUČAK	24
6. LITERATURA	25

1. UVOD

Komorač (*Foeniculum vulgare*) je samonikla višegodišnja biljka aromatična okusa i mirisa koja se zbog antiseptičkog, antireumatskog i diuretičkog djelovanja koristi u prehrambene, ljekovite i kozmetičke svrhe. Sjemenke komorača obiluju velikim količinama bioaktivnih spojeva, poput fenola koji su poznati antioksidansi jer suzbijaju slobodne radikale te na taj način doprinose zdravlju ljudi.

Upravo zbog blagotvornog djelovanja bioaktivnih molekula na ljudski organizam, povećava se broj znanstvenih istraživanja o njima te njihovoj izolaciji iz bilja. Jedna od novijih tehnika ekstrakcije bioaktivnih molekula je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom koja ima veliku industrijsku važnost u tehnologiji prerade hrane jer se njome postiže veći prinos željenih supstanci, uz smanjenje vremena ekstrakcije i korištenja otapala.

Stoga je cilj ovog rada bio ispitati utjecaj različitih gnojidbenih tretmana (organsko, mineralno i organsko-mineralno gnojivo) kao i ekstrakcijskog otapala (H₂O, 50% etanol, 96% etanol) na udio ukupnih fenola, hidroksicimernih kiselina te antioksidacijsku aktivnost u ekstraktima odmašćenih sjemenki komorača dobivenih ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (UAE).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KOMORAČ

Komorač (*Foeniculum vulgare*) je samonikla ili kultivirana višegodišnja, aromatična začinska biljka koja pripada obitelji štitarki (*Apiaceae*). *Foeniculum vulgare* (slika 1) je uspravna, razgranata biljka s mekanim i pernatim lišćem koje može biti dugo do 40 centimetara, a sama biljka može narasti do 2 metra visine. Cvjetovi komorača su svijetlo zlatne boje te su skupljeni u štitaste cvatove, a sjemenke su lagano zakrivljene, zelenkasto-žute boje (Badgujar i sur., 2014).



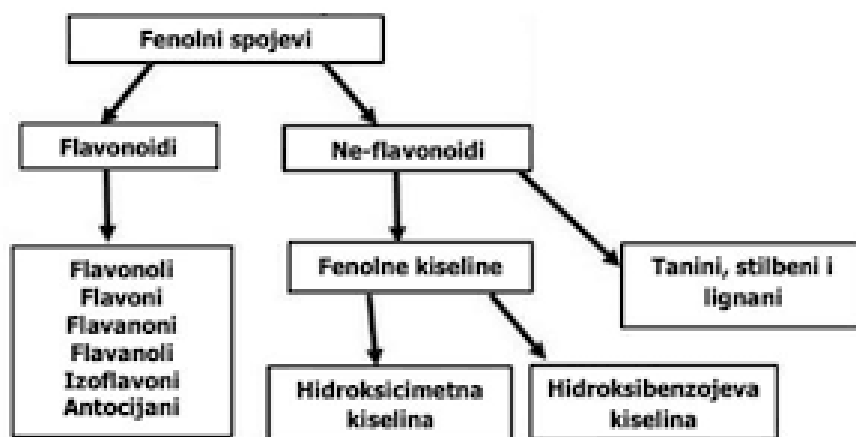
Slika 1. Prikaz komorača (Köhler, 1887)

Komorač se uzgaja od davnina te je njegova ljekovitost već bila poznata starim Grcima, Rimljanima i Egipćanima. Podrijetlom je iz Sredozemlja i Bliskog istoka, a proširena je na daleki istok sve do Japana i Kine te na zapad gdje je rasprostranjen u objema Amerikama (Hegi, 1926.). U Hrvatskoj je jako zastupljen na svim otocima i u primorskim i priobalnim krajevima. Za uspješan rast i razvoj, komorač treba topla ljeta i blage zime to jest najbolje uspijeva u područjima umjerene klime. Raste na neobrađenim i suhim tlima, no također i na oranicama. Poznato je nekoliko podvrsta i varijeteta koromača: *Foeniculum vulgare* subsp. (podvrsta) *piperitum* i subsp. *vulgare* unutar kojih se ističu varijeteti *vulgare*, divlji koromač koji se javlja samoniklo, i var. *dulce*, slatki koromač, koji se uzgaja (S. Pignatti, 1982.).

2.2. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI SJEMENKI KOMORAČA

2.2.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su najveća skupina sekundarnih biljnih metabolita koji pokazuju veliku raznolikost struktura, od jednostavnih spojeva poput fenolnih kiselina do polifenola poput flavonoida. Sastoje se od jednog ili više aromatskih prstenova koji posjeduju jednu ili više hidroksilnu grupu (Dai i Mumper, 2010). Biljni fenoli su kemijski jako raznolika skupina spojeva zbog čega su u literaturi prisutni mnogi načini njihove klasifikacije: na temelju biološke aktivnosti, biosintetskog puta, prema strukturi, na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli i slično (Tsao, 2010). Prema kemijskoj strukturi možemo ih podijeliti na neflavonoide i flavonoide (slika 2). Ne-flavonoide dijelimo na fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne), tanine, stilbene i kumarine dok se flavonoidi dijele na flavone, flavonole, flavane, izoflavone, flavanone i antocijanidine (Whale i sur., 2010).

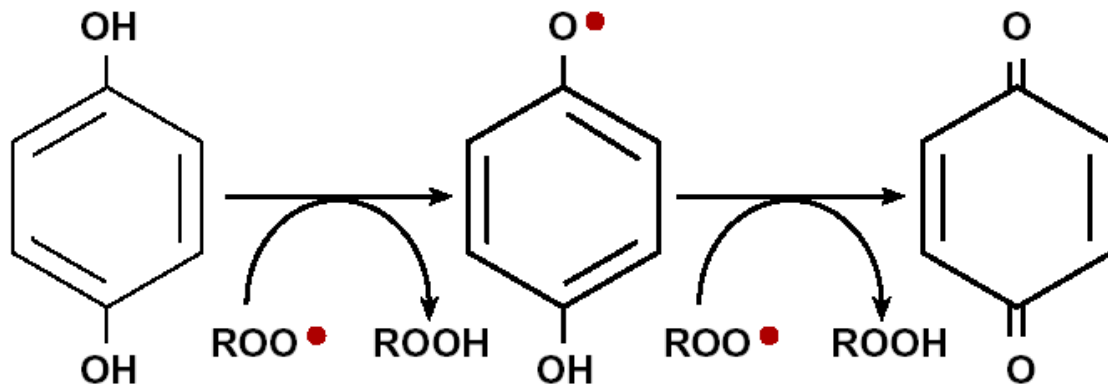


Slika 2. Klasifikacija fenolnih spojeva prema kemijskoj strukturi (Shirahigue i Ceccato-Antonini, 2020)

Biljni fenoli imaju razne uloge poput obrane biljke od herbivornih organizama, privlačenje oprašivača, sudjelovanje u mehaničkoj potpori i redukciji rasta susjednih biljaka (Pevalek-Kozlina, 2003.)

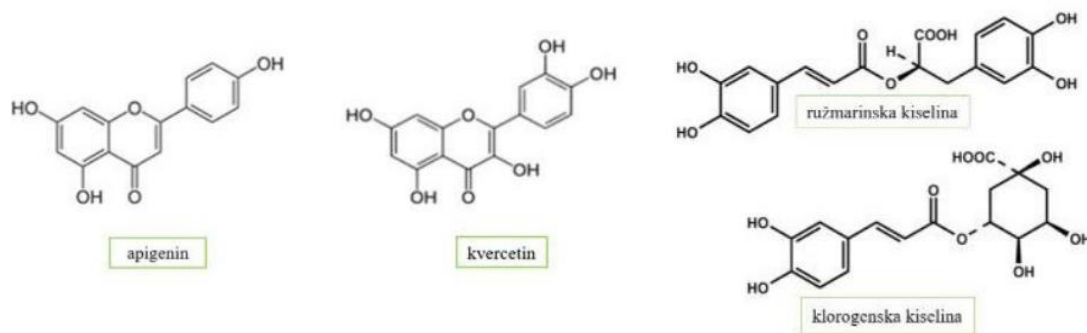
Fenolni spojevi sveprisutni su u svim biljnim organima i zbog toga su sastavni dio ljudske prehrane gdje igraju važnu ulogu u prevenciji bolesti (Bravo, 1998; Kabera i sur., 2014; Tungmunnithum i sur., 2018). Visok unos povrća i voća, odnosno namirnica bogatih polifenolima, povezan je sa smanjenim rizikom brojnih kroničnih bolesti poput raka, kardiovaskularnih bolesti i kroničnih upala (Scalbert i sur., 2005; Sharma, 2014). Razlog tome

je antioksidativno djelovanje polifenola koji mogu neutralizirati slobodne radikale i to tako da im doniraju elektron (slika 3).



Slika 3. Mehanizam djelovanja antioksidansa (Ravi Kiran Tadapaneni, 2010)

Kooti i suradnici (2015) su u svom istraživanju pokazali da su u ekstraktu komorača prisutne različite skupine kemijskih spojeva od kojih su fenolni spojevi jedni od najzastupljenijih. U istraživanju koje su proveli Roby i suradnici (2013.) dokazali su da su od fenolnih kiselina najzastupljenije klorogenska i ružmarinska kiselina, a od flavonoida kvercetin i apigenin (slika 4).



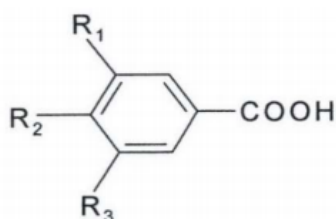
Slika 4. Kemijska struktura apigenina i kvercetina (Jangdey i sur., 2018) te ružmarinske i klorogenske kiseline (Abdullah i sur., 2008)

2.2.1.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline i njihovi derivati spadaju u podskupinu neflavonoida koja je široko rasprostranjena u biljnom carstvu. Zahvaljujući svom protuupalnom, antimikrobnom, antikancerogenom, antialergijskom i antivirusnom djelovanju, pojačava se zanimanje za njihovim istraživanjem (Jolić 2017.).

Obzirom na osnovnu strukturu razlikujemo dvije podskupine fenolnih kiselina: derivate hidroksibenzojeve kiseline i derivate hidroksicimetne kiseline (Celep i sur., 2014).

Hidroksibenzojeve kiseline (HBA), osnovne strukture C₆-C₁ (slika 5), nastaju izravno iz benzojeve kiseline te su obično prisutne kao slobodne kiseline (Greblo, 2009).

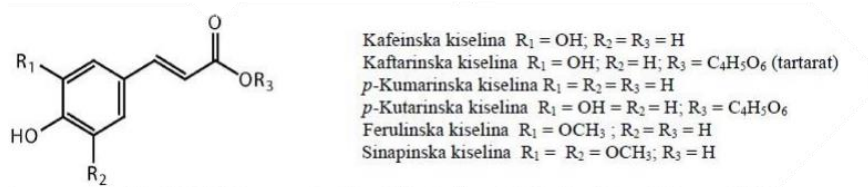


Slika 5. Osnovna struktura hidroksibenzojevih kiselina (Robards i sur., 1999)

Među najrasprostranjenije HBA spadaju: siriginska, protokatehinska, vanilinska, galna, *m*-hidroksibenzojeva i *p*-hidroksibenzojeva kiselina (Jolić, 2017).

Hidroksicimetne kiseline (HCA) se razlikuju po vrsti i broju supstituenata koji su vezani na benzenskom prstenu (slika 6), a u prirodi uglavnom dolaze u različitim konjugiranim oblicima te kao esteri (Macheix i sur., 1990).

Među najrasprostranjenije HCA spadaju: ferulinska, sinapinska, *p*-kumarinska te kafeinska kiselina (Tomaz, 2016.).



Slika 6. Osnovna struktura hidroksicimetnih kiselina (Tomaz, 2016)

Hidroksicimetne kiseline djeluju kao snažni antioksidansi te imaju različite fiziološke uloge u biološkim sustavima. Istraživanja su dokazala da se HCA mogu koristiti u preventivne ili terapijske svrhe u više vrsta bolesti uzrokovane oksidacijskim stresom poput raka, kardiovaskularnih bolesti, ateroskleroze i drugo.

2.2.2. Antioksidacijski kapacitet

Slobodni radikali su definirani kao bilo koja molekularna vrsta sposobna za samostalno postojanje koja sadrži nespareni elektron u atomskoj orbitali (Lobo, 2010). Slobodni radikali uzrokuju oštećenja biološki važnih molekula poput DNA, proteina, lipida i ugljikohidrata (Young, 2001).

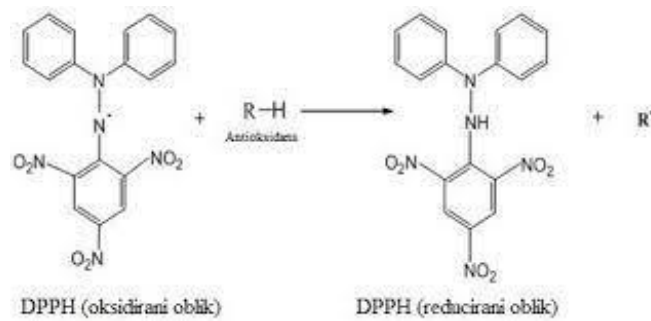
Gutteridge (1994) je definirao antioksidanse kao bilo koju tvar koja kada je prisutna u relativno niskoj koncentraciji u odnosu na oksidirajući supstrat, znatno inhibira ili odgađa oksidaciju tog supstrata. Njegova molekularna struktura omogućuje preuzimanje nevezanog elektrona iz slobodnog radikala i na taj način stabilizira molekulu (Valko i sur., 2006).

U cilju pravilnog funkcioniranja stanice, od iznimne važnosti je održavati ravnotežu između slobodnih radikala i antioksidansa (Valko i sur., 2006). Ukoliko je ona nepovoljna, odnosno povećana je koncentracija slobodnih radikala u odnosu na antioksidanse, tada dolazi do oksidacijskog stresa odnosno stanja organizma koje može dovesti do raznih upalnih, srčanih, neuroloških i drugih bolesti (Rao, 2006).

U posljednje vrijeme uloga antioksidansa u održavanju zdravlja i prevenciji bolesti i poremećaja je dobila na velikoj važnosti te ne čudi što je veliki dio istraživanja usmjeren baš na njih. Antioksidacijski kapacitet se može različito definirati. On može značiti sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, sposobnost inhibicije oksidacije ili sposobnost sprječavanja bolesti (Niki, 2011). Kao što je već rečeno, antioksidansi su vrlo zanimljivi u nutricionizmu, farmaciji, medicini i agrokemijskim područjima, što je dovelo do potrebe za potražnjom jednostavnih no pouzdanih metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta.

Prema tipu kemijske reakcije koje se odvijaju, metode za određivanje antioksidacijskog kapaciteta mogu se ugrubo podijeliti u 2 grupe (Prior i sur., 2005.; Badarinath i sur., 2010.):

- HAT (Hydrogen Atom Transfer) metode – prijenos atoma vodika, u koje spadaju: ORAC, TRAP, CAA, CUPRAC, ECL i ABTS
- SET (Single Electron Transfer) metode – prijenos elektrona, u koje spadaju: FCR, TEAC, FRAP i DPPH (slika 7)



Slika 7. Reakcija redukcije DPPH (Casanovas i sur., 2015)

2.3. GNOJIDBENI TRETMANI I NJIHOV UTJECAJ NA BILJKU

Prinos svih poljoprivrednih kultura u znatnoj mjeri ovisi o količini pristupačnih hranjiva u tlu (Lončarić i sur., 1999). Šimunić i sur. (2007) u svom istraživanju navode da se intenzivnom agrotehnikom količina hranjivih tvari u tlu na području Republike Hrvatske sve više smanjuje, a nadoknađivanje hranjiva, koje je iscrpila prethodna kultura, ili obogaćivanje tla humusom se vrše gnojidbom. Kako bi se osigurali visoki prinosi u konvencionalnoj proizvodnji, biljke treba gnojiti i prije i tijekom uzgoja. Primjena gnojiva utječe na prinos, kvalitetu i kemijski sastav proizvoda, te kako ne bi bilo negativnih posljedica, nužna je primjena dobro proučene i razumne gnojidbe (Radman, 2015). Povećana upotreba mineralnih gnojiva i pesticida utječe na prehranu biljaka, no također može smanjiti mikrobiološke kulture tla te ugroziti održivu proizvodnju i zdravlje ekosustava. No s druge strane, upravljanje tlom bez gnojidbe dovodi do značajnih gubitaka prinosa (Maričić i sur., 2021). Ukoliko se koristi neprimjerena gnojidba, dolazi do negativnih učinaka na kakvoću, odnosno količinu aktivnih tvari (Šilješ i sur., 1992) te upravo zbog toga je potrebno poznavati raspoloživost hranjiva u tlu, ali i primjenjivati gnojiva u skladu s biološkim, ekonomskim i ekološkim uvjetima.

Bergmann (1992) je zaključio da se gnojiva trebaju koristiti ekonomično, u cilju podizanja količine pristupačnih hranjiva u tlu i zadovoljavanja potreba biljaka za normalnim rastom i razvojem.

2.4. EKSTRAKCIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA PRIMJENOM ULTRAZVUKA

Ekstrakcija biološki aktivnih spojeva je prvi korak analize aromatičnih i medicinskih biljaka te igra ključnu ulogu u njihovoj separaciji i karakterizaciji. Definira se kao metoda u kojoj se biljno ili životinjsko tkivo tretira kroz standardne postupke sa selektivnim otapalima u svrhu otapanja farmaceutski aktivnih sastojaka, dok većina inertne tvari ostaje neotopljena (Manousi i sur., 2019). Danas postoji širok raspon različitih tehnika ekstrakcije. Osim konvencionalnih metoda,

razvijeno je puno novih postupaka, a jedan od njih je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE).

Ultrazvuk visoke snage, uslijed djelovanja kavitacija na stanični materijal omogućuje veće prodiranje otapala u materijal te također povećava prijenos mase. Uslijed pucanja staničnih stjenki dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice (Vinatoru, 2001). Na taj način se ubrzava ekstrakcija i povećava njena efikasnost. Mehanizam ekstrakcije ultrazvukom uključuje dvije vrste fizikalnih promjena: difuzija kroz stanični zid i ispiranje sadržaja stanice nakon probijanja zidova (Mason i suradnici, 1996). Učinak ultrazvuka je puno korisniji pri nižim frekvencijama (18–40 kHz) jer tada dominiraju mehanički učinci fenomena kavitacije kao što su turbulencije i strujanje tekućine (Vinatoru, 2001).

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija je relativno jednostavna metoda za izvesti u laboratorijskim uvjetima jer ne zahtjeva skupe aparate ni kemikalije. Uzorak, po mogućnosti usitnjeni, se pomiješa s otapalom te stavi u ultrazvučnu kupelj na kojoj se prethodno namjesti odgovarajuća temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije. Temperatura, snaga ultrazvuka i izbor otapala su jako bitni faktori koje je potrebno podesiti kako bi se postigao maksimalan prinos. U usporedbi sa ostalim tehnikama ekstrakcije, posebno konvencionalnim, prednost UAE je ta što ona omogućuje visok prinos, korištenje nižih temperatura i manjih količina otapala te je jednostavnija za rukovanje (Chemat, Tomao i Viro, 2008). Osim što je količina otapala koja se koristi smanjena, također je skraćeno ekstrakcijsko vrijeme te se kod ekstrakcija u vodenoj sredini organska otapala mogu zamijeniti sa otapalima koja su generalno priznata kao sigurna (Vilkhu i sur., 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sjemenke komorača

U ovom istraživanju korištene su sjemenke kultiviranog komorača (*Foeniculum vulgare*) koji su tijekom uzgoja tretirani sa 3 različita gnojdbena tretmana (organsko, mineralno i organsko-mineralno gnojivo. Neposredno prije provođenja UAE upotrebom različitih otapala (H₂O, 50% etanol i 96% etanol) sjemenke komorača su usitnjene u tarioniku te se tako usitnjeni materijal koristio za daljnje pokuse.

Tablica 1. Uzorci sjemenki kultiviranog komorača

OZNAKA UZORKA	TRETMAN
1	Kontrola
2	Organsko gnojivo
3	Mineralno gnojivo
4	Organsko-mineralno gnojivo

3.1.2. Kemikalije i standardi

- Etanol, 50%
- Etanol, 96%
- Destilirana voda
- Folin Ciocalteu reagens
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

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

- Standard galne kiseline

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje se odvaži 0,5 grama galne kiseline te se otopi u 10 mililitara 96% etanola u odmjerne tikvici od 100 mililitara, a potom se nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Metanol, 100%
- 0,5 mM otopina DPPH

Priprema: 0,02g DPPH radikala se otopi u 100% metanolu u odmjerne tikvici od 100 mL

- Otopina standarda – Trolox
- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37%
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1g/L HCl

Priprema: 0,227 mL 37% koncentrirane klorovodične kiseline se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni 96% etanolom do oznake

- Klorovodična otopina masene koncentracije 2g/L HCl

Priprema: 0,454 mL 37 % koncentrirane klorovodične kiseline se otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni destiliranom vodom do oznake

- Metanol, 80%
- Standard kafeinske kiseline (100 mg/L)

Priprema: U plastičnoj lađici za vaganje se odvažuje 10 mg standarda kafeinske kiseline te se pomoću 5 ml 80%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopi u datom volumenu, a zatim se nadopuni do oznake 80%-tnim metanolom

- Kvarcni pijesak

3.1.3. Aparatura

- Ultrazvučna kupelj (Elmasonic S 40H, Elma, Njemačka)
- Analitička vaga
- Kupelj rotavapora
- Vortex
- Spektrofotometar (UV-VIS spektrofotometar Uviline 9400, Secomam, Francuska)
- Laboratorijski sušionik (FN 500, Nuve, Turska)
- Eksikator

3.1.4. Pribor

- Plastične epruvete (Falcon) (50 mL)
- Stalak za epruvete
- Filter papir
- Stakleni lijevak
- Stakleni štapić
- Odmjerne tikvice volumena 5 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL i 1 L
- Pipete volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
- Automatske mikropipete (100 µL, 1000 µL, 5 mL)
- Staklene kivete
- Staklene čaše volumena 50 mL i 100 mL
- Špatula

- Menzura volumena 50 mL, 100 mL i 1 L
- Aluminijske posudice s poklopcima
- Staklene čaše
- Eppendorf epruvete volumena 2,5 mL

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje ukupne suhe tvari

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda koja ne isparava pod definiranim uvjetima (Pravilnik, 1983). Postoje mnoge različite metode za određivanje ukupne suhe tvari, a u ovom istraživanju korištena je metoda sušenja na 105 °C kod koje se određuje ostatak uzorka nakon sušenja na 105 °C do konstantne mase.

Postupak određivanja:

U osušenu i izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem stavi se oko 2 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić te se suši u sušioniku pri 105 °C oko 2 sata sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja posudica se zatvori poklopcem te hladi u eksikatoru, a zatim se izvaže za točnošću ±0,0002 g. U ohlađenu i izvaganu posudicu s pijeskom stavi se oko 1 g uzorka i dobro izmiješa pomoću staklenog štapića, a zatim se sve zajedno važe sa točnošću od ±0,0002 g. Aluminijska posudica s pijeskom i uzorkom stavi se u laboratorijski sušionik te se zagrijava 1 sat sa otklopljenim poklopcem na temperaturi od 105 °C. Nakon hlađenja u eksikatoru i vaganja sušenje se nastavlja toliko dugo dok razlika između dva uzastopna sušenja, u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001 g. Važe se ponovno s točnošću ± 0,0002g.

Izračun:

Ukupna suha tvar izračuna se prema sljedećoj formuli:

$$\text{Ukupna suha tvar (\%)} = \frac{m_3 - m_1}{m_2} \times 100$$

Gdje je:

m_1 - masa posudice i kvarcnog pijeska (g)

m_2 – masa posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja (g)

m_3 – masa posudice s ispitivanim uzorkom nakon sušenja (g)

3.2.2. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva uz primjenu ultrazvuka

Izolacija bioaktivnih spojeva iz sjemenki kultiviranog komorača je provedena primjenom UAE na uređaju Elmasonic S 40H, Elma, Njemačka (slika 8).



Slika 8. Ultrazvučna kupelj (vlastita fotografija)

Postupak ekstrakcije:

U epruvete odvaže se 2 g ($\pm 0,1$ g) usitnjenih i odmašćenih sjemenki kultiviranog komorača te se doda 4 mL ekstrakcijskog otapala. Ekstrakcija se provodi u ultrazvučnoj kupelji na temperaturi od 50 °C u trajanju od 30 minuta. Po završetku ekstrakcije, ekstrakt se profiltrira kroz naborani filter papir u odmjernu tikvicu od 5 mL i nadopuni ekstrakcijskim otapalom do oznake. Ekstrakti se skladište na +4 °C do provođenja daljnjih analiza.

3.2.3. Određivanje ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola provodi se u etanolnom i vodenom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode koja temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja:

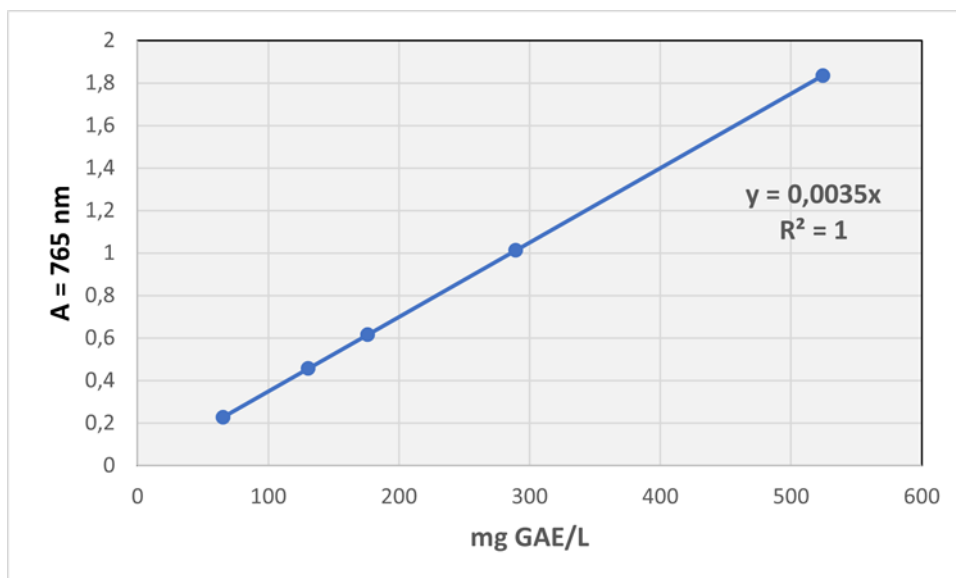
U staklenu epruvetu redom se otpipetira 100 μ L ekstrakta, 200 μ L Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata te sve skupa pomoću Vortexa promiješa, a potom se uzorci termostatiraju, u kupelji od rotavapora (slika 9), 25 minuta na temperaturi od 50 °C. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Na isti način se pripremi slijepa proba, no za slijepu probu se umjesto ekstrakta uzima isti volumen otapala za ekstrakciju.



Slika 9. Kupelj rotavapora (vlastita fotografija)

Izrada baždarnog pravca:

Za pripremu baždarnog pravca odvaž se 0,5 g galne kiseline, otopi u 10 mL 96 %- tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopune do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μ L otopine standarda u staklene epruvete, te se redom dodaje 200 μ L Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata te se sve skupa pomoću Vortexa promiješa, nakon čega se uzorci termostatiraju 25 minuta pri 50 °C (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100 μ L destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm, a iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrt se baždarni pravac (slika 10) pri čemu su na apscisi nanese koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



Slika 10. Baždarni dijagram za ukupne fenole

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

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

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

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

R^2 – koeficijent determinacije

3.2.4. Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se u etanolnom i vodenom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se na 320 nm mjeri intenzitet nastalog obojenja (Howard i sur., 2003).

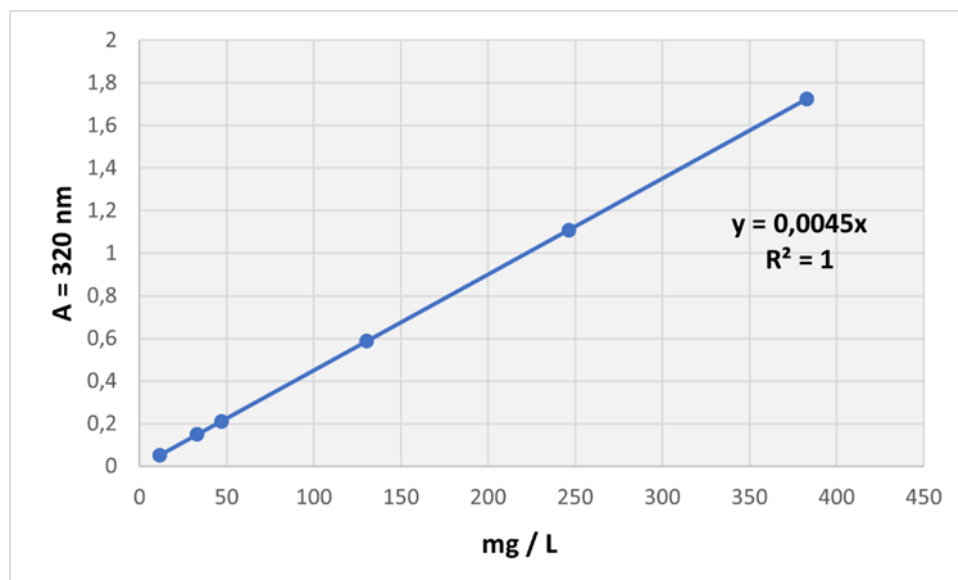
Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu se redom otpipetira 250 μL ekstrakta, 250 μL 1 g/L HCl u 96%-tnom etanolu i 4,55 mL 2 g/L HCl. Kako bi se odredile ukupne hidroksicimetne kiseline, mjeri se apsorbancija na 320 nm. Slijepa proba se priprema na isti način, no umjesto 250 μL ekstrakta uzima se isti volumen otapala za ekstrakciju.

Izrada baždarnog pravca:

Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu (slika 11).

Iz alikvotne otopine standarda (100 mg/L) potrebno je pripremiti sljedeća razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66,7 mg/L i to na način da se u odmjerne tikvice od 10 mL redom otpipetira: 1, 2,5, 5 i 6,67 mL otopine alikvota te nadopune do oznake 80%-tnim metanolom. Zatim se u staklenu epruvetu otpipetira redom 250 μ L otopine standarda, 250 μ L 1 g/L HCl u 96%-tnom etanolu i 4,55 2 g/L HCl te se izmjeri apsorbancija pri 320 nm.



Slika 11. Baždarni dijagram kafeinske kiseline za hidroksicimetne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0045 \times X \quad R^2 = 1 \quad (2)$$

gdje je :

y – apsorbancija pri 320 nm

X – koncentracija kafeinske kiseline (mg/L)

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Antioksidativni kapacitet ekstrakta može se odrediti u reakciji sa slobodnim radikalom DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Brand-Williams i sur., 1995). Metoda se temelji na redukciji stabilnog DPPH u prisustvu antioksidansa pri čemu dolazi do promjene ljubičaste boje u žutu, a apsorbancija se mjeri na 517 nm.

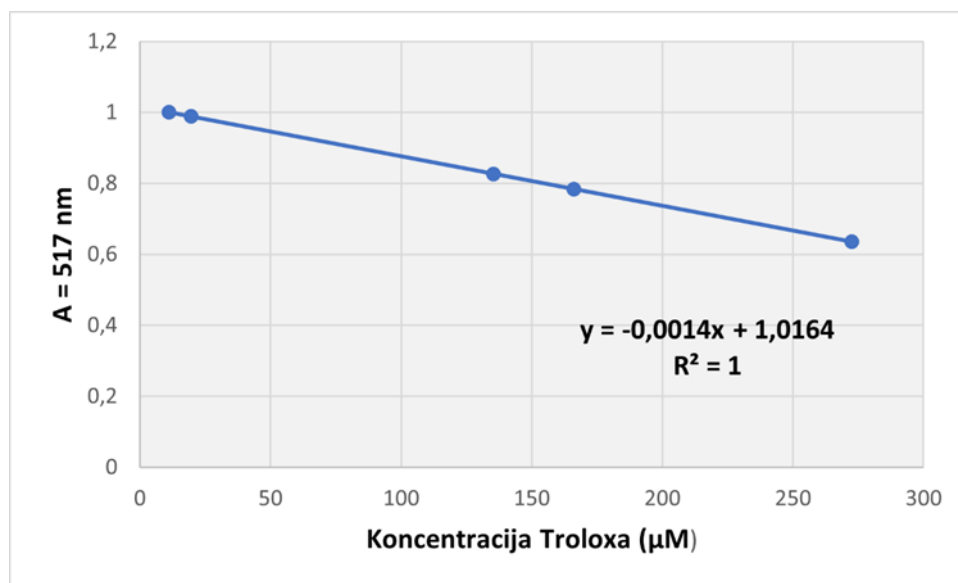
Postupak određivanja:

Prije početka određivanja antioksidacijskog kapaciteta potrebno je pripremiti 0,5 mM otopinu DPPH na način da se 0,02 grama DPPH otopi u metanolu u odmjerne tikvici od 100 ml, a zatim nadopuni metanolom do oznake.

U staklenu epruvetu se otpipetira 1 mL ekstrakta, 1 mL metanola, 0,5 mL 0,5 mM otopine DPPH te se ostave stajati 20 minuta pri sobnoj temperaturi u mraku. Nakon 20 minuta mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Slijepa proba se priprema na isti način, no osim 1 mL ekstrakta, dodaje se 1 mL metanola.

Izrada baždarnog pravca:

Baždarni pravac se izrađuje s razrijeđenim otopinama Troloxa poznate koncentracije: 0, 25, 50, 100, 200 i 300 μM i na temelju izmjerenih apsorbancija pri 517 nm se dobije jednadžba pravca (slika 12).



Slika 12. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri 517 nm o koncentraciji Troloxa

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi:

$$y = -0,0014 \times X + 1,0164 \quad R^2 = 1 \quad (3)$$

Gdje je:

y – apsorbancija uzorka pri 517 nm

X – ekvivalent Troloxa (μM)

3.2.6. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada podataka provedeni su programom Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Zavisne varijable bile su: maseni udjeli ukupnih fenola i hidrokscimetnih kiselina (mg/100 g suh. tvari) te AOA ($\mu\text{mol TE}/100\text{g suh. tvari}$) suhe tvari te je ispitivan utjecaj neovisnih varijabli: gnojdbeni tretman (organsko, mineralno i organsko-mineralno) i ekstrakcijskog otapala (voda, 50% etanol i 96% etanol). Kontinuirane varijable analizirane su pomoću multivarijantne analize varijance (MANOVA) dok je višestruko uspoređivanje provedeno Tukey HSD testom višestrukog uspoređivanja. Razina značajnosti za sve testove je bila $\alpha \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj različitih gnojidbenih tretmana (organsko, mineralno i organsko-mineralno gnojivo) kao i ekstrakcijskog otapala (H_2O , 50% etanol, 96% etanol) na udio ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijsku aktivnost u ekstraktima odmašćenih sjemenki komorača dobivenih ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom (UAE). Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji pri temperaturi od 50 °C i trajanju od 30 minuta. U svim ekstraktima antioksidacijski kapacitet je određen primjenom DPPH metode. U tablici 2. je prikazana ukupna suha tvar osušenih uzoraka, dok su maseni udjeli fenola i hidroksicimetnih kiselina te antioksidacijski kapacitet prikazani u tablicama 3-5.

4.1. UKUPNA SUHA TVAR

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda koja ne isparava pod definiranim uvjetima (Katalinić, 2006). Ovisno o sastavu proizvoda, za određivanje ukupne suhe tvari koriste se različite metode, a u ovom istraživanju je korištena metoda sušenja na 105 °C do konstantne mase (AOAC, 1984).

Tablica 2. Maseni udio suhe tvari određeni u uzorcima sjemenki komorača

UZORAK/TRETMAN	UDIO SUHE TVARI (%)
Kontrola	93,896%
Organsko	93,770%
Mineralno	93,974%
Organsko-mineralno	92,735%

Udio suhe tvari u uzorcima je bio od 92,735 % do 93,974 % (tablica 2). U istraživanju koje su proveli Moser i sur. (2014) određena je ukupna suha tvar u rasponu od 94,1 % do 95,0% što je u skladu sa rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

4.2. UKUPNI FENOLI I HIDROKSICIMETNE KISELINE

Maseni udjeli ukupnih fenola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina određeni u ekstraktima odmašćenih sjemenki komorača, ekstrahiranim različitim otapalima (H_2O , 50% etanol i 96% etanol) su prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Maseni udjeli ukupnih fenola i ukupnih hidroskicimetnih kiselina određeni u uzorcima sjemenki komorača izraženi kao prosječna vrijednost tri paralelna mjerenja \pm st. dev. (mg/100 g s.tv.)

Uzorak	Otapalo	Ukupni fenoli (mg/100 g s.tv.)	Ukupne hidroksicimetne kiseline (mg/100 g s.tv.)
Kontrola	H ₂ O	52,92 \pm 0,52	43,79 \pm 0,56
	50% etanol	48,90 \pm 0,65	75,89 \pm 0,60
	96% etanol	38,98 \pm 0,87	71,39 \pm 0,86
Organsko	H ₂ O	40,33 \pm 0,61	20,18 \pm 1,28
	50% etanol	36,94 \pm 0,33	37,49 \pm 1,22
	96% etanol	34,29 \pm 1,22	38,23 \pm 0,84
Mineralno	H ₂ O	58,74 \pm 0,81	41,33 \pm 0,74
	50% etanol	56,52 \pm 0,65	73,68 \pm 0,56
	96% etanol	49,64 \pm 1,07	51,76 \pm 0,55
Organsko-mineralno	H ₂ O	50,56 \pm 2,38	31,27 \pm 1,76
	50% etanol	58,01 \pm 1,42	81,16 \pm 1,85
	96% etanol	70,38 \pm 1,22	284,93 \pm 0,43

Maseni udio ukupnih fenola u sjemenkama komorača (*Foeniculum vulgare*) nakon provedene UAE određen je u rasponu od 34,29 \pm 1,22 mg GAE/100g do 70,38 \pm 1,22 mg GAE/100g.

U istraživanju koje su proveli Faudale i sur. (2008) određen je udio ukupnih fenola u rasponu od 34,9 \pm 2,6 mg GAE/100g do 111,0 \pm 4,0 mg GAE/100g što je gotovo jednako vrijednostima dobivenim u ovom istraživanju.

Rezultati su pokazali da najveći ekstrakcijski kapacitet za izolaciju ukupnih fenola ima ekstrakcijsko otapalo H₂O, a najmanji ekstrakcijski kapacitet ima ekstrakcijsko otapalo 96%-tni etanol što je u skladu sa zaključkom, koji su dobili Roby i sur. (2013) čiji su rezultati pokazali da su polarnija otapala efikasnija u ekstrakciji fenolnih spojeva.

Kod uzorka tretiranog organsko-mineralnim gnojivom je određen najveći udio ukupnih fenola, a kod uzorka tretiranog organskim gnojivom je zabilježen najniži udio ukupnih fenola. Wu i sur. (2013) su u svom istraživanju došli do zaključka da uz kombinaciju organskih i mineralnih gnojiva je povećana učinkovitost u istodobnom povećanju udjela ukupnih fenola, prinosa i antioksidacijske aktivnosti.

Za uzorke tretirane organskim i organsko-mineralnim gnojivom, 96%-tni etanol pokazao se kao najbolje ekstrakcijsko otapalo za ekstrakciju hidroksicimetnih kiselina, a u uzorku

tretiranim mineralnim gnojivom najveći ekstrakcijski kapacitet ima 50%-tni etanol. Iz rezultata se jasno vidi da se najmanji prinosi ukupnih hidroksicimetnih kiselina dobiju upotrebom H₂O kao ekstrakcijskog otapala, što je u skladu s rezultatima koje su dobili Yang i sur. (2017) u svojem istraživanju.

Maseni udio ukupnih hidroksicimetnih kiselina određen je u rasponu od 20,18 ± 1,28 mg/100 g s.t.v do 284,93 ± 0,43 mg/100 g s.t.v s time da je najveći prinos ukupnih hidroksicimetnih kiselina zabilježen kod uzorka tretiranog organsko-mineralnim gnojivom, a najmanji kod uzorka tretiranog organskim gnojivom. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturnim podacima (Wu, 2013).

4.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET – DPPH METODA

Rezultati antioksidacijskog kapaciteta određeni primjenom DPPH metode u ekstraktima odmašćenih sjemenki komorača prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom ekstrakata sjemenki komorača izraženi u μmol TE/100g s.tv. ± st. dev.

Uzorak	Otapalo	DPPH (μM TE/100 g suh. tvari)
Kontrola	H ₂ O	340,16 ± 0,66
	50% etanol	211,14 ± 1,53
	96% etanol	468,78 ± 1,04
Organsko	H ₂ O	387,20 ± 1,24
	50% etanol	194,46 ± 0,77
	96% etanol	446,30 ± 2,22
Mineralno	H ₂ O	377,66 ± 0,56
	50% etanol	431,49 ± 1,47
	96% etanol	473,32 ± 0,38
Organsko-mineralno	H ₂ O	365,21 ± 1,67
	50% etanol	410,26 ± 0,71
	96% etanol	477,41 ± 0,81

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom, pokazao se 96%-tni etanol kao najbolje ekstrakcijsko otapalo za sva 3 uzorka. Kod uzorka tretiranim organskim gnojivom, najmanji ekstrakcijski kapacitet ima ekstrakcijsko otapalo 50%-tni etanol, a kod uzoraka koji su tretirani mineralnim i organsko-mineralnim gnojivom najmanji ekstrakcijski kapacitet ima H₂O. Ngo i sur. (2017) su u svom istraživanju ispitivali utjecaj primjene različitih ekstrakcijskih otapala na antioksidacijsku aktivnost. Korišteno je 6 ekstrakcijskih otapala: aceton, 50% aceton, 50% etanol, 50% metanol, metanol i H₂O. Voda i aceton su imali najmanje ekstrakcijske kapacitete, dok 50% aceton i etanol najveće, što potvrđuje naše rezultate.

Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta u dobivenim ekstraktima su u rasponu od $194,46 \pm 0,77 \mu\text{M TE}/100 \text{ g s.tv.}$ do $477,41 \pm 0,81 \mu\text{M TE}/100 \text{ g s.tv.}$ što se poklapa sa istraživanjem Faudale i sur. (2008) gdje je antioksidacijski kapacitet u rasponu od $122,7 \pm 11,2 \mu\text{g/mL}$ do $228,7 \pm 10,4 \mu\text{g/mL}$. Najveći antioksidacijski kapacitet ima uzorak tretiran organsko-mineralnim gnojivom, a najmanji tretiran organskim gnojivom što se poklapa sa istraživanjem koje su proveli Wu i sur. (2013).

4.4. STATISTIČKA ANALIZA – UTJECAJ TRETMANA I EKSTRAKCIJSKOG OTAPALA

Statistička analiza utjecaja tretmana i ekstrakcijskih otapala na masene udjele ukupnih fenola i hidroksicimetnih kiselina (UHCK) te na antioksidacijski kapacitet (AOA) prikazan je u tablici 5.

Tablica 5. Utjecaj tretmana i ekstrakcijskog otapala na masene udjele ukupnih fenola (UF), hidroksicimetnih kiselina (UHCK) i antioksidacijsku aktivnost (AOA)

	N	UF	UHCK	AOA
TRETMAN		$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$
Kontrola	9	46,93±0,37 ^b	63,69±0,35 ^c	340,03±0,40 ^a
Organsko	9	37,19±0,37 ^a	31,97±0,35 ^a	342,65±0,40 ^b
Mineralno	9	54,97±0,37 ^c	55,59±0,35 ^b	427,49±0,40 ^d
Organsko-mineralno	9	59,65±0,37 ^d	132,45±0,35 ^d	417,63±0,40 ^c
OTAPALO		$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$
H ₂ O	12	50,64±0,32 ^b	34,14±0,30 ^a	367,56±0,35 ^b
50% EtOH	12	50,09±0,32 ^b	67,06±0,30 ^b	311,84±0,35 ^a
96% EtOH	12	48,32±0,32 ^a	111,58±0,30 ^c	466,45±0,35 ^c
TRETMAN, OTAPALO		$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$
Kontrola, H ₂ O	3	52,92±0,64 ^e	43,79±0,60 ^d	340,16±0,70 ^c
Kontrola, 50% EtOH	3	48,90±0,64 ^d	75,89±0,60 ^g	211,14±0,70 ^b
Kontrola, 96% EtOH	3	38,98±0,64 ^{b,c}	71,39±0,60 ^f	468,78±0,70 ^j
Organsko; H ₂ O	3	40,33±0,64 ^c	20,18±0,60 ^a	387,20±0,70 ^f
Organsko, 50% EtOH	3	36,94±0,64 ^{a,b}	37,49±0,60 ^c	194,46±0,70 ^a
Organsko, 96% EtOH	3	34,29±0,64 ^a	38,23±0,60 ^c	446,30±0,70 ⁱ
Mineralno; H ₂ O	3	58,74±0,64 ^f	41,33±0,60 ^d	377,66±0,70 ^e
Mineralno, 50% EtOH	3	56,52±0,64 ^f	73,68±0,60 ^{f,g}	431,49±0,70 ^h
Mineralno, 96% EtOH	3	49,64±0,64 ^d	51,76±0,60 ^e	473,32±0,70 ^k
Organsko-mineralno, H ₂ O	3	50,56±0,64 ^{d,e}	31,27±0,60 ^b	365,21±0,70 ^d
Organsko-mineralno, 50% EtOH	3	58,01±0,64 ^f	81,16±0,60 ^h	410,26±0,70 ^g
Organsko-mineralno, 96% EtOH	3	70,38±0,64 ^g	284,93±0,60 ⁱ	477,41±0,70 ^l
PROSJEČNA VRIJEDNOST	36	19,68±10,35	70,92±68,20	381,95±92,03

Bilješka. Vrijednosti s različitim slovom su statistički značajne kod $p \leq 0,05$.

*Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška.

† Statistički značajni parametar kod $p \leq 0,05$.

Najveći prinos ukupnih fenola ($59,65 \pm 0,37$ mg/100g s.tv) i hidrokscimetnih kiselina ($132,45 \pm 0,35$ mg/100g s.tv.) ima uzorak tretiran organsko-mineralnim gnojivom, a najmanji tretiran organskim gnojivom gdje maseni udio ukupnih fenola iznosi $37,19 \pm 0,37$ mg/100g s.tv, a maseni udio ukupnih hidrokscimetnih kiselina iznosi $31,97 \pm 0,35$ mg/100g s.tv. Rezultati dobiveni statističkom obradom su u skladu s istraživanjem koje su proveli Wu i sur. (2013) u kojem su došli do zaključka da kombinacijom organskih i mineralnih gnojiva dolazi do povećanja udjela ukupnih fenola.

Rezultati utjecaja gnojidbenih tretmana na antioksidacijski kapacitet su pokazali da uzorci tretirani mineralnim gnojivom ($427,49 \pm 0,40$ μ M TE/100g s.tv.) imaju najveći AOA, a najmanji ima kontrola ($340,03 \pm 0,40$ μ M TE/100 g s.tv.).

Statističkom analizom utjecaja ekstrakcijskog otapala na masene udjele ukupnih fenolnih spojeva i hidrokscimetnih kiselina te na antioksidacijski kapacitet je dobiveno da je upotreba H₂O kao ekstrakcijskog otapala najbolji izbor za ekstrakciju ukupnih fenola ($50,64 \pm 0,32$ mg/100g s.tv), što potvrđuje i istraživanje Roby i sur. (2013) koji su zaključili da su polarnija otapala efikasnija u ekstrakciji fenolnih spojeva. No za ekstrakciju UHCK i AOA je najbolji izbor 96 %-tni etanol, što su i ustvrdili Ngo i sur. (2017), čijom upotrebom je ekstrahirano $111,58 \pm 0,30$ mg/100g s.tv. hidrokscimetnih kiselina, a antioksidacijski kapacitet iznosi $466,45 \pm 0,35$ μ M TE/100g s.tv.

Kombinirani utjecaj gnojidbenih tretmana i ekstrakcijskog otapala je pokazao da najveći prinos ukupnih fenola ($70,38 \pm 0,64$ mg/100g s.tv.) i hidrokscimetnih kiselina ($284,93 \pm 0,60$ mg/100g s.tv.) te antioksidacijskog kapaciteta ($477,41 \pm 0,70$ μ M TE/100g s.tv.) je dobiven kod uzorka koji je tretiran organsko-mineralnim gnojivo, a ekstrakcija je provedena u 96%-tnom etanolu što je u skladu s literaturnim podacima (Ngo i sur. (2017) i Wu i sur. (2013)). Kombinacijom uzorka tretiranog organskim gnojivom i 96%-tnim etanolom je dobiven najmanji prinos UF ($34,29 \pm 0,64$ mg/100g s.tv), dok je kombinacijom uzorka tretiranog organskim gnojivom i H₂O dobiven najmanji prinos UHCK ($20,18 \pm 0,60$ mg/100g s.tv.). Najmanja AOA ($194,46 \pm 0,70$ μ M TE/100g s.tv.) je dobivena kombinacijom uzorka tretiranog organskim gnojivom i 50%-tnog etanola.

5. ZAKLJUČAK

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

1. Najveći ekstrakcijski kapacitet za ekstrakciju ukupnih fenola ima voda, a najmanji ekstrakcijski kapacitet ima ekstrakcijsko otapalo 96%-tni etanol.
Za ekstrakciju hidroksicimetnih kiselina, u uzorcima koji su tretirani organskim i organsko-mineralnim gnojivom, 96%-tni etanol se pokazao se kao najbolje ekstrakcijsko otapalo dok u uzorku tretiranom mineralnim gnojivom najveći ekstrakcijski kapacitet ima 50%-tni etanol. U sva 3 uzorka najmanji ekstrakcijski kapacitet hidroksicimetnih kiselina ima voda.
2. Najveći maseni udio ukupnih fenola i ukupnih hidroksicimetnih kiselina određen je u uzorcima tretiranim organsko-mineralnim gnojivom, a najmanji u uzorcima koji su tretirani organskim gnojivom.
3. Najveći antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom je određen u ekstraktima koji su ekstrahirani 96%-tnim etanolom.
4. Najveći antioksidacijski kapacitet određen DPPH metodom ima uzorak tretiran organsko-mineralnim gnojivom, a najmanji tretiran organskim gnojivom.
5. Statistička analiza pokazala je da su svi ispitani parametri ekstrakcije imali statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$) na masene udjele ispitivanih spojeva (ukupni fenolni spojevi, ukupne hidroksicimetne kiseline) i antioksidacijski kapacitet.

6. LITERATURA

1. Abdullah, Y., Schneider, B., Petersen, M. (2008) Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species. *Phytochem. Lett.* 1, str.199-203. doi:10.1016/j.phytol.2008.09.01
2. Anka, Z. M., Gimba, S. N., Nanda, A., Salisu, L. (2020) Phytochemistry and Pharmacological Activities of *Foeniculum Vulgare*. *IOSR J. Pharm.* 10, str. 1-10
3. AOAC (1984) Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 14. izd., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC
4. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), str. 426–436, doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
5. Badarinath AV, Mallikarjuna RA, Sudhana Chetty CM, Ramkanth S, Rajan TVS, Gnanaprakash K. (2010) A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlatinos and considerations. *Int J PharmTech Res.*, 2, str.1276-1285.
6. Badgujar, S.B., Patel, P.P., Bandivdekar, A.H. (2014) *Foeniculum vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology, *BioMed Research International*, doi:10.1155/2014/842674
7. Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, C. Berset (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), str. 25-30, doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
8. Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutrition Rewievs*, 56, str. 317 – 333
9. Bergmann W. (1992) *Nutritional disorders of plants*, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, New York.
10. Casanovas, E. M., Fasciglione, G., Barassi, C. A. (2015) *Azospirillum* spp. and related PGPRs inocula use in intensive agriculture. U: *Handbook for Azospirillum*, (Cassan i sur., ured.), Springer International Publishing Switzerland, str. 447-467.
11. Chemat, F., Tomao, V., Viot, M. (2008), Ultrasound assisted extraction in food analysis. In: *Handbook of food analysis instruments*, Boca Raton, Florida, USA, Semih Ötleş, str. 85- 103
12. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products,

- Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications: A review, *Ultrasonics sonochemistry*, 34, str. 540–560, doi:10.1016/j.ultsonch.2016.06.035
13. Dai, J., Mumper, R.J., (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules*, 15(10), str.7313–7352, doi:10.3390/molecules15107313
 14. Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian journal of food science and technology*, 2(2), str. 22-33
 15. Faudale, M., Viladomat, F., Bastida, J., Poli, F., Codina, C. (2008) Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Wild, Edible, and Medicinal Fennel from Different Mediterranean Countries. *J. Agric. Food Chem.* 56(6), str. 1912-1920, doi:10.1021/jf073083c
 16. Galić, L. (2020) Fenolni spojevi u biljkama, diplomski rad, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Osijek
 17. Gnojdba, Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje, Leksikografski zavod Miroslav Krleža,2021, Pristupljeno 26.07.2021.
<<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=22429>>.
 18. Greblo, K. (2009) Antioksidativno i antimikrobno djelovanje eteričnog ulja i ekstrakata lavande, završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
 19. Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (2019) Extraction Techniques of Phenolic Compounds and Other Bioactive Compounds From Medicinal and Aromatic Plants, *Engineering Tools in the Beverage Industry*, Woodhead Publishing, str. 283-314, doi:10.1016/B978-0-12-815258-4.00010-X
 20. Gutteridge, J.M.C. (1994) Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection, *Chemico-Biological Interactions*, 91, (2–3), str. 133-140, doi:10.1016/0009-2797(94)90033-7
 21. Hegi, G. (1926) *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, 5(3), str. 1912-1917
 22. 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), str. 1238-1247
 23. Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), str. 1841–1856. doi:10.1021/jf030723c
 24. Jakobović, F., (2019) Promjene sastava i sadržaja fenolnih spojeva u listovima crnih sorata vinove loze tijekom pojedinih fenofaza, diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb

25. Jangdey, M. S., Gupta, A., Sarwa, K. (2018) Apigenin and Quercetin: Potential Therapeutic Challenging Effective Against in Alzheimer's Disease. UK. J. Pharm. Biosci. 6, str. 46-5, doi:10.20510/ukjpb/6/i1/173531
26. Jolić, N. (2017) Antioksidacijska aktivnost fenola: interakcija derivata hidroksibenzojeve kiseline : završni rad, Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet
27. Kabera J.N., Semana E., Mussa A.R., He X. (2014) Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties, Journal of Pharmacy and Pharmacology 2, str. 377-392.
28. Kalleli, F., Rebey, I. B., Wannas, W. A., Boughalleb, F., Hammami, M., Tounsi, M. S., M'hamdi, M. (2019) Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and methanol extract from Tunisian and French fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds, J. Food Biochem., 43, str. 1-14, doi: 10.1111/jfbc.12935
29. Kchaou, W., Abbès, F., Blecker, C., Attia, H., & Besbes, S. (2013). Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.). Industrial Crops and Products, 45, 262–269. doi:10.1016/j.indcrop.2012.12.028
30. Kooti, W., Moradi, M., Ali-Akbari, S., Sharafi-Ahvazi, N., Asadi-Samani, M., Ashtary-Larky, D. (2015) Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: A review. J. HerbMed. Pharmacol. 4, str. 1-9.
31. Katalinić, V. (2006). Kemija mediteranskog voća i tehnologija prerade. Kemijsko-tehnološki fakultet, Split
32. Köhler, F.E., Brandt, W., Gürke, M., Pabst, G., Schellenberg, G., Vogtherr, M. (1887) Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte : Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America, doi:10.24355/dbbs.084-200510210200-551
33. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy reviews, 4(8), str.118–126, doi:10.4103/0973-7847.70902
34. Lončarić Z., Teklić T., Bertić B., Jug D., Vidović I. (1999) Koncentracija hraniva u kupusnjačama i njihovo iznošenje, Poljoprivreda 5(2), str. 47-51
35. Lovrić, S. (2014) Fiziološka i ekološka značajnost fenolnih spojeva u biljci, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Osijek

36. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990) *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA
37. Manousi, N., Sarakatsianos, I., Samanidou, V (2019) Extraction Techniques of Phenolic Compounds and Other Bioactive Compounds From Medicinal and Aromatic Plants. *Engineering Tools in the Beverage Industry*, str.283–314, doi:10.1016/b978-0-12-815258-4.00010-x
38. Maričić, B., Radman, S., Romić, M., Perković, J., Major, N., Urlić, B., Palčić, I., Ban, D.; Zorić, Z., Ban, S.G. (2021) Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.) as an Aqueous Plant-Based Extract Fertilizer in Green Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Sustainable Agriculture, Sustainability*, 13, 4042, <https://doi.org/10.3390/su13074042>
39. Mason, T. (1996) The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), str. 253–260, doi:10.1016/s1350-4177(96)00034-x
40. Mason, T.J., Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L. (2001) Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, doi:10.1016/S1350-4177(00)00033-X
41. Mishra, K., Ojha H., Chaudhury, N.K. (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results, *Food Chemistry*, 130(4), str. 1036-1043, doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.127
42. Moser, B. R., Zheljaskov, V. D., Bakota, E. L., Evangelista, R. L., Gawde, A., Cantrell, C. L., ... Jeliaskova, E. (2014) Method for obtaining three products with different properties from fennel (*Foeniculum vulgare*) seed, *Industrial Crops and Products*, 60, str. 335–342, doi:10.1016/j.indcrop.2014.06.017
43. Ngo, T. V., Scarlett, C. J., Bowyer, M. C., Ngo, P. D., & Vuong, Q. V. (2017). Impact of Different Extraction Solvents on Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity from the Root of *Salacia chinensis* L. *Journal of Food Quality*, str. 1–8, doi:10.1155/2017/9305047
44. Niki E. (2010) Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo, *Free radical biology & medicine*, 49(4), str. 503–515, doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016
45. Niki, E., (2011) Antioxidant Capacity: Which Capacity and How to Assess It?, str. 169 – 176
46. Pevalek-Kozlina, B., (2003) *Fiziologija bilja*, Profil International, Zagreb
47. Pignatti, S. (1982) *Flora d'Italia*, 2, (Bologna: Edagricole)
48. Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food*

Chem, 53, str. 4290-4302

49. Radman, S., (2015) Utjecaj gnojidbe dušikom i načina uzgoja na kemijski sastav dvodomne koprive (*Urtica dioica* L.), Doktorski rad, Agronomski fakultet, Zagreb
50. Rao, A.L., Bharani M., Pallavi V., (2006) Role of antioxidants and free radicals in health and disease, *Adv Pharmacol Toxicol*, 7, str. 29-38
51. Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A., Qurishi, M. A. (2016) *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arab. J. Chem.* 9, str. 1574-1583, doi:10.1016/j.arabjc.2012.04.011
52. Repajić, M., Tonković, P., Kruk, V., Zorić, Z., Elez Garofulić, I., Palčić, I., Dragović-Uzelac, V. (2020), Bioactive compounds and antioxidant capacity in fennel seeds influenced by pressurized liquid extraction, *Proceedings of the Nutrition Society*, doi:10.1017/S0029665120004966
53. Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 66(4), str. 401–436, doi:10.1016/s0308-8146(99)00093-x
54. Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A.-H., Khalel, K. I., (2012) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), *Ind Crop Prod.*, 44, str. 437-445. doi:10.1016/j.indcrop.2012.10.01
55. Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45(4), str. 287-306.
56. Sharma R. (2014) Polyphenols in Health and Disease. *Polyphenols in Human Health and Disease*, str. 757–778.
57. Shirahigue L. D., Ceccato-Antonini S.R. (2020) Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries, *Food technology* 50(4)
58. 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). str. 828–834
59. Šilješ I., Grozdanić Đ., Grgesina I. (1992) Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja, Školska knjiga, Zagreb
60. Šimunić I., Ćipoljar A., Peremin Volf T. (2007) Vježbe iz tloznanstva i popravka tla, Interna skripta, Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Križevci
61. Štolar, I. (2017) Određivanje udjela ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti u bezglutenskom kiselom tijestu i kruhu s dodatkom brašna žutog graška,

diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

62. Šugar, I. (2005) Koromač, komorač ili morač?, *Jezik*, 52(3), str. 81-92.
63. Tomaz, I., (2016) Optimiranje priprave uzoraka za analizu polifenolnih spojeva u kožici grožđa tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, *Doktorski rad*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
64. Tsao, R., (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients*, 2(12), str.1231–1246, doi:10.3390/nu2121231
65. Tungmunnithum D., Thongboonyou A., Pholboon A., Yangsabai A. (2018) Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*, 5(3), str. 93
66. Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C.J. (2016) Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol* 90, str. 1–37 doi:10.1007/s00204-015-1579-5
67. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-biological Interactions*, 160(1), str. 1-40, doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
68. Vilku K., Mawson R., Simons L., Bates D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry: A review, *Innovat. Food. Sci. Emerg. Tech.* 9(2), str. 161–169, 10.1016/j.ifset.2007.04.014
69. Wu, C.-S., Gao, Q.-H., Kjelgren, R., Guo, X.-D., & Wang, M. (2013). Yields, Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of *Ziziphus jujube* Mill. in Response to Different Fertilization Treatments. *Molecules*, 18(10), 12029–12040. doi:10.3390/molecules181012029
70. Yang, J., Ou, X., Zhang, X., Zhou, Z., & Ma, L. (2017) Effect of Different Solvents on the Measurement of Phenolics and the Antioxidant Activity of Mulberry with Accelerated Solvent Extraction. *Journal of Food Science*, 82(3), str. 605–612, doi:10.1111/1750-3841.13638
71. Young, I. S., Woodside, J. V. (2001) Antioxidants in health and disease, *Journal of clinical pathology*, 54(3), str. 176–186, doi:10.1136/jcp.54.3.176
72. Young, I.S. (2001) Measurement of total antioxidant capacity *Journal of Clinical Pathology*, 54, str. 339, doi:10.1136/jcp.54.5.339