

Optimiranje procesa vodene destilacije za izolaciju eteričnog ulja sjemenki komorača

Tonković, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:029246>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-06**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Petra Tonković

1445/N

**OPTIMIRANJE PROCESA
VODENE DESTILACIJE ZA
IZOLACIJU ETERIČNOG ULJA
SJEMENKI KOMORAČA**

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



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

ZAHVALA

Želim se zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Maji Repajić na stručnom vodstvu, strpljenju, dostupnosti, podršci, povjerenju i ukazanim prilikama zbog kojih sam postigla sve ono što mi je na početku studiranja bilo nezamislivo. Također se zahvaljujem mag. ing. Eni Cegledi na pomoći i savjetima prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem svim svojim kolegama i prijateljima na brojnim lijepim uspomenama i podršci tijekom studiranja.

Na kraju, veliko hvala mom zaručniku Lovri, mojoj braći i cijeloj mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi, potpori i vjeri u mene.

Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima, Anti i Aleni, bez čije ljubavi i podrške u životu sve ovo ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

OPTIMIRANJE PROCESA VODENE DESTILACIJE ZA IZOLACIJU ETERIČNOG ULJA SJEMENKI KOMORAČA

Petra Tonković. 1445/N

Sažetak: U ovom radu optimiran je proces vodene destilacije za izolaciju eteričnog ulja iz sjemenki komorača. Varirani su omjer biljnog materijala i vode (1:10 do 1:30) te vrijeme destilacije (40 do 120 min) pri čemu je prema centralno-kompozitnom dizajnu s 5 centralnih točaka dobiveno 13 uzoraka eteričnog ulja kojima je određen prinos te je ispitan sastav primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS). Prinos eteričnog ulja kretao se u rasponu od 4,40 do 5,50 %. Identificirano je ukupno 18 hlapljivih spojeva iz skupine monoterpena (prosječna vrijednost 9,92 %), oksidiranih monoterpena (prosječna vrijednost 18,51 %), fenilpropanoide (prosječna vrijednost 71,09 %) i aromatskih aldehida (prosječna vrijednost 0,48 %). Najzastupljeniji spoj bio je trans-anetol (prosječna vrijednost 586,40 mg mL⁻¹). Statistička analiza pokazala je da su ispitivani parametri destilacije imali statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$) na prinos i sastav eteričnog ulja. Veći prinos ulja postignut je primjenom duljeg vremena destilacije. Povećanje vremena destilacije utjecalo je na porast udjela trans-anetola pri nižim omjerima biljnog materijala i vode, dok je pri višim omjerima taj udio padao. Provedenim optimiranjem definirani su sljedeći optimalni parametri za dobivanje maksimalnog prinosa eteričnog ulja sjemenki komorača postupkom vodene destilacije: omjer biljnog materijala i vode 1:10 te vrijeme vodene destilacije 120 min.

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

Rad sadrži: 48 stranica, 10 slika, 6 tablica, 80 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc.dr.sc. Maja Repajić

Pomoć pri izradi: Ena Cegledi, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 27. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

OPTIMIZATION OF HYDRODISTILLATION PROCESS FOR THE ISOLATION OF FENNEL SEEDS ESSENTIAL OIL

Petra Tonković, 1445/N

Abstract: *In this study, the process of hydrodistillation for the isolation of fennel seeds essential oil was optimized. The ratio of plant material and water (1:10 to 1:30) and distillation time (40 to 120 min) were varied, where according to the central-composite design with 5 central points 13 samples of essential oil were obtained in which the yield and composition by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) were determined. The essential oil yield was determined in the range of 4.40 to 5.50 %. A total of 18 volatile compounds from the group of monoterpenes (average value 9.92%), oxygenated monoterpenes (average value 18.51%), phenylpropanoids (average value 71.09%) and aromatic aldehydes (average value 0.48%) were identified. The most abundant compound was trans-anethole (average value 586.40 mg mL⁻¹). Statistical analysis showed that the examined parameters had a statistically significant effect ($p \leq 0.05$) on the yield and composition of essential oil. Higher oil yield was achieved by applying a longer distillation time. Increase of distillation time affected the increase in the content of trans-anethole at lower ratios of plant material and water, while at higher ratios it decreased. The optimization defined the following optimal parameters for obtaining the maximum yield of fennel seed essential oil by hydrodistillation: the ratio of plant material and water 1:10 and the distillation time 120 min.*

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

Thesis contains: 48 pages, 10 figures, 6 tables, 80 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Maja Repajić, Assistant professor*

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

Reviewers:

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

Thesis defended: September 27th 2021

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KOMORAČ.....	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV SJEMENKI KOMORAČA	3
2.3 ETERIČNO ULJE.....	4
2.4. KEMIJSKI SASTAV ETERIČNIH ULJA	5
2.4.1. Terpeni	6
2.4.2. Fenilpropanoidi	7
2.4.3. Ostali spojevi	7
2.5. ETERIČNO ULJE SJEMENKI KOMORAČA	7
2.5.1. Svojstva eteričnog ulja sjemenki komorača	9
2.6. IZOLACIJA ETERIČNIH ULJA.....	10
2.6.1 Vodena destilacija	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJAL	13
3.2. METODE	14
3.2.1. Određivanje raspodjele veličine čestica	14
3.2.2. Vodena destilacija	14
3.2.3. Određivanje prinosa eteričnog ulja.....	16
3.2.4. Analiza hlapljivih spojeva.....	17
3.2.5. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. VELIČINA ČESTICA	21
4.2. PRINOS ETERIČNOG ULJA	22
4.3. SASTAV ETERIČNOG ULJA.....	23
4.4. UTJECAJ PARAMETARA VODENE DESTILACIJE NA PRINOS ETERIČNOG ULJA	32
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	39

1. UVOD

Komorač je aromatična mediteranska biljka koja pripada obitelji *Apiaceae*. Sastoji se od modrozelenih stabljika sa žutonarančastim cvatovima i raste u podnebljima s toplim ljetima i hladnim zimama. Najpoznatiji varijeteti ove biljke su divlji ili gorki, slatki ili rimski komorač te firentinski komorač. Upotreba komorača u kulinarstvu i narodnoj medicini datira iz vremena starih Rimljana, Grka i Egipćana. Danas je ta upotreba proširena na farmaceutsku, kozmetičku i prehrambenu industriju. Također, proizvodi od komorača upotrebljavaju se za liječenje brojnih zdravstvenih stanja kao što su probavne smetnje kod dojenčadi, nesаница, konjuktivitis, artritis, bolesti bubrega i jetre te sindrom iritabilnog crijeva. Navedena djelovanja rezultat su antimikrobnog, antioksidativnog, protuupalnog, hepatoprotektivnog, antikancerogenog i antialergijskog djelovanja svih dijelova biljke, ali posebice sjemenki komorača koje su karakteristične po tome što, u odnosu na ostatak biljke, sadrže najveći udio eteričnog ulja.

Eterična ulja su smjese hlapljivih spojeva koje različiti dijelovi biljke stvaraju primarno zbog obrambenih svojstava. Međutim, eterična ulja karakterizira niz bioloških djelovanja zbog čega se upotrebljavaju u proizvodnji parfema, kozmetike, pića, higijenskih potrepština i prehrambenih proizvoda. U novije vrijeme, prepoznata je i njihova ljekovita uloga pa se upotrebljavaju u farmaceutskoj industriji. Dobivaju se raznim konvencionalnim i modernim postupcima izolacije, no najčešća metoda je vodena destilacija.

Eterično ulje sjemenki komorača sadrži hlapljive spojeve kao što su anetol, estragol, fenhon, limonen, mircen, α -pinen i γ -terpinen. Međutim, na prinos eteričnog ulja, kao i na njegov kemijski sastav, utječu brojni faktori poput klimatskih, geografskih, okolišnih i sezonskih uvjeta te stupnja zrelosti sjemenke, veličine čestica, odabira metode i vremena destilacije.

Cilj ovog istraživanja bio je optimirati parametre vodene destilacije, odnosno omjer biljnog materijala i vode te vrijeme destilacije u svrhu dobivanja maksimalnog prinosa eteričnog ulja sjemenke komorača. U tu svrhu proizvedeno je 13 uzoraka eteričnog ulja, određen je prinos (%) te je sastav eteričnog ulja analiziran primjenom plinske kromatografije uz masenu spektrometriju (GC-MS).

Upotreba komorača kao začinske i ljekovite biljke poznata je još od vremena starih Grka i Rimljana, a spominje se i u egipatskim papirusima. Danas se koristi u francuskoj i talijanskoj kuhinji, ali i u drugim dijelovima svijeta poput Afrike, Azije i Amerike gdje se rasprostranio kao divlja i samonikla biljka. Listovi i korijen se koriste u pripremi salata, umaka i variva, dok se plodovi koriste kao dodaci pekarskim proizvodima te jelima od mesa, ribe i morskih plodova. Od napitaka se najviše ističu rakija od listova te čaj od plodova i listova komorača. Čaj se najčešće upotrebljava za ublažavanje simptoma probavnih bolesti, posebice kod novorođenčadi (Pepeljnjak i Kozarić, 2019). Također se koristi i za liječenje artritisa, bolesti bubrega i jetre, nesаницe, konjuktivitisa i groznice. Komorač je dio farmaceutske industrije jer se nalazi u mnogim biljnim pripravcima za liječenje bolesti i tegoba, a razlog primjene je njegovo protuupalno, antioksidativno, antimikrobno, hepatoprotektivno i antialergijsko djelovanje (Badgular i sur., 2014).

2.2. KEMIJSKI SASTAV SJEMENKI KOMORAČA

Prema USDA (2019) podacima o kemijskom sastavu hrane, 100 g sjemenki komorača sadrži 8,81 g vode, 15,8 g proteina, 14,9 g masti i 52,3 g ugljikohidrata. Najzastupljeniji minerali su kalij (1690 mg 100 g⁻¹), kalcij (1200 mg 100 g⁻¹), fosfor (487 mg 100 g⁻¹), magnezij (385 mg 100 g⁻¹) i natrij (88 mg 100 g⁻¹), a prisutni su i željezo, mangan, cink i bakar. Sjemenke komorača sadrže i vitamine topljive u vodi poput vitamina C (21 mg 100 g⁻¹), niacina (6,05 mg 100 g⁻¹), tiamina (0,408 mg 100 g⁻¹) i riboflavina (0,353 mg 100 g⁻¹). Bukhari i sur. (2014) određivali su kemijski sastav sjemenki komorača. Prema njihovom istraživanju, udio vode u sjemenkama komorača je 6,24 ± 0.24 %, udio proteina 9.38±0.39 %, a udio masti 9.76 ± 0.34 %, što su niže vrijednosti od vrijednosti USDA podataka. Također su naveli i niže vrijednosti kalija (852.45 ± 33.25 mg 100 g⁻¹), kalcija (580.6 ± 24.39 mg 100 g⁻¹) i natrija (16.21 ± 0.65 mg 100 g⁻¹). U rezultatima istraživanja Faten i sur. (2011) navedeno je da je udio ugljikohidrata u sjemenkama komorača 56,35 %, udio proteina 23,19 %, udio masti 9,96 % i udio vode 7,27 %. U rezultatima istraživanja navode i da sjemenke komorača sadrže fenolne spojeve čiji je udio 7,55 mg GAE g⁻¹.

Sjemenke komorača karakteristične su po tome što, u odnosu na ostatak biljke, sadrže najveći udio eteričnog ulja čija vrijednost može biti i do 6 % (Pepeljnjak i Kozarić, 2019). Nadalje, prema El-Awadi i Hassan (2010) sjemenke komorača sadrže 0,79 % eteričnog te 5,82 % nehlapljivog ulja. Balbino i sur. (2021) određivali su kemijski sastav nehlapljivog ulja sjemenki komorača i dobili prinos ulja od 7,89 ± 0,03 %. Što se tiče lipidnih sastavnica, udio

mononezasićenih masnih kiselina je $9,91 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ sjemenki, dok je udio polinezasićenih masnih kiselina $1,69 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ sjemenki (USDA, 2019). Prosječni udio sterola u dobivenom ulju iznosio je $492,4 \pm 22,0 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Nezasićene masne kiseline činile su $69,81 \pm 1,75 \%$ ukupnih masnih kiselina u ulju sjemenki komorača, dok je udio zasićenih bio $30,19 \pm 1,75 \%$. Također su kvantificirali pigmente klorofil *a*, klorofil *b* i ukupne karotenoide čiji su udjeli u ulju iznosili $23,60 \pm 0,10$, $8,83 \pm 0,09$ i $12,3 \pm 0,02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Sjemenke komorača sadrže i različite biološke oblike vitamina E. Najzastupljeniji je γ -tokotrienol ($8,2 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), a potom slijede α -tokotrienol ($1,4 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) te γ -tokoferol ($0,5 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) (Matthäus i Özcan, 2015).

2.3 ETERIČNO ULJE

Eterično ulje je aromatična smjesa različitih hlapljivih spojeva i spada u prirodne biljne produkte. Karakteriziraju ga bezbojnost, uljasta konzistencija, topljivost u lipofilnim otapalima te promjena boje u prisustvu svjetla ili visoke temperature. Eterično ulje, čiji udio u biljci može biti i 20 %, proizvode porodice iz odjeljka sjemenjača od kojih su najznačajnije *Apiaceae*, *Brassicaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Pinaceae*, *Piperaceae*, *Rutaceae* i *Zingiberaceae* (Kalođera i sur., 1998). Pohrana eteričnog ulja ovisi o vrsti i porodici kojoj biljka pripada pa se tako eterično ulje može nalaziti u specijaliziranim stanicama ili uljenicama, intercelularnim prostorima ili kanalima te u žlijezdama između kutikule i stanične membrane. Navedena spremišta eteričnog ulja su morfološki diferencirana i mogu biti smještena u plodovima, kori, listovima, cvjetovima, podancima ili korijenju (Pepeljnjak i Kozarić, 2019). Miris eteričnog ulja ima biološku ulogu u obrani biljke od nametnika i biljojeda, a služi i za privlačenje kukaca koji sudjeluju u oprašivanju biljke. Isto tako, eterično ulje smanjuje transpiraciju i sprječava isparavanje prevelike količine vode u nepovoljnim uvjetima. Ipak, protektivni učinak eteričnog ulja najviše se ističe kroz fungicidno, baktericidno, pesticidno i herbicidno djelovanje (Vinceković i sur., 2020).

Prisutnost fitopatogenih gljiva može dovesti do bolesti biljke, a samim time i do bolesti njezinog konzumenta. Sastavnice eteričnog ulja mogu djelovati antifugalno putem nekoliko različitih biokemijskih puteva, a najveći učinak postiže se upravo sinergističkim djelovanjem. Moguća djelovanja su inhibicija stvaranja spora, rada mihotondrija, sinteze proteina i nukleinskih kiselina te inhibicija sinteze ergosterola, analoga kolesterola u biljkama (Raveau i sur., 2020). Međutim, najveću antifugalnu aktivnost imaju spojevi iz skupine fenola i aldehida/ketona, dok je najslabije djelovanje zabilježeno kod etera i ugljikovodika (Kalemba i Kunicka, 2003).

Antimikrobne sastavnice eteričnog ulja djeluju na način da se vežu za površinu stanice i potom prolaze kroz fosfolipidni dvosloj stanične membrane. To dovodi do razaranja unutarstaničnog sadržaja i izlaska staničnog materijala. Navedeno djelovanje uzrokuje promjene u staničnom metabolizmu te posljedično dovodi do smrti bakterije. Eterično ulje ima jače antimikrobno djelovanje na Gram pozitivne bakterije koje, za razliku od Gram negativnih bakterija, sadrže dodatnu vanjsku membranu bogatu lipopolisaharidima (Chouhan i sur., 2017).

Herbicidno djelovanje eteričnog ulja očituje se kroz alelopatiju, odnosno biokemijsku interakciju biljaka koja utječe na njihov rast i razvoj. Hlapljive tvari eteričnog ulja djeluju kao alelokemikalije i inhibiraju klijanje drugih biljaka koje konkuriraju za rast na istom tlu (Ramezani i sur., 2008).

Eterično ulje karakterizira i pesticidno djelovanje jer njegove sastavnice mogu imati neuromodulatorno i toksično djelovanje na štetočine koje napadaju biljku. S obzirom da je većina eteričnih ulja sigurna za sisavce, ptice i ribe, njihova primjena predstavlja ekološki prihvatljiviju opciju za obranu biljke u budućnosti (Koul i sur., 2008).

Eterično ulje koristi se u fitoterapiji i liječenju brojnih bolesti poput atopijskog dermatitisa (Masako i sur., 2005), sindroma iritabilnog crijeva (Portincasa i sur., 2016), osteoartritisa (Yip i sur., 2008), karijesa (Wiwattanarattanabut i sur., 2017), dismenoreje (Ostad i sur., 2001), dojenačkih kolika (Alexandrovich i sur., 2003), mišićnog spazma i brojnih drugih bolesti (Baser i Buchbauer, 2009).

Industrijska upotreba eteričnog ulja uključuje izradu parfema, kozmetičkih proizvoda, higijenskih potrepština, sredstava za čišćenje i proizvoda za aromaterapiju. U prehrambenoj industriji, eterična ulja se upotrebljavaju kao pojačivači okusa, a najčešće se koriste u proizvodnji alkoholnih i gaziranih pića, pekarskih i konditorskih proizvoda te sladoleda i umaka (Baser i Buchbauer, 2009).

2.4. KEMIJSKI SASTAV ETERIČNIH ULJA

Istraživanja eteričnih ulja rezultirala su identificiranjem oko 500 različitih sastavnica (Pepeljnjak i Kozarić, 2019). Eterična ulja obično sadrže 20-60 različitih kemijskih spojeva, a visok udio (20-70 %) u ulju odnosi se na svega nekoliko glavnih sastavnica, dok su ostali hlapljivi spojevi prisutni u tragovima. S obzirom na kemijsku strukturu, hlapljivi spojevi spadaju u ugljikovodike ili kisikove derivate, a određeni spojevi mogu sadržavati sumpor ili dušik. Terpeni su najzastupljenija skupina spojeva u eteričnim uljima, a manji udio čine fenilpropanoidi i ostali spojevi (Slika 2) (Bakkali i sur., 2008). Isto tako, hlapljivi spojevi mogu

biti alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri, laktoni, karboksilne kiseline, fenoli, eteri itd. (Burčul i sur., 2020)



Slika 2. Podjela hlapljivih spojeva (Kalođera i sur., 1998)

2.4.1. Terpeni

Terpeni su spojevi koji se sastoje od jedne ili više izoprenskih jedinica (C_5H_8) vezanih po principu “glava-rep“. Dijele se na monoterpene, seskviterpene, diterpene i triterpene, odnosno spojeve od 2, 3, 4 i 6 izoprenskih jedinica. Terpeni mogu biti derivirani s jednom ili više funkcionalnih grupa pa se u tom slučaju nazivaju terpenoidi.

U eteričnim uljima, monoterpeni su najzastupljenija podskupina terpena i mogu imati cikličku ili acikličku strukturu (Hammer i sur., 1999). S obzirom na funkcionalnu skupinu, mogu biti aldehidi, ketoni, laktoni, alkoholi, esteri, fenoli, oksidi i laktoni (Lambert i sur., 2001). Ciklički monoterpeni uključuju mono-, di- i tricikličke terpene. Osim što se takvi spojevi razlikuju po stupnju ciklizacije, mogu se razlikovati i po prisutnosti aromatske strukture koja znatno utječe na biološku aktivnost eteričnog ulja. Neki od hlapljivih spojeva koji spadaju u skupinu monoterpena su geraniol, nerol, sabinen, β -mircen, β -pinen, α -pinen, limonen, α -, β - i γ -terpinen, *p*-cimen, timol, mentol i karvakrol (Janssen i sur., 1987).

Seskviterpeni predstavljaju skupinu spojeva s najraznovrsnijim strukturama koje mogu biti linearne, razgranate i cikličke, a ujedno su i najzastupljeniji spojevi u eteričnim uljima nakon monoterpena. Istaknuti predstavnici ove skupine su nerolidol, α -bisabolen, β -kariofilen i santalol. Diterpeni i triterpeni također mogu biti aciklički ili mono-, di- i triciklički spojevi. Osim što je njihova zastupljenost u eteričnim uljima manja u odnosu na ostale terpene, ujedno

imaju veću molekulsku masu pa je njihova izolacija iz biljnog materijala zahtjevnija (Morris i sur., 1979).

2.4.2. Fenilpropanoidi

Fenilpropanoidi su aromatični produkti deaminacije fenilalanina, esencijalne aminokiseline. Sastavljeni su od fenilpropanske jedinice (C_6-C_3), odnosno od benzenskog prstena povezanog s pobočnim lancem od 3 ugljikova atoma. Fenilpropanoidi jednostavnije strukture sadrže samo jednu fenilpropansku jedinicu, a u njih spadaju hidroksicimetne kiseline i monolignoli. Kompleksniji spojevi nastaju kondenzacijom fenilpropanske jedinice i acetata i čine ih flavonoidi, izoflavonoidi i stilbeni. Isto tako, fenilpropanoidi mogu nastati vezanjem na fenilni prsten ili propansku skupinu. Rasprostranjenost fenilpropanoida u eteričnim uljima nije velika, no određena ulja ih mogu sadržavati u visokim koncentracijama (70-90 %) (Dixon i sur., 2002). U ovu skupinu spada oko 50 kemijskih spojeva poput anetola, eugenola, cimetaldehida, estragola i miristicina (Burčul i sur., 2020)

2.4.3. Ostali spojevi

Skupinu ostalih sastojaka eteričnog ulja čine lančasti ugljikovodici i njihovi derivati s kisikom te spojevi sa sumporom ili dušikom. Spojevi sa sumporom ili dušikom mogu biti prisutni u ulju u obliku aglikona, glukozinolata ili produkata njihove razgradnje. Iako nisu česte komponente eteričnih ulja, može ih se naći u porodicama *Brassicaceae* i *Alliaceae* u visokim koncentracijama (Fahey i sur., 2001). Ostali spojevi mogu imati i aromatsku strukturu pa tako postoje aromatski aldehidi kao što su kuminaldehid, benzaldehid, cimetaldehid, vanilin i anisaldehyd (de Groot i Schmidt, 2016).

2.5. ETERIČNO ULJE SJEMENKI KOMORAČA

Sjemenke komorača sadrže 1,1- 3,38 % eteričnog ulja (Anwar i sur., 2009a; Mimica-Dukic i sur., 2003), a prema Pepeljnjak i Kozarić (2019) prinos ulja može rasti i do 6 %. Udio eteričnog ulja ovisi o stupnju zrelosti sjemenke pa se tako u nezrelim sjemenkama nalazi 2,8 % eteričnog ulja, a u zrelim 3,5 % iz čega se može zaključiti da porastom stupnja zrelosti sjemenke raste i udio eteričnog ulja (Anwar i sur., 2009b). Međutim, prema rezultatima istraživanja koje su

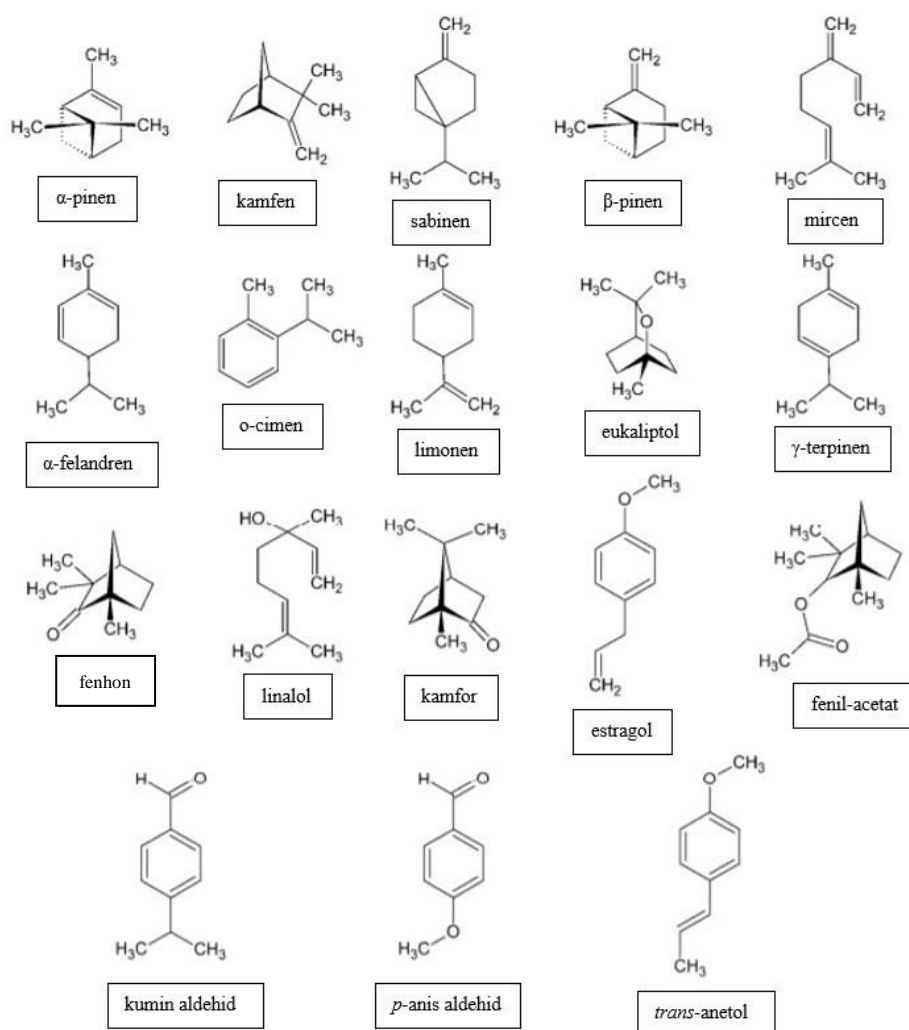
proveli Telci i sur. (2009) najveći prinos ulja (5,8 %) dobiven je iz nezrelih sjemenki. Na prinos ulja utječe i vrsta uzgoja komorača. Prema Abdellaoui i sur. (2017), sjemenke divljeg komorača sadrže $3,67 \pm 0,13$ mL 100 g⁻¹ eteričnog ulja, dok je ta vrijednost niža za kultiviranu vrstu komorača ($2,13 \pm 0,07$ mL 100 g⁻¹). Autori su zaključili da niske temperature i veća nadmorska visina povoljno utječu na akumulaciju eteričnog ulja.

Eterično ulje sjemenki komorača može sadržavati i do 80 različitih hlapljivih spojeva (Badgubar i sur., 2014). Spojevi koji čine najveći udio ulja (Slika 3) spadaju u oksidirane monoterpe ili terpenoide (87,3 %), a slijede ih skupina monoterpena (7,88 %) i seskviterpena (0,35 %). Najzastupljeniji terpenoidi su *trans*-anetol, fenhon i estragol, dok je najzastupljeniji monoterpen limonen (Anwar i sur., 2009a). Prema Faten i sur. (2011), najzastupljeniji hlapljivi spoj u eteričnom ulju sjemenke je *trans*-anetol čiji udio iznosi 92,5 %. Osim *trans*-anetola, identificirani su i cineol, fenhon, α -pinen, anisaldehyd i limonen s udjelima od 4,09, 1,2, 0,26, 0,95 i 0,085 %. Diao i sur. (2014) navode kako je udio *trans*-anetola u eteričnom ulju 68,53 %, a slijede ga estragol (10,42 %), limonen (6,24 %) i fenhon (5,45 %). Mimica-Dukic i sur. (2003) također su istraživali sastav eteričnog ulja komorača. Prema njihovim rezultatima, udio *trans*-anetola u eteričnom ulju sjemenke komorača je 74,18 %, fenhona 11,32 %, estragola 5,29 %, limonena 2,53 % i α -pinena 2,77 %.

Sastav eteričnog ulja ovisi o klimatskim, vremenskim, geografskim, okolišnim i poljoprivrednim uvjetima u kojima biljka raste te o genetici same biljke (Telci i sur., 2006; Marčetić i sur., 2017) Shahat i sur. (2011) su određivali sastav eteričnog ulja sjemenki slatkog, gorkog i firentinskog komorača. Izolirali su eterično ulje postupkom vodene destilacije. Navedeni varijeteti su se razlikovali u udjelu *trans*-anetola i estragola, dok su vrijednosti udjela ostalih hlapljivih spojeva u eteričnom ulju bile slične. Udio *trans*-anetola u eteričnom ulju bio je sljedeći: 61 % u firentinskom, 46 % u slatkom i 5 % u gorkom komoraču. Sukladno tome, udio estragola u eteričnom ulju sjemenke gorkog komorača iznosio je 58 %, dok je ta vrijednost u firentinskom i slatkom komoraču bila niža (12 i 6 %) zbog čega njihovo eterično ulje ima slabiju antioksidacijsku aktivnost. Telci i sur. (2009) istraživali su utjecaj stupnja zrelosti sjemenke na sastav eteričnog ulja. Zaključili su da se udio *trans*-anetola u eteričnom ulju statistički značajno ne razlikuje među sjemenkama različitog stupnja zrelosti. Međutim, udio ukupnih monoterpena i estragola značajno pada s porastom stupnja zrelosti sjemenke.

Usljed utjecaja temperature, svjetla, metala i kisika, eterično ulje može biti podvrgnuto procesima oksidacije i polimerizacije što dovodi do degradacije hlapljivih spojeva. Zbog toga je važno odabrati metodu izolacije pomoću koje će se dobiti što veći prinos eteričnog ulja uz

što veće očuvanje njegovih sastavnica, a potom dobiveno ulje treba skladištiti u adekvatnim uvjetima (Turek i Stintzing, 2013).



Slika 3. Hlapljivi spojevi eteričnog ulja sjemenke komorača (Shahat i sur., 2011)

2.5.1. Svojstva eteričnog ulja sjemenki komorača

Eterično ulje sjemenki komorača karakterizira antioksidativno, antibakterijsko (Ben Abdesslem i sur., 2021), citotoksično, antikancerogeno (Ghasemian i sur., 2020), antifugalno (Soylu i Incekara, 2017), antivirusno i antialergijsko djelovanje (Badgujar i sur., 2014). Isto tako, i određeni hlapljivi spojevi u eteričnom ulju imaju karakteristično djelovanje. *Trans*-anetol ima antitromboidno i antikancerogeno (Tognolini i sur., 2007), β-mircen i limonen hepatoprotektivno djelovanje (Al-Snai i sur., 2019), a *p*-cimen potencira antimikrobno djelovanje karvakrola (Bakkali i sur., 2008). Nadalje, eterično ulje sjemenki komorača ima 2-4 puta jače antimikrobno djelovanje na bakterije *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli* i

Candida albicans u odnosu na referentne antibiotike. Navedeno antimikrobno djelovanje proporcionalno je s udjelom *trans*-anetola u eteričnom ulju, ali i s udjelom limonena te estragola (Aprotosoae i sur., 2008). He i Huang (2011) utvrdili su da *trans*-anetol, estragol, fenhon i kamfor sprječavaju rast plijesni *Cladosporium cladosporoides*, *Penicillium ochrochloron*, *Puccinia helianthi* i *Trichophyton mentagrophytes*, a upravo navedeni spojevi daju specifičan miris eteričnom ulju.

2.6. IZOLACIJA ETERIČNIH ULJA

Odabir pravilne metode izolacije eteričnog ulja predstavlja bitan dio planiranja eksperimenta. Temelj odabira metode je biljni materijal, odnosno dio biljke iz kojeg se izolira eterično ulje (list, cvijet, korijen, plod, sjemenka i/ili gomolj), ali i sastav samoga ulja. Eterična se ulja razlikuju po udjelu, strukturi te fizikalnim i kemijskim svojstvima hlapljivih spojeva. Odabrana metoda treba biti što učinkovitija kada se radi o izolaciji eteričnog ulja s termolabilnim komponentama ili komponentama koje su podložne oksidaciji. Zbog toga se sve češće upotrebljavaju klasične metode koje koriste „zelena otapala“ te nekonvencionalne metode koje skraćuju vrijeme postupka, a samim time i degradaciju termolabilnih komponentata (Behl i sur., 2021; Putnik i sur., 2019).

Postoje razne tehnike izolacije eteričnih ulja i mogu se podijeliti na konvencionalne i nekonvencionalne metode. U konvencionalne metode spadaju vodena destilacija, destilacija vodenom parom, direktna parna destilacija, ekstrakcija organskim otapalima, ekstrakcija nehlapljivim otapalima, perkolacija, maceracija i prešanje. U novije, nekonvencionalne metode spadaju ekstrakcija potpomognuta enzimima, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija superkričnim fluidima, ekstrakcija potpomognuta hladnom atmosferskom plazmom, ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem, ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku te kombinacije navedenih metoda (Handa, 2008., Sadgrove i Jones, 2015). Od svih navedenih tehnika za izolaciju eteričnog ulja, najčešće se upotrebljava vodena destilacija (Turek i Stintzing, 2013). Eterična ulja sadrže hlapljive spojeve različite polarnosti. Primjerice, za učinkovitiju izolaciju terpena potrebno je koristiti nepolarna otapala, dok su polarna otapala pogodna za izolaciju terpenoida. Prema literaturnim podacima, postoji razlika u djelovanju eteričnih ulja koja su dobivena istom metodom izolacije, ali upotrebom različitih otapala. Naime, u istraživanju koje su proveli Sarikurkcu i sur. (2009), pokazalo se da je upotreba vode kao otapala rezultirala najvećom antioksidacijskom aktivnošću eteričnog ulja u odnosu na heksan, diklormetan, etil

acetat i metanol. Isto tako, ukoliko određena otapala poput etanola zaostanu u konačnom produktu izolacije, njihova primjena može imati toksične posljedice na konzumente pa se primjena otapala poput vode smatra sigurnijom za upotrebu, a ujedno doprinosi ekonomičnosti procesa destilacije i čini ga ekološki prihvatljivijim (Filly i sur., 2016; Tongnuanchan i Benjakul, 2014).

Komponente eteričnog ulja razlikuju se po molekulskoj masi pa se sukladno tome mogu podijeliti u plinove, hlapljive spojeve i poluhlapljive spojeve. Lako hlapljivi spojevi imaju nisku molekulsku masu i prvi se izoliraju iz biljnog materijala. Međutim, primjena dugotrajne izolacije ili metode s visokim temperaturama može uzrokovati degradaciju takvih komponenata (Marriott i sur., 2001). Zbog toga optimiranje uvjeta izolacije predstavlja ključan dio provedbe procesa kako bi se dobio što veći prinos eteričnog ulja (Sadgrove i Jones, 2015).

2.6.1 Vodena destilacija

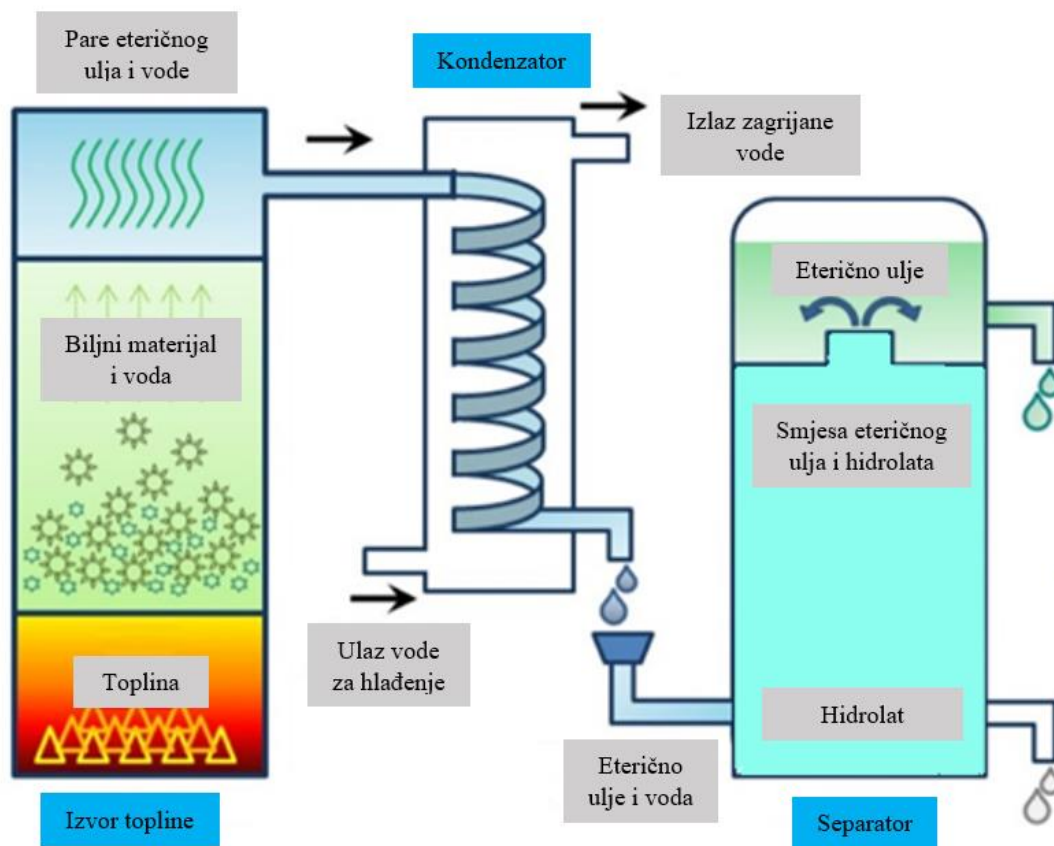
Vodena destilacija (Slika 4) uključuje zagrijavanje biljnog materijala u prisutnosti vode do temperatura koje su više od točke vrelišta. To rezultira stvaranjem plinova koji se sastoje od vodene pare i para eteričnog ulja. Plinovi se, nakon stvaranja, šire do kondenzatora u kojem se odvija hlađenje do temperature ispod 30 °C. Ohlađene pare se kondenziraju i prevode u tekuće stanje. S obzirom da se radi o uljnim i vodenim parama, nastaju dvije tekuće faze koje se međusobno ne miješaju. Po završetku vodene destilacije, u separatoru se najčešće nalazi gornja faza, odnosno eterično ulje i donja faza koju čini hidrolat, no postoje i eterična ulja koja su teža od vode pa se takva ulja nalaze ispod faze u kojoj je hidrolat (Sadgrove i Jones, 2015).

Prema rezultatima istraživanja Pourmortazavi i Hajimirsadeghi (2007), vodenom se destilacijom izolira veći udio α -pinena, β -pinena, mircena, *o*-cimena, limonena, γ -terpinena i kuminaldehida u odnosu na superkritičnu fluidnu ekstrakciju. Isto tako, *p*-cimen i kuminol su se izolirali isključivo vodenom destilacijom. Mohammed i sur. (2019) istraživali su utjecaj različitih metoda ekstrakcije na prinos i sastav eteričnih ulja određenih vrsta obitelji *Apiaceae*. Prema njihovim rezultatima, najveći prinosi eteričnih ulja kima, anisa i kopra dobiveni su vodenom destilacijom. Isto tako, udio monoterpena i seskviterpena u eteričnim uljima koja su izolirana vodenom destilacijom bio je veći u odnosu na eterična ulja dobivena destilacijom vodenom parom.

Prednost vodene destilacije je smanjenje gubitaka eteričnog ulja, odnosno gubitka hlapljivih komponenata veće polarности koje se kondenziraju u vodenoj, a ne uljnoj fazi. To se postiže provođenjem destilacije na aparaturi po Clevengeru koja omogućava vraćanje vodene pare u

aparaturu tijekom procesa (Sadgrove i sur., 2014). Isto tako, postupkom vodene destilacije moguće je izolirati eterično ulje iz praškastih materijala, dok primjerice parna destilacija uzrokuje stvaranje nakupina biljnog materijala kroz koje vodena para ne može prodrijeti. Ostale prednosti su ekonomičnost industrijskih dijelova aparature, njihova jednostavna konstrukcija te prikladnost za rad u pogonima ili na terenu (Handa, 2008).

Nedostaci vodene destilacije su provođenje iste na visokim temperaturama pri kojima dolazi do frakcioniranja eteričnog ulja u separatoru. Naime, visoka temperatura u aparaturi za vodenu destilaciju uzrokuje previsoku temperaturu vodene faze prilikom kondenziranja pa se ulje, pri ulasku u separator, razdvaja. Isto tako, eterično ulje koje se kondenziralo može ponovno početi isparavati. Osim frakcioniranja ulja, visoka temperatura vodene destilacije može uzrokovati visok udio teško hlapljivih komponenata u eteričnom ulju, a manju zastupljenost lako hlapljivih spojeva (Sadgrove i Jones, 2015). Određena ulja sadrže visok udio metil eugenola i safrola, pripadnika skupine fenilpropanoide. Takva eterična ulja imaju veću gustoću od vode pa se mogu izolirati postupkom vodene destilacije samo u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (Başer i Demirci, 2007).



Slika 4. Shematski prikaz vodene destilacije (Tongnuanchan i Benjakul, 2014)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

Za provođenje eksperimentalnog dijela rada korištene su sjemenke gorkog komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) (AGRISTAR d.o.o., Višnjevac, Hrvatska) uzgojene u Osječko-baranjskoj županiji u Slavoniji (Hrvatska). Sjetva komorača odrađena je 1. ožujka 2020. Prilikom uzgoja provedene su sljedeće agrotehničke mjere: oranje, tanjuranje i roto-drljanje kao dio predsjetvene pripreme, suzbijanje korova košenjem te žetva žitnim kombajnom koja je odrađena 30. rujna 2020. Potom je provedeno sušenje komorača na podnim sušarama pri temperaturi od 42 °C. Tijekom sušenja, sjemenke komorača su bile raspoređene u sloju debljine 30 cm, a kao energent je korišten plin. Neposredno prije izvođenja eksperimentalnog dijela, sjemenke komorača su usitnjene pomoću električnog mlinca.

Aparatura i pribor:

- Staklene čaše, volumena 100 i 250 mL
- Metalna žličica za vaganje
- Stakleni lijevak
- Tikvice s okruglim dnom, volumena 250 i 500 mL
- Stakleni čep za tikvicu s okruglim dnom
- Menzura, volumena 5 mL i 100 mL
- Viala, volumena 1,5 mL (navoj N9, ravno dno, 11,6 x 32 mm grad.)
- Plastični čep sa septom za vialu
- Metalna špatula
- Mikropipete Eppendorf, volumena 10 µL, 100 µL i 1000 µL
- Aparatura za izolaciju eteričnog ulja po Clevengeru (Europska Farmakopeja, 2008)
- Električni mlinac (Waring Commercial, Stamford, SAD)
- Analitička vaga (OHAUS, Parsippany, SAD)
- Malvern Panalytical Mastersizer 2000 (Malvern Panalytical, Malvern, Velika Britanija)
- Električni grijač (LabHEAT, Baden-Württemberg, Njemačka)
- Mastersizer 2000 (Malvern Panalytical, Malvern, UK) opremljen s:

- računalni software Mastersizer 2000 (verzija 5.61)
- Uređaj za plinsku kromatografiju, Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) opremljen s:
 - maseni detektor tipa Agilent Technologies 5973 *inert* Mass Selective Detector
 - računalni software ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

Otapala i reagensi:

- *n*-heksan, HPLC čistoće (Lach-Ner, d.o.o, Neratovice, Češka)
- Interni standard, nerol (10,518 mg mL⁻¹) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka)
 Priprema: Odvaž se 525,90 mg nerola u odmjernu tikvicu od 50 mL i zatim nadopuni *n*-heksanom do oznake.
- Standardna smjesa C₇ – C₃₀ alkana (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Bezvodni natrijev hidrogensulfat (Lach-Ner, d.o.o, Neratovice, Češka)
- 96 %-tni etanol (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Destilirana voda

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje raspodjele veličine čestica

Mjerenje se temelji na metodi laserskog raspršenjana, a provodi se na uređaju Malvern Panalytical Mastersizer 2000 (Malvern Panalytical, Malvern, UK) pomoću software-a Mastersizer 2000 (verzija 5.61). Veličina čestica određuje se tako da se određena odvaga uzorka postavi na predviđeno mjesto na uređaju. Mjerenje se provodi pomoću suhe (Scirocco) disperzijske jedinice.

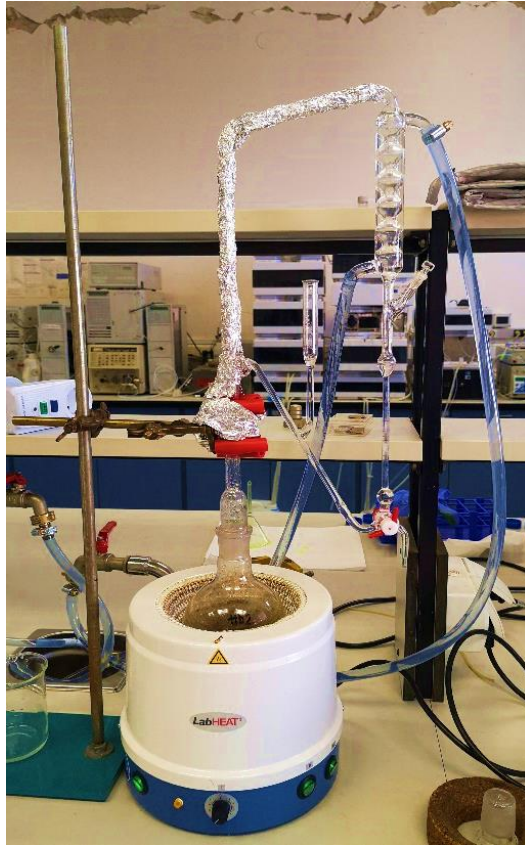
3.2.2. Vodena destilacija

Izolacija eteričnog ulja iz sjemenki komorača provedena je postupkom vodene destilacije uz varijaciju sljedećih uvjeta: omjer biljnog materijala i vode te vrijeme destilacije prema centralno-kompozitnom dizajnu s 5 centralnih točaka. Na ovaj način dobiveno je 13 uzoraka eteričnog ulja, a eksperimentalni plan pokusa prikazan je u Tablici 1.

Na analitičkoj vagi, u staklenoj čaši, odvažuje se potrebna odvaga prethodno usitnjenih sjemenki komorača tako da se poštuje zadani omjer biljnog materijala i vode te se uzorak kvantitativno prenese u tikvicu s okruglim dnom. Zatim se u tikvicu doda 200 mL destilirane vode te se sadržaj tikvice polako promiješa. Tikvica s mješavinom uzorka i vode spoji se na aparaturu po Clevengeru (Slika 5). Tikvica se zatim kontinuirano zagrijava, a vrijeme destilacije se mjeri od trenutka vrenja, odnosno od trenutka kada se prva kap destilata kondenzira na vodenom hladilu. Nakon isteka zadanog vremena, zaustavlja se zagrijavanje tikvice te se tikvica odvoji od aparature. Nakon 20 min u graduiranom separatoru očita se volumen izdvojenog eteričnog ulja. Potom se pomoću pipca iz separatora prvo ispusti hidrolat, a zatim eterično ulje koje se sakupi u vialu. U vialu s eteričnim uljem doda se ~1 g bezvodnog natrijevog sulfata kako bi se uklonili mogući ostaci vode te se nakon 15 min pipetom izdvoji eterično ulje, prebaci u čistu vialu i skladišti pri -18 °C do provođenja analiza. Prije sljedeće destilacije, provede se destilacija etanola (96 %-tni) te potom destilirane vode u svrhu ispiranja aparature. Postupak vodene destilacije proveden je u dva ponavljanja za svaki uzorak.

Tablica 1. Popis uzoraka i plan eksperimenta

ŠIFRA UZORKA	OMJER BILJNI MATERIJAL:VODA	VRIJEME DESTILACIJE (min)
ETU1	1:20	80
ETU2	1:20	80
ETU3	1:10	120
ETU4	1:30	40
ETU5	1:34,1	80
ETU6	1:10	40
ETU7	1:5,9	80
ETU8	1:20	80
ETU9	1:20	80
ETU10	1:20	80
ETU11	1:20	136,6
ETU12	1:20	23,4
ETU13	1:30	120



Slika 5. Aparatura po Clevengeru (vlastita fotografija)

3.2.3. Određivanje prinosa eteričnog ulja

Prinos eteričnog ulja računa se prema jednadžbi [1]:

$$\text{prinos (\%)} = \frac{V(\text{eteričnog ulja})}{m(\text{uzorka})} \times 100 \quad [1]$$

gdje je:

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

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

3.2.4. Analiza hlapljivih spojeva

Princip metode:

Analiza hlapljivih spojeva provodi se primjenom GC-MS analize. Unutar plinskog kromatografa, sastavnice eteričnog ulja prevode se u plinovito stanje i raspodjeljuju se između stacionarne i mobilne faze u koloni. Kroz kolonu ih transportira inertni plin, a potom se kvalitativno analiziraju u masenom spektrometru.

Priprema uzorka:

Za pripremu uzorka u vialu se otpipetira 10 μL eteričnog ulja, 100 μL otopine internog standarda (nerol) i 890 μL *n*-heksana.

Postupak određivanja:

Pripremljen uzorak ulja analizira se na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) s masenim detektorom tipa Agilent Technologies 5973 *inert* Mass Selective Detector (MS) (Slika 6). Analiza se provodi na kapilarnoj koloni Agilent HP-5MS [(5%-fenil)-metilpolisiloksan; 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm] uz sljedeće uvjete: volumen injektiranog uzorka 1 μL , omjer razdjeljenja (eng. *split ratio*) 100:1 te plin nosioc helij uz konstantan protok 1 mL min⁻¹. Tijekom analize koristi se sljedeći temperaturni program kolone: početna temperatura 60 °C, zatim 60 - 145 °C (3 °C min⁻¹), 145 - 250 °C (30 °C min⁻¹) te zadržavanje 3 min na maksimalnoj temperaturi (250 °C). Ukupno vrijeme trajanja kromatografske analize je 34,83 min. Temperatura injektora je 250 °C, dok temperature prenosnice, MS izvora i kvadripola iznose 280, 230 i 150 °C. Energija elektrona za ionizaciju molekula uzoraka je 70 eV, a način rada postavljen je kao praćenje odabranih iona (eng. *selected ion monitoring*, SIM). Parametri masenog spektrometra postavljeni su na brzinu očitavanja 1 očitavanje s⁻¹ (scan s⁻¹), a opseg razdvajanja mase i naboja (*m/z*) u rasponu 30 – 550.



Slika 6. Plinski kromatograf Agilent Technologies 6890N Network GC System s masenim detektorom tipa 5973 *inert* Mass Selective Detector (vlastita fotografija)

Identifikacija i kvantifikacija hlapljivih spojeva:

Identifikacija hlapljivih spojeva provodi se usporedbom retencijskih vremena i masenih spektara (m/z) ispitivanih spojeva s retencijskim vremenom i masenim spektrom komercijalnih standarada te usporedbom dobivenih masenih spektara s onima u NIST bazi podataka korištenjem softvera MSD ChemStation Data Analysis. Dodatno, za potvrdu identificiranih spojeva izračuna se njihov retencijski indeks i uspoređi s podacima u dostupnoj literaturi. Kako bi se izračunao retencijski indeks izdvojenih hlapljivih spojeva pripremi se standardna smjesa $C_7 - C_{30}$ alkana i analizira pod istim kromatografskim uvjetima kao i uzorci. Kvantitativne vrijednosti za pojedinačne hlapljive komponente izračunaju se iz jednadžbi baždarnih pravaca standardnih spojeva (Tablica 2) uzimajući u obzir faktor razrjeđenja ($FR = 100$), pri čemu su spojevi za koje nisu bili dostupni standardi kvantificiraju preko spoja najsličnije kemijske strukture iz iste kemijske skupine.

Tablica 2. Jednadžbe baždarnih pravaca za hlapljive spojeve eteričnog ulja sjemenki komorača

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

Analitička mjerenja provedena su u tri paralelna određivanja, a rezultati analize izraženi su u mg mL⁻¹ eteričnog ulja.

3.2.5. Eksperimentalni dizajn i statistička obrada podataka

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišteni su programski sustavi Design-Expert 10.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, SAD) i XLSTAT 2021.23.2.1141.0 (Addisoft, Pariz, Francuska).

Za dizajn eksperimentalnog plana pokusa korišten je centralno-kompozitni dizajn (eng. *central composite design*, CCD) s dva faktora.

Prema Khuri i Mukhopadhyay (2010), centralno-kompozitni dizajn (CCD) se sastoji od tri dijela: puni 2k faktorijalni dizajn (dizajn prvog reda), osni dio sastavljen od 2k broja točaka

smještenih tako da su dvije točke položene na osima kontrolnih varijabli na istoj udaljenosti α od centra te od centralne točke i replikacije u istoj.

Utvrđene su gornje i donje granice ispitivanih parametara kako slijedi: omjer biljnog materijala i vode od 1:10 do 1:30 te vrijeme destilacije od 40 do 120 min. Svaki ispitivani parametar promatran je na pet razina ($-\alpha$, -1 , 0 , 1 , α) što je ukupno 13 pokusa uključujući faktorske, aksijalne i centralnu točku s pet ponavljanja (Tablica 1).

Za utvrđivanje signifikantnih razlika između uzoraka obzirom na prinos (%) eteričnog ulja i udio hlapljivih spojeva prema kemijskim skupinama (%) provedena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) i post-hoc Tukey test na 95 %-tnoj razini vjerojatnosti.

Za analizu i statističku obradu dobivenih podataka korištena je metodologija odzivnih površina – RSM (eng. *Response Surface Methodology*). Regresijski model za promatranu ovisnu varijablu (prinos, %) izračunat je u skladu sa sljedećom jednačbom [2]:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=j}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad [2]$$

gdje je:

Y- predviđeni rezultat odnosno vrijednost ovisne varijable,

β_0 - fiksni koeficijent, a β_i , β_{ii} i β_{ij} linearni, kvadratni i koeficijent interakcije,

$X_i \dots X_j$ - vrijednost neovisne, kontrolirane varijable

Da bi se utvrdila signifikantnost utjecaja provedenih parametara vodene destilacije korištena je analiza varijance (ANOVA). Valjanost empirijskog modela za predviđanje prinosa eteričnog ulja ispitana je metodom ANOVA na 95 %-tnoj razini vjerojatnosti.

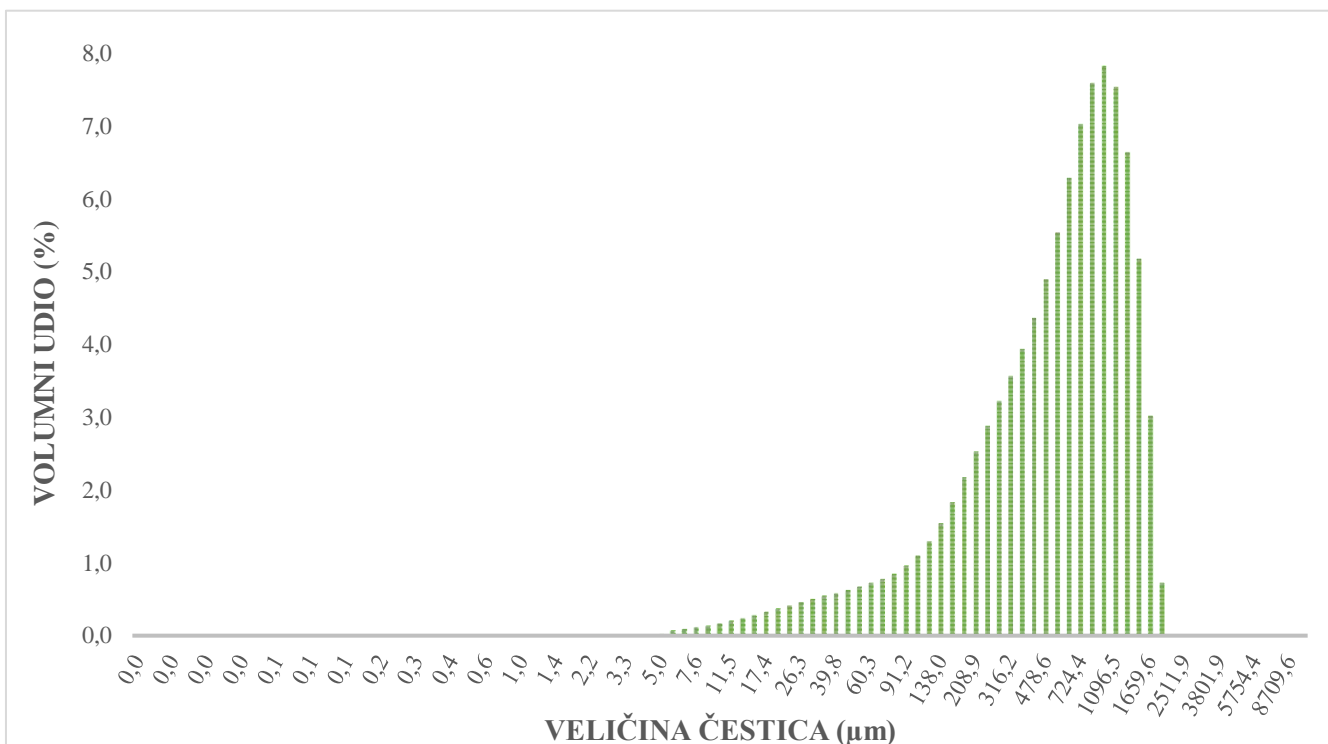
Optimiranje parametara vodene destilacije u svrhu ostvarenja maksimalnog prinosa eteričnog ulja provedena je metodom poželjnosti, gdje je prinos eteričnog ulja obilježen faktorom važnosti 5.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je optimirati uvjete izolacije eteričnog ulja sjemenki komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) postupkom vodene destilacije. Prije provođenja vodene destilacije izmjerena je veličina čestica usitnjenih sjemenki komorača. Tijekom izolacije eteričnog ulja postupkom vodene destilacije varirani su omjer biljnog materijala i vode te vrijeme destilacije te je na taj način dobiveno 13 uzoraka eteričnog ulja sjemenki komorača. Za svaki uzorak određen je prinos eteričnog ulja te je analiziran kemijski sastav primjenom GC-MS analize. Statističkom analizom ispitane su razlike između uzoraka te je ispitan utjecaj parametara vodene destilacije (omjer biljnog materijala i vode te vrijeme destilacije) na prinos eteričnog ulja. Na kraju, provedeno je optimiranje parametara vodene destilacije u svrhu dobivanja maksimalnog prinosa eteričnog ulja.

4.1. VELIČINA ČESTICA

Prije provedbe vodene destilacije, izmjerena je veličina čestica usitnjenih sjemenki komorača i dobiveni rezultati prikazani su na Slici 7. Veličina čestica izmjerena je u rasponu od 0,1 do 1905,5 μm , a srednja vrijednost veličine 50 % čestica, d (0,5), iznosila je 658,4 μm .



Slika 7. Distribucija veličine čestica usitnjenih sjemenki komorača

4.2. PRINOS ETERIČNOG ULJA

Tablica 3. Prinos eteričnog ulja sjemenki komorača

UZORAK	PRINOS ETERIČNOG ULJA (%)
	p < 0,001*
ETU1	5,00 ± 0,01 ^b
ETU2	5,12 ± 0,03 ^b
ETU3	5,50 ± 0,01 ^a
ETU4	5,10 ± 0,03 ^b
ETU5	5,46 ± 0,01 ^a
ETU6	4,60 ± 0,03 ^c
ETU7	5,02 ± 0,02 ^b
ETU8	5,10 ± 0,07 ^b
ETU9	5,15 ± 0,07 ^b
ETU10	5,05 ± 0,07 ^b
ETU11	5,10 ± 0,07 ^b
ETU12	4,40 ± 0,07 ^d
ETU13	5,40 ± 0,03 ^a
Prosječna vrijednost	5,08 ± 0,30

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

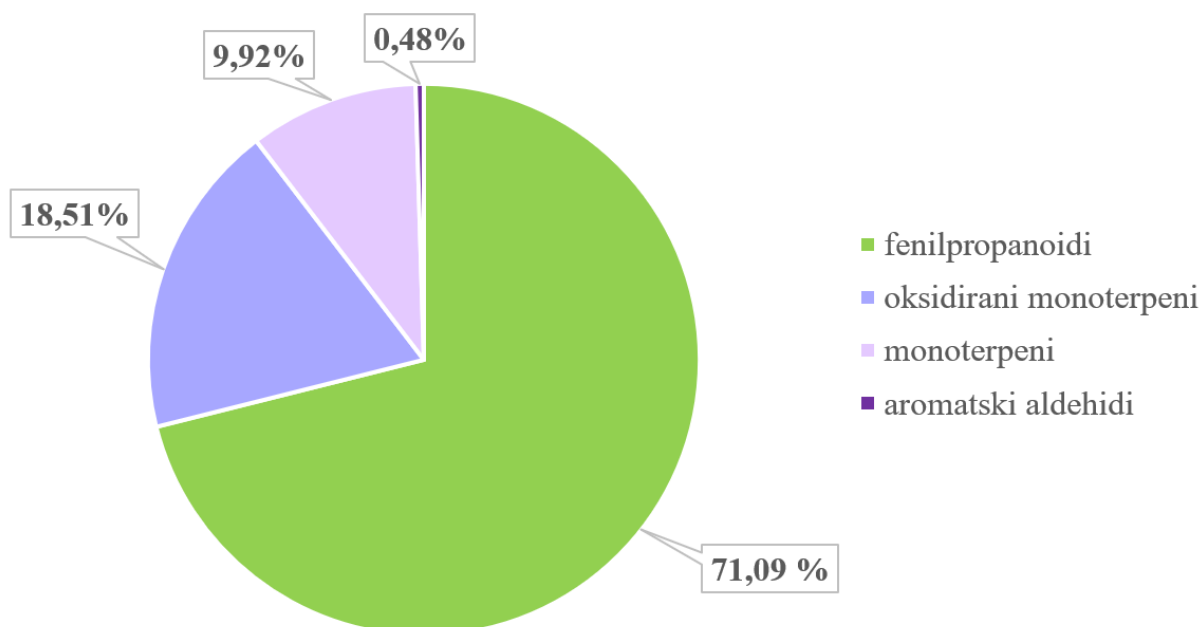
*Statistički značajna varijacija kod $p \leq 0,05$. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

Prinos eteričnog ulja sjemenki komorača (%) prikazan je u Tablici 3 gdje je vidljivo da je prinos eteričnog ulja svih uzoraka određen u rasponu $4,40 \pm 0,07$ do $5,50 \pm 0,01$ %. Najviši prinos eteričnog ulja određen je u uzorku ETU3 ($5,50 \pm 0,01$ %), u kojem je korišten omjer biljnog materijala i vode 1:10, a vrijeme destilacije iznosilo je 120 min. Najniži prinos zabilježen je u uzorku ETU12 ($4,40 \pm 0,07$ %), gdje se vodena destilacija provodila 23,5 min uz omjer biljnog materijala i vode 1:20. Statistička analiza je također pokazala signifikantne razlike između uzoraka obzirom na dobiveni prinos eteričnog ulja pa su se tako prinosi uzoraka ETU3, ETU5 i ETU13 izdvojili kao signifikantno najviši, dok su signifikantno najniže vrijednosti prinosa obilježile uzorke ETU6 i ETU12. Ostali uzorci nisu se međusobno signifikantno razlikovali u

vrijednostima prinosa eteričnog ulja (Tablica 3). Ovi rezultati upućuju na zaključak da se viši prinos postiže uz dulje vrijeme destilacije.

4.3. SASTAV ETERIČNOG ULJA

Sastav svih uzoraka eteričnog ulja analiziran je primjenom GC-MS analize kako bi se utvrdilo postoje li razlike u sastavu obzirom na varijaciju parametara vodene destilacije. U svim uzorcima identificirano je 18 spojeva koji pripadaju skupinama monoterpena, oksidiranih monoterpena, fenilpropanoida te aromatskih aldehida. Najviše zastupljeni bili su fenilpropanoidi (71,09 %), a slijede oksidirani monoterpeni (18,51 %) i monoterpeni (9,92 %), dok su aromatski aldehidi prisutni u najnižem udjelu (0,48 %) (Slika 8).



Slika 8. Prosječan sastav (%) eteričnog ulja sjemenki komorača

Najveći broj identificiranih spojeva pripada skupini monoterpena: α -pinen, kamfen, sabinen, β -pinen, mircen, α -felandren, α -terpinen, *p*-cimen, D-limonen, γ -terpinen i *cis*-sabinen hidrat. Iz skupine fenilpropanoida identificirani su estragol i *trans*-anetol, a iz skupine oksidiranih monoterpena eukaliptol, L-fenhon, kamfor i karvon. Iz skupine aromatskih aldehida identificiran je *p*-anisaldehid (Tablica 4).

Tablica 4. Sastav eteričnog ulja sjemenki komorača

Uzorak	Monoterpeni (mg mL ⁻¹)										
	α -pinen	Kamfen	Sabinen	β -pinen	Mircen	α -felandren	α -terpinen	<i>p</i> -cimen	D-limonen	γ -terpinen	<i>cis</i> -sabinen hidrat
ETU1	28,85±0,21	5,43±0,05	1,36±0,02	1,41±0,00	18,43±0,06	3,90±0,03	0,40±0,03	1,18±0,01	12,77±0,11	5,88±0,02	0,69±0,02
ETU2	27,20±0,20	5,14±0,14	1,30±0,03	1,34±0,01	17,76±0,06	3,83±0,01	0,37±0,06	1,18±0,01	12,55±0,18	5,79±0,05	0,70±0,01
ETU3	29,52±0,33	5,35±0,26	1,41±0,01	1,44±0,03	19,91±0,07	4,08±0,01	0,33±0,06	1,22±0,01	14,01±0,15	6,25±0,04	0,77±0,01
ETU4	20,86±0,31	4,33±0,13	1,16±0,02	1,22±0,02	16,09±0,18	3,60±0,03	0,36±0,07	1,17±0,00	11,60±0,08	5,59±0,05	0,71±0,01
ETU5	30,51±0,19	5,75±0,15	1,37±0,02	1,47±0,01	18,92±0,17	4,04±0,04	0,38±0,04	1,21±0,01	13,66±0,25	6,22±0,09	0,72±0,00
ETU6	33,76±0,44	6,24±0,27	1,46±0,00	1,54±0,01	20,79±0,22	4,18±0,03	0,41±0,02	1,22±0,01	14,57±0,15	6,45±0,08	0,80±0,01
ETU7	40,80±0,52	7,42±0,17	1,63±0,01	1,75±0,03	23,63±0,27	4,60±0,01	0,45±0,15	1,28±0,02	16,71±0,21	7,24±0,10	0,85±0,01
ETU8	24,93±0,86	4,91±0,10	1,20±0,03	1,26±0,02	16,39±0,24	3,63±0,03	0,24±0,07	1,15±0,01	11,89±0,30	5,35±0,12	0,73±0,02
ETU9	32,48±0,51	6,26±0,07	1,43±0,03	1,51±0,03	20,35±0,26	4,12±0,05	0,40±0,08	1,21±0,01	14,54±0,18	6,34±0,10	0,81±0,03
ETU10	28,18±0,50	5,54±0,16	1,35±0,02	1,44±0,01	19,20±0,26	4,02±0,03	0,35±0,04	1,23±0,00	14,23±0,40	6,36±0,13	0,80±0,00
ETU11	31,24±0,29	5,90±0,11	1,35±0,04	1,45±0,02	18,41±0,17	3,96±0,02	0,34±0,05	1,21±0,01	13,32±0,25	5,98±0,05	0,73±0,03
ETU12	31,63±0,71	5,87±0,39	1,43±0,02	1,51±0,01	19,79±0,27	4,16±0,07	0,41±0,02	1,23±0,01	14,40±0,26	6,41±0,12	0,81±0,01
ETU13	32,18±0,61	6,05±0,05	1,37±0,02	1,49±0,02	19,23±0,33	4,10±0,03	0,39±0,05	1,21±0,01	14,25±0,27	6,07±0,10	0,77±0,00
Prosječna vrijednost	30,16 ± 4,72	5,71 ± 0,75	1,37 ± 0,12	1,45 ± 0,13	19,15 ± 1,94	4,02 ± 0,26	0,37 ± 0,05	1,21 ± 0,03	13,73 ± 1,35	6,15 ± 0,47	0,76 ± 0,05

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Tablica 4. Sastav eteričnog ulja sjemenki komorača (nastavak)

Uzorak	Oksidirani monoterpeni (mg mL ⁻¹)				Fenilpropanoidi (mg mL ⁻¹)		Aromatski aldehidi (mg mL ⁻¹)
	Eukaliptol	L-fenhon	Kamfor	Karvon	Estragol	<i>Trans</i> -anetol	<i>p</i> -anisaldehyd
ETU1	0,86±0,03	134,71±0,88	3,03±0,04	1,16±0,02	19,79±0,12	580,72±2,68	4,07±0,01
ETU2	0,90±0,03	135,71±0,54	3,07±0,03	1,13±0,03	19,79±0,05	513,14±0,81	3,93±0,10
ETU3	1,00±0,01	157,81±1,08	3,52±0,03	1,12±0,03	21,79±0,11	605,88±4,34	4,31±0,03
ETU4	0,77±0,16	137,92±1,18	3,13±0,04	1,09±0,04	19,15±0,16	556,64±5,82	3,99±0,01
ETU5	0,91±0,02	143,23±1,56	3,17±0,03	1,13±0,01	21,81±0,25	579,16±8,83	4,03±0,02
ETU6	1,05±0,08	162,31±2,18	3,56±0,04	1,10±0,05	21,35±0,34	566,22±8,38	3,88±0,07
ETU7	1,09±0,01	182,04±2,23	3,95±0,04	1,14±0,02	24,03±0,21	646,56±8,78	4,08±0,13
ETU8	0,85±0,04	135,67±2,34	2,94±0,05	1,14±0,00	18,63±0,30	525,57±8,83	4,03±0,02
ETU9	0,96±0,01	163,11±3,31	3,55±0,05	1,13±0,02	23,10±0,38	619,43±13,67	4,06±0,03
ETU10	0,93±0,02	162,15±3,84	3,56±0,06	1,11±0,02	23,28±0,47	647,11±13,61	4,12±0,03
ETU11	0,91±0,01	141,36±2,07	3,08±0,02	1,13±0,04	19,88±0,31	567,00±9,88	4,04±0,13
ETU12	0,99±0,03	161,49±3,25	3,53±0,05	1,12±0,04	22,64±0,44	618,53±14,80	3,92±0,02
ETU13	0,92±0,03	151,70±3,52	3,29±0,04	1,15±0,01	19,90±0,26	597,27±13,22	4,08±0,01
Prosječna vrijednost	0,93 ± 0,09	151,48 ± 14,65	3,34 ± 0,30	1,13 ± 0,02	21,16 ± 1,75	586,40 ± 41,58	4,04 ± 0,11

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Obzirom na udio pojedinačnih spojeva, najzastupljeniji spojevi bili su *trans*-anetol (prosječna vrijednost $586,40 \pm 41,58 \text{ mg mL}^{-1}$) i L-fenhon (prosječna vrijednost $151,48 \pm 14,65 \text{ mg mL}^{-1}$). Slijede α -pinen (prosječna vrijednost $30,16 \pm 4,72 \text{ mg mL}^{-1}$), estragol (prosječna vrijednost $21,16 \pm 1,75 \text{ mg mL}^{-1}$), mircen (prosječna vrijednost $19,15 \pm 1,94 \text{ mg mL}^{-1}$), D-limonen (prosječna vrijednost $13,73 \pm 1,35 \text{ mg mL}^{-1}$), γ -terpinen (prosječna vrijednost $6,15 \pm 0,47 \text{ mg mL}^{-1}$) i kamfen (prosječna vrijednost $5,71 \pm 0,75 \text{ mg mL}^{-1}$), dok su eukaliptol, kamfor, karvon, *p*-anisaldehid, sabinen, β -pinen, α -felandren, α -terpinen, *p*-cimen i *cis*-sabinen hidrat detektirani u udjelima nižim od 5 mg mL^{-1} .

Udio najzastupljenijeg hlapljivog spoja u eteričnom ulju, *trans*-anetola, kretao se u rasponu $513,14 \pm 0,81$ do $647,11 \pm 13,61 \text{ mg mL}^{-1}$. Najviši i najniži udjeli *trans*-anetola dobiveni su pri istom vremenu destilacije koje je iznosilo 40 min. Međutim, najviši udio dobiven je postavljanjem većeg omjera biljnog materijala i vode (1:30), dok je najniži udio dobiven s omjerom 1:10. Nadalje, povećanje vremena destilacije nije utjecalo na povećanje udjela *trans*-anetola u eteričnom ulju. Uz isti omjer biljnog materijala i vode (1:30), primjena vodene destilacije u trajanju od 120 min rezultirala je smanjenjem udjela *trans*-anetola za 1,5 % u odnosu na uzorak koji se destilirao u trostruko kraćem vremenu. Ipak, u uzorcima u kojima je omjer iznosio 1:20 zabilježen je porast udjela *trans*-anetola s povećanjem vremena destilacije. Povećanjem vremena destilacije s 23,4 (ETU12) na 80 min (ETU10), povećan je i udio *trans*-anetola sa $618,53 \pm 14,80$ na $647,11 \pm 13,61 \text{ mg mL}^{-1}$. Međutim, u uzorku ETU11, zabilježen je pad udjela *trans*-anetola na $567,00 \pm 9,88 \text{ mg mL}^{-1}$. Na temelju dobivenih rezultata ovog istraživanja, može se zaključiti kako udio *trans*-anetola u eteričnom ulju raste s povećanjem omjera biljnog materijala i vode. Povećanje vremena destilacije utječe na porast udjela *trans*-anetola pri nižim omjerima, dok pri višim omjerima taj udio pada. U eteričnim uljima, anetol se može pojaviti u *trans* obliku koji je termodinamički stabilniji te u *cis* obliku koji je toksičniji. Isto tako, izomeri anetol i estragol produkti su niza biokemijskih reakcija biljnog metabolizma, a prekursor im je cimetna kiselina zbog čega ova dva hlapljiva spoja imaju sličnu strukturu (Baser i Buchbauer, 2009).

Za razliku od trenda *trans*-anetola, udio D-limonena u eteričnom ulju raste sa smanjenjem omjera biljnog materijala i vode. Za vrijeme destilacije od 80 min, u uzorku ETU10 dobiveno je $14,23 \pm 0,40 \text{ mg mL}^{-1}$ D-limonena, a u uzorku ETU7 $16,71 \pm 0,21 \text{ mg mL}^{-1}$. Nadalje, raspon udjela L-fenhona iznosi $17,10 \pm 0,05$ - $19,07 \pm 0,04 \%$. Najviši udio dobiven je destilacijom od 40 min uz omjer biljnog materijala i vode 1:10 (ETU6). Najniži udio dobiven je duljom destilacijom i većim omjerom biljnog materijala i vode pa je izolacija L-fenhona efikasnija uz kraće vrijeme destilacije i manji omjer biljnog materijala i vode. Isto tako, smanjenjem omjera

biljnog materijala i vode s 1:34,1 na 1:5,9 uz isto vrijeme destilacije (80 min) dobiva se 1,68 % više L-fenhona. Najniži udjeli α -pinena i mircena dobiveni su primjenom destilacije od 40 min uz omjer biljnog materijala i vode 1:30. Povećanjem vremena destilacije na 80 min uz smanjenje omjera biljnog materijala i vode postiže se najefikasnija izolacija ta dva spoja (uzorci ETU1 za mircen i ETU7 za α -pinen). Međutim, smanjenje omjera biljnog materijala i vode nije rezultiralo efikasnijom izolacijom *p*-anisaldehida. Uz vrijeme destilacije od 80 min, smanjenje omjera biljnog materijala i vode s 1:20 na 1:5,9 dovelo je do smanjenja udjela ovog spoja za 0,12 %.

U uzorku ETU7 u kojem je omjer biljnog materijala i vode bio 1:5,9, a vrijeme destilacije 80 min. zabilježen je najviši udio α -pinena, kamfena, α -terpinena, i D-limonena. Nadalje, eterično ulje dobiveno pri ETU1 uvjetima sadrži najviše udjele sabinena, β -pinena, mircena, α -felandrena, *p*-cimena, γ -terpinena, estragola, karvona i *p*-anisaldehida. Vrijeme destilacije za uzorak ETU1 iznosi 80 min, a omjer biljnog materijala i vode 1:20. Može se zaključiti da se provedbom destilacije od 80 min uz manji omjer biljnog materijala i vode dobiva veći udio lako hlapljivih spojeva u eteričnom ulju, ali povećanjem tog omjera uz isto vrijeme destilacije zabilježen je i veći udio srednje i teže hlapljivih spojeva. U uzorku ETU4 zabilježen je najniži udio α -pinena, kamfena, sabinena, β -pinena i mircena pa se može zaključiti da kombinacija niskog vremena destilacije i visokog omjera biljnog materijala i vode ne pogoduje izolaciji lako hlapljivih spojeva iz sjemenki komorača. Isto tako, navedeni spojevi izolirani su u višim koncentracijama u uzorcima s duljim vremenom destilacije.

Prema istraživanju Bedini i sur. (2016), eterično ulje sjemenki komorača iz talijanske pokrajne Arezzo sadrži 78,4 % *trans*-anetola, 8 % estragola, 6,2 % limonena i 3,1 % fenhona. U istom istraživanju, analiziran je kemijski sastav eteričnog ulja sjemenki komorača iz Alžira. U tom je ulju dobiveno 85,5 % estragola, 7,5 % limonena, 3,8 % fenhona i 0,9 % *trans*-anetola. Iako su eterična ulja dobivena istim postupkom izolacije, razlikuju se zbog geografskih i klimatskim uvjeta uzgoja. Također, može se zaključiti da eterično ulje sjemenki komorača karakterizira kemijski polimorfizam. Na kemotip eteričnog ulja utječu klimatski, sezonski i okolišni uvjeti, ali stupanj zrelosti biljke. Mota i sur. (2015) navode kako prema kemijskom sastavu, eterično ulje sjemenki komorača može biti klasificirano u 4 kemotipa: anetol, estragol, anetol/estragol i anetol/fenhon. U ovom istraživanju dobiveno je eterično ulje sjemenki komorača koje se može klasificirati kao anetol kemotip. Bedini i sur. (2016) karakterizirali su ispitivane sjemenke komorača kao anetol te estragol kemotip.

Stefanini i sur. (2006) istraživali su utjecaj stupnja zrelosti i sezonskih uvjeta na kemijski sastav eteričnog ulja sjemenki komorača. Eterično ulje izolirali su postupkom vodene destilacije na

aparaturi po Clevengeru u trajanju od 3 h. Identificirali su α -pinen, mircen, limonen, fenhon, estragol, *trans*-anetol i γ -terpinen u eteričnom ulju dobivenom iz sjemenki uzgojenih u ljetnim mjesecima, dok je eterično ulje sjemenki uzgojenih u jesen sadržavalo i fenhil-acetat. Udio *trans*-anetola u eteričnom ulju rastao je s povećanjem stupnja zrelosti sjemenke, s tim da je najviša vrijednost zabilježena kod sjemenki iz ljetnog uzgoja. Raspon udjela *trans*-anetola u eteričnom ulju sjemenki iz ljetnog uzgoja kretao se između 73,81 i 78,25 %, dok je raspon za sjemenke iz jesenskog uzgoja iznosio 69,67-77,26 %. Sljedeća najzastupljenija komponenta bila je fenhon čiji se raspon udjela kretao između 13,98-15,14 % u ulju sjemenki uzgojenih na ljeto, dok je kod sjemenki iz jesenskog uzgoja uočen pad udjela s porastom stupnja zrelosti, a iznosio je od 4,03-16,98 %. γ -terpinen izoliran je samo iz nezrelih sjemenki u udjelu od 0,57 % (ljetni uzgoj) te 0,56 % (jesenski uzgoj). Rasponi udjela α -pinena, mircena, limonena, estragola i fenhil-acetata bili su sljedeći: 0,29-1,27 %, 0,41-0,95 %, 2,32-6,70 %, 2,45-3,57 % i 3,35-4,35 %. U ovom radu, dobiveno je eterično ulje s višim udjelom α -pinena i mircena, ali s nižim udjelom ostalih komponenata u odnosu na istraživanje Stefanini i sur. (2006) koji su proveli dulju destilaciju pa se u njihovim eteričnim uljima izdvojio viši udio srednje i teže hlapljivih spojeva.

Yamini i sur. (2002) ispitivali su utjecaj različitih metoda izolacije i lokacije uzgoja na kemijski sastav eteričnog ulja sjemenki komorača iz Irana. Identificirali su 16 spojeva iz ulja dobivenog vodenom destilacijom, a 9 spojeva iz ulja dobivenog superkritičnom ekstrakcijom CO₂. Eterično ulje dobiveno vodenom destilacijom od 4 h sadržavalo je 69,1 % *trans*-anetola, 11 % fenhona, 10 % limonena, 4,45 % estragola, 0,96 % *o*-cimena, 0,89 % α -pinena i 0,72 % γ -terpinena. Superkritičnom ekstrakcijom izolirano je 90,4 % anetola, 9,93 % fenhona, 9,78 % limonena i 3,15 % estragola. Autori su usporedili rezultate s istraživanjem Gamiz-Gracia i De Castro (2000) koji su ispitivali kemijski sastav sjemenki komorača iz Španjolske. Identificirali su 10 spojeva, a izolirali su *trans*-anetol, limonen i α -felandren kao najzastupljenije hlapljive spojeve čiji su udjeli iznosili redom 27,93, 21,18 te 7,67 %. Superkritičnom se ekstrakcijom izolirao visok udio *trans*-anetola zbog njegove dobre topljivosti u CO₂ pod utjecajem visokog tlaka i temperature. Međutim, tom se metodom izoliralo manje hlapljivih spojeva zbog moguće degradacije uslijed uvjeta ekstrakcije ili je niži udio spojeva posljedica razlike u geografskom podrijetlu.

Prema Najdoska-Bogdanov i sur. (2015), eterično ulje sjemenki slatkog komorača sadrži 86,3 % *trans*-anetola, 5,12 % estragola, 4,05 % limonena, 0,68 % α -pinena, 0,49 % β -pinena, 1,28 % *o*-cimena, 0,69 % γ -terpinena, 0,50 % fenhona i 0,26 % *p*-anisaldehida. Ulje je dobiveno vodenom destilacijom u trajanju od 3 h. Omjer biljnog materijala i vode bio je 1:10. Autori su

također istraživali utjecaj skladištenja sjemenki komorača na kemijski sastav eteričnog ulja. Zaključili su da se s vremenom smanjuje udio hlapljivih spojeva jer se, zbog enzimske aktivnosti, stvaraju sekundarni nehlapljivi produkti oksidacije. Nakon 5 god. skladištenja sjemenki, udio *trans*-anetola smanjio se na 77 %, a udio *p*-anisaldehida povećao na 4,25 %. Isto tako, zabilježena je prisutnost karvona i karveola, ali i povećan udio fenhona i estragola. Mircen i α -felandren su degradirali, a udio limonena i α -pinena se smanjio. U ovom radu, korištene su usitnjene sjemenke gorkog komorača i kraće vrijeme destilacije pa su udjeli hlapljivih spojeva niži u odnosu na udjele iz rada od Najdoska-Bogdanov i sur. (2015).

U istraživanju koje su proveli Marotti i Piccaglia (1992), analizirano je eterično ulje usitjenih sjemenki gorkog komorača koje je dobiveno vodenom destilacijom od 2 h uz variranje omjera biljnog materijala i vode te vremena destilacije. Izolirani su *trans*-anetol (85,49-86,66 %), fenhon (5,95-6,26 %), limonen (3,92-4,39 %), estragol (1,79-2,45 %), α -pinen (0,35-0,42 %) i mircen (0,21-0,30 %), a u manjim su udjelima identificirani i kamfen, sabinen, β -pinen, α -felandren, *p*-cimen, eukaliptol, γ -terpinen, kamfor i anisaldehyd. U usporedbi s rezultatima njihovog istraživanja, u ovom radu izoliran je niži udio *trans*-anetola i limonena, dok je udio fenhona, α -pinena i mircena viši. Isto tako, eterično ulje sjemenki gorkog komorača sadržavalo je viši udio limonena i fenhona te niži udio *trans*-anetola i estragola u odnosu na eterično ulje sjemenki slatkog komorača. Zaključili su da omjer biljnog materijala i vode nije statistički značajno utjecao na kemijski sastav ulja za razliku od usitnjavanja sjemenki i vremena destilacije. Međutim, povećanje vremena destilacije na 4 h utjecalo je na izolaciju višeg udjela limonena (4,85 %) i fenhona (10,21 %), a nižeg udjela *trans*-anetola (81,86 %). Usitnjavanje sjemenki utjecalo je na povećanje udjela limonena i smanjenje udjela *trans*-anetola. U ovom radu, smanjenje omjera biljnog materijala i vode utječe na porast udjela D-limonena i fenhona te na smanjenje udjela *trans*-anetola. Isto tako, povećanje vremena destilacije utječe na porast udjela *trans*-anetola, ali samo pri nižim omjerima biljnog materijala i vode.

Prema istraživanju Mimica-Dukić i sur. (2003), vrijeme vodene destilacije ima značajan utjecaj na kemijski sastav eteričnog ulja komorača. Međutim, variranje omjera biljnog materijala i vode nije pokazalo značajnu razliku u udjelima hlapljivih spojeva, a najzastupljenije komponente bile su *trans*-anetol (72,2-74,18 %), fenhon (11,32-16,35 %) i estragol (3,87-5,29 %). U ovom radu, u nižim udjelima izolirani su *trans*-anetol i estragol, dok je u višim udjelima izoliran fenhon. Mimica-Dukić i sur. (2003) proveli su dulju destilaciju (6-12 h) koja je rezultirala izolacijom većeg udjela teže hlapljivih spojeva, *trans*-anetola i estragola. Spoj srednje hlapljivosti, fenhon, izoliran je u nižem udjelu zbog potencijalne degradacije uslijed dulje destilacije. U istraživanju Kosar i sur. (2007) ispitala se razlika u kemijskom sastavu

eteričnog ulja usitnjenih i neusitnjenih sjemenki komorača dobivenog vodenom destilacijom tijekom 3 h i vodenom destilacijom potpomognutom mikrovalovima u vremenu 1 h. Usitnjavanje sjemenki rezultiralo je dvostrukim povećanjem udjela limonena u ulju izoliranom vodenom destilacijom potpomognutom mikrovalovima, dok kod ostalih spojeva nije zabilježena značajna razlika u udjelu. Vodenom destilacijom usitnjenih sjemenki izolirano je 4 % limonena, dok se u ovom istraživanju navedeni udio kreće od $1,54 \pm 0,01$ do $1,72 \pm 0,00$ %.

Tablica 5. Udio (%) hlapljivih spojeva po kemijskim skupinama u eteričnom ulju sjemenki komorača

Uzorak	Monoterpeni	Oksidirani monoterpeni	Fenilpropanoidi	Aromatski aldehidi
	p < 0,001*	p < 0,001*	p < 0,001*	p < 0,001*
ETU1	$10,69 \pm 0,04^b$	$18,62 \pm 0,02^c$	$70,15 \pm 0,03^i$	$0,54 \pm 0,00^a$
ETU2	$10,22 \pm 0,03^c$	$18,65 \pm 0,02^c$	$70,60 \pm 0,00^h$	$0,52 \pm 0,01^{abc}$
ETU3	$9,58 \pm 0,03^g$	$18,58 \pm 0,02^{cd}$	$71,35 \pm 0,04^{ef}$	$0,49 \pm 0,00^{cde}$
ETU4	$8,45 \pm 0,03^j$	$18,10 \pm 0,03^e$	$72,94 \pm 0,03^a$	$0,51 \pm 0,00^{bcd}$
ETU5	$10,06 \pm 0,05^d$	$17,72 \pm 0,05^g$	$71,74 \pm 0,10^c$	$0,48 \pm 0,01^{def}$
ETU6	$10,75 \pm 0,05^b$	$19,75 \pm 0,04^a$	$69,05 \pm 0,04^j$	$0,46 \pm 0,00^{fgh}$
ETU7	$10,97 \pm 0,02^a$	$19,42 \pm 0,02^b$	$69,19 \pm 0,03^j$	$0,42 \pm 0,01^i$
ETU8	$9,43 \pm 0,06^h$	$18,49 \pm 0,02^d$	$71,56 \pm 0,04^{cd}$	$0,53 \pm 0,01^{ab}$
ETU9	$9,89 \pm 0,09^e$	$18,65 \pm 0,05^c$	$71,01 \pm 0,13^g$	$0,45 \pm 0,01^{ghi}$
ETU10	$8,94 \pm 0,04^i$	$18,13 \pm 0,04^e$	$72,48 \pm 0,03^b$	$0,45 \pm 0,01^{ghi}$
ETU11	$10,22 \pm 0,05^c$	$17,84 \pm 0,05^f$	$71,46 \pm 0,10^{de}$	$0,49 \pm 0,02^{cde}$
ETU12	$9,74 \pm 0,02^f$	$18,57 \pm 0,05^{cd}$	$71,25 \pm 0,08^f$	$0,44 \pm 0,01^{hi}$
ETU13	$10,07 \pm 0,07^d$	$18,15 \pm 0,05^e$	$71,31 \pm 0,05^{ef}$	$0,47 \pm 0,01^{efg}$

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

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

Dodatno, kako bi se utvrdilo postoje li signifikantne razlike u sastavu eteričnog ulja dobivenog pri različitim parametrima vodene destilacije, provedena je statistička analiza rezultata udjela (%) pojedinih kemijskih skupina u uzorcima eteričnih ulja. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 5, a upućuju na postojanje signifikantnih razlika u sastavu eteričnog ulja obzirom na primijenjene parametre vodene destilacije. U ovom istraživanju izolirano je $8,45 \pm 0,03$ - $10,97$

$\pm 0,02$ % monoterpena, $17,72 \pm 0,05$ - $19,75 \pm 0,04$ % oksidiranih monoterpena, $69,05 \pm 0,04$ - $72,94 \pm 0,03$ % fenilpropanoida i $0,42 \pm 0,01$ - $0,54 \pm 0,00$ % aromatskih aldehida.

Najviši i najniži udio fenilpropanoida dobiveni su primjenom istog vremena destilacije koje je iznosilo 40 min. Međutim, omjer biljnog materijala i vode u uzorku sa signifikantno najvišim udjelom fenilpropanoida iznosio je 1:30 (ETU4), dok je taj omjer bio niži za uzorak ETU6 (1:10) u kojem je zabilježen signifikantno najniži udio ove skupine spojeva. Navedeni zaključci su u korelaciji s udjelima *trans*-anetola koji su prethodno opisani. Nadalje, u uzorku ETU4, izolirano je najviše fenilpropanoida, a najmanje monoterpena. Suprotno, u uzorku ETU6 izolirano je najmanje fenilpropanoida, a najviše oksidiranih monoterpena. Veći udio monoterpena dobiva se primjenom duljeg vremena destilacije i manjeg omjera biljnog materijala i vode, dok je za izolaciju oksidiranih monoterpena učinkovitije kraće vrijeme destilacije uz manji omjer biljnog materijala i vode. Najviši i najniži udio aromatskih aldehida dobiveni su destilacijom od 80 min s tim da je najviši udio dobiven uz veći omjer biljnog materijala i vode (1:20), dok je kod najnižeg udjela taj omjer niži (1:5,9). Može se zaključiti da izolaciji aromatskih aldehida pogoduje primjena duljeg vremena destilacije i većeg omjera biljnog materijala i vode.

Prema istraživanju Mimica-Dukić i sur. (2003), povećanje vremena destilacije sa 6 na 12 h rezultiralo je povećanjem udjela monoterpena, smanjenjem udjela oksidiranih monoterpena, ali i izolacijom dugolančanih ugljikovodika. Udio monoterpena iznosio je 6,19-8,4 %, dok je udio oksidiranih monoterpena bio 11,94-16,80 %. Također je uočen porast fenilpropanoida sa 77,49 % na 79,47 %. U ovom radu, zabilježen je veći udio monoterpena i oksidiranih monoterpena, ali i manji udio fenilpropanoida u svim uzorcima. Razlike u kemijskom sastavu mogu se objasniti kroz primjenu duljeg vremena destilacije u istraživanju Mimica-Dukić i sur. (2003) što je pospješilo izolaciju fenilpropanoida koji su teže hlapljivi spojevi u odnosu na ostale spojeve iz tog istraživanja.

Rezultati istraživanja Kosar i sur. (2007) pokazali su da je za efikasniju izolaciju oksidiranih spojeva pogodna dulja vodena destilacija neusitnjenih sjemenki ili destilacija usitnjenih sjemenki u kraćem vremenu. Naime, oksidirani spojevi, koji se izoliraju kasnije u odnosu na ugljikovodike, imaju veći afinitet za vezanje vode. Prilikom zagrijavanja, biljni materijal se omekšava i to omogućuje lakšu izolaciju oksidiranih komponenata koje hlape zajedno s vodenom parom. No, ukoliko se primjenjuje destilacija u kraćem vremenu, izolacija ovih komponenata je efikasnija ako se sjemenke usitne. Zbog navedenih svojstava, vodena destilacija predstavlja bolji izbor za metodu izolacije oksidiranih monoterpena.

Ahmad i sur. (2018) analizirali su kemijski sastav eteričnog ulja sjemenki slatkog komorača. Ulje je dobiveno metodom vodene destilacije u trajanju od 180 min. Prema njihovim rezultatima, eterično ulje sadrži 6,20 % monoterpena, 11,40 % oksidiranih monoterpena, 74,37 % fenilpropanoide te 7,89 % ostalih spojeva. U ovom radu dobiven je niži udio fenilpropanoide i ostalih spojeva, ali viši udio monoterpena i oksidiranih monoterpena. Također, svi su se uzorci destilirali u vremenu kraćem od 180 min. Razlike u udjelima mogu biti rezultat analiziranja različitih varijeteta komorača, lokacije uzgoja ili kultivacije biljke.

Hassan i Elhassan (2017) izolirali su eterično ulje iz sjemenki komorača postupkom vodene destilacije u trajanju od 4 h. Komorač je uzgojen u Sudanu. U dobivenom ulju, izolirano je 98,06 % monoterpena od čega je 80,67 % spadalo u skupinu oksidiranih monoterpena. Osim toga, izolirali su i 0,66 % seskviterpena. Bedini i sur. (2016) izolirali su 86,5 % fenilpropanoide, 9,2 % monoterpena i 4,2 % oksidiranih monoterpena iz sjemenki komorača kemotipa anetol. Slične vrijednosti dobivene su analizom eteričnog ulja kemotipa estragol koje je sadržavalo 86,4 % fenilpropanoide, 7,9 % monoterpena i 4,7 % oksidiranih monoterpena. U ovom istraživanju dobiveni je niži udio fenilpropanoide, ali i viši udio monoterpena i oksidiranih monoterpena.

4.4. UTJECAJ PARAMETARA VODENE DESTILACIJE NA PRINOS ETERIČNOG ULJA

Obzirom da prinos predstavlja jedan od ključnih faktora proizvodnog procesa, statistički je ispitan utjecaj parametara vodene destilacije (omjer biljnog materijala i vode te vrijeme destilacije) na prinos eteričnog ulja sjemenki komorača te je provedeno optimiranje tih parametara u svrhu postizanja maksimalnog prinosa eteričnog ulja.

Signifikantnost utjecaja omjera biljnog materijala i vode te vremena destilacije na prinos eteričnog ulja ispitana je metodom ANOVA, a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 6.

Tablica 6. Utjecaj parametara vodene destilacije na prinos (%) eteričnog ulja sjemenki komorača

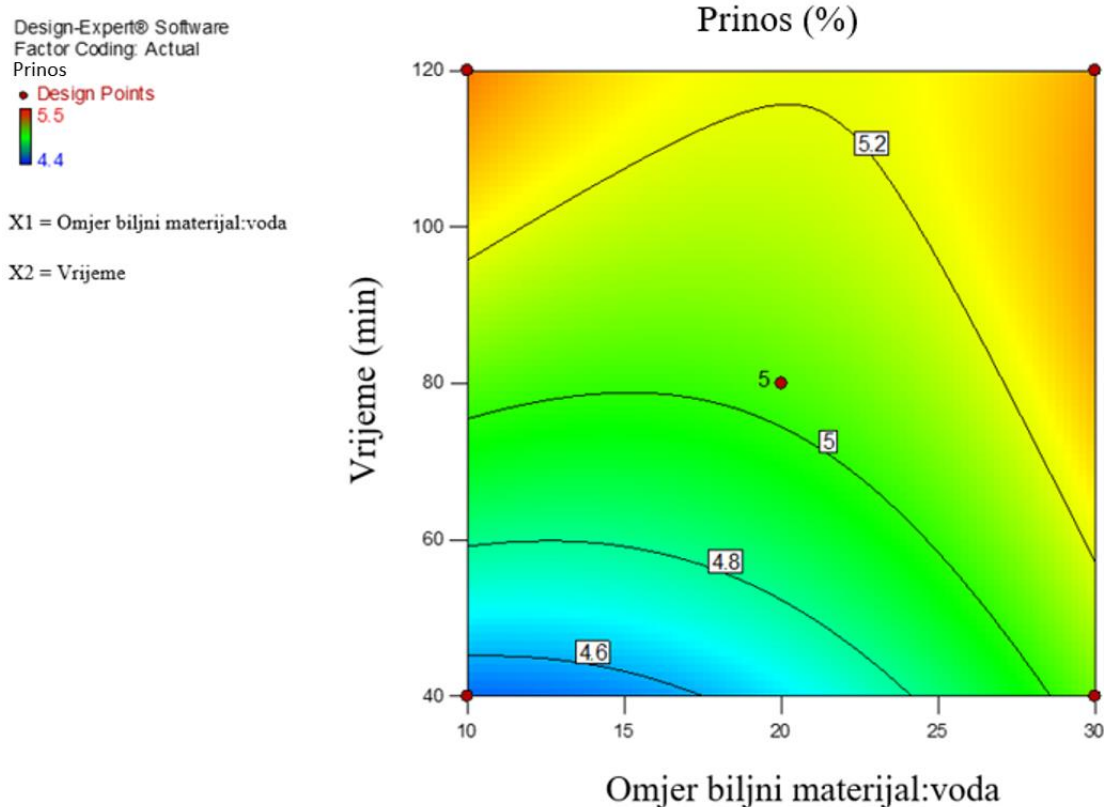
Izvor varijacije	Prinos (%)	
	F-omjer	p-vrijednost
X ₁	19,635	0,001*
X ₁ ²	8,557	0,022*
X ₂	12,170	0,010*
X ₂ ²	10,538	0,014*
X ₁ X ₂	8,362	0,023*
Nedostatak modela	5,781	0,062
R ²	0,933	
Model	3,6300955813331 – 0,0032291477374184X ₁ + 0,001150625X ₁ ² + 0,027112342167691X ₂ – 0,000079804687499998X ₂ ² – 0,000375X ₁ X ₂	

X₁-omjer biljnog materijala i vode, X₂-vrijeme destilacije

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

Temeljem dobivenih rezultata, omjer biljnog materijala i vode te vrijeme destilacije imali su statistički značajan utjecaj na prinos eteričnog ulja sjemenki komorača, kao i kombinacija tih dvaju parametara.

Utjecaj kombinacije oba parametra na prinos eteričnog ulja prikazan je na Slici 9. Može se zaključiti kako se prinos eteričnog ulja povećava s dužim trajanjem destilacije za sve ispitivane omjere biljnog materijala i vode, gdje se najviši prinosi postižu pri omjeru 1:10 i 1:30 uz 120 min destilacije. Isto tako, vidljivo je da se veći prinos eteričnog ulja može postići i u kraće vrijeme destilacije ukoliko se ujedno poveća omjer biljnog materijala i vode. Dakle, pri kraćem vremenu trajanja destilacije, prinos eteričnog ulja raste s povećanjem omjera biljnog materijala i vode. Međutim, pri duljem vremenu destilacije, uočeno je smanjenje prinosa ulja ukoliko je omjer biljnog materijala i vode manji od 1:20, ali se porastom omjera ponovno može očekivati veći prinos ulja. Također se može zaključiti da je za postizanje većeg prinosa ulja pri nižim omjerima biljnog materijala i vode potrebno dulje trajanje vodene destilacije, dok se veći prinos eteričnog ulja s manjim omjerom biljnog materijala i vode postigne u kraćem vremenskom periodu.



Slika 9. Utjecaj omjera biljnog materijala i vode te vremena destilacije na prinos eteričnog ulja sjemenki komorača

Mimica-Dukić i sur. (2003) proveli su slično istraživanje u kojem su varirali vrijeme vodene destilacije te omjer biljnog materijala i vode za izolaciju eteričnog ulja iz sjemenki komorača. Prinos ulja iznosio je 2,82-3,38 % što je niže od dobivenih vrijednosti u ovom radu. Međutim, sukladno rezultatima dobivenim u ovom radu, autori su zaključili da se prinos eteričnog ulja povećava uz manji omjer biljnog materijala i vode te duže vrijeme destilacije. Sintim i sur. (2015) istraživali su eterično ulje sjemenki kopra (*Anethum graveolens* L.), pripadnika obitelji *Apiaceae*. Proveli su postupak vodene destilacije u trajanju od 195 min, a tijekom postupka destilacije određivali su prinos sakupljenog ulja nakon određenih vremenskih perioda. Zaključili su da se 23,28 % od ukupnog eteričnog ulja izoliralo u prve 2 min destilacije, 51,53 % eteričnog ulja izoliralo se od 2. do 75. min, 9,77 % od 75. do 135. min, a preostalih 2,44 % tijekom zadnjih 60 min destilacije.

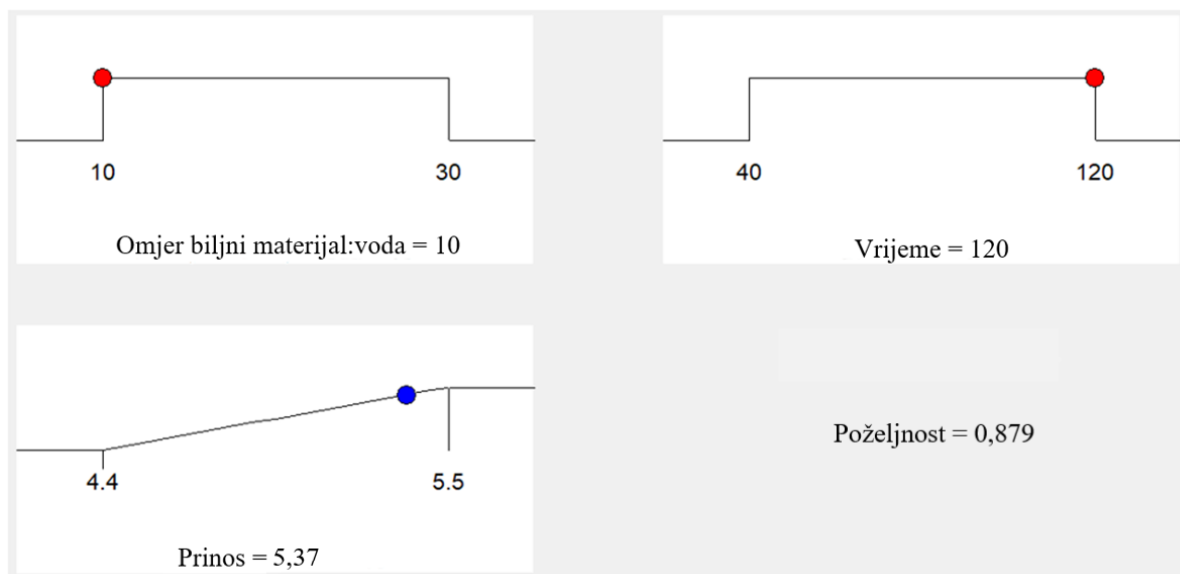
Prema istraživanju Saharkhiz i Tarakeme (2011), razlike u prinosu eteričnog ulja mogu biti povezane sa stupnjem zrelosti sjemenki komorača. Navedeni autori određivali su prinos eteričnog ulja dobivenog vodenom destilacijom na aparaturi po Clevengeru, a vrijeme destilacije iznosilo je 3 h. Vrijednosti prinosa eteričnog ulja za nezrele, srednje zrele i zrele sjemenke komorača iznosile su 1,31, 1,18 i 1,26 %. Anwar i sur. (2009b) dobili su nešto veće vrijednosti koje su iznosile 2,8 % za nezrele i 3,5 % za zrele sjemenke. Navedeni rezultati niži su od rezultata dobivenih u ovom radu u kojem su se ispitivale zrele sjemenke, a mogući razlozi su geografsko porijeklo, vrijeme destilacije, klimatski uvjeti i vrsta tla.

Hammouda i sur. (2014) istraživali su sjemenke divljeg gorkog komorača (podvrsta *piperitum*) i ispitivali utjecaj tehnike izolacije na prinos eteričnog ulja. Proveli su vodenu destilaciju na aparaturi po Clevengeru u trajanju od 3 h, ekstrakciju superkritičnim CO₂ koja je također trajala 3 h te vodenu destilaciju potpomognutu mikrovalovima u trajanju od 60 min. Najveći prinos eteričnog ulja dobiven je mikrovalnom ekstrakcijom (2,28 %), a najniži vodenom destilacijom (0,98 %). Ekstrakcijom superkritičnim CO₂ dobiveno je 2,2 % eteričnog ulja. Košar i sur. (2007) proveli su izolaciju eteričnog ulja iz sjemenki komorača uzgojenih u Turskoj. Koristili su vodenu destilaciju na aparaturi po Clevengeru i vodenu destilaciju potpomognutu mikrovalovima. Također, ispitivali su i utjecaj usitnjavanja sjemenki na prinos ulja. Prema njihovim rezultatima, prinos eteričnog ulja dobiven vodenom destilacijom bio je isti za cijele i usitnjene sjemenke, a iznosi 1,9 %. Prinosi ulja dobiveni vodenom destilacijom potpomognutom mikrovalovima niži su od prethodno navedenih i iznose 1,2 % za cijele sjemenke i 1,6 % za usitnjene sjemenke. Može se zaključiti da veću efikasnost na izolaciju ulja iz cijelih i usitnjenih sjemenki ima vodena destilacija. Isto tako, vodena se destilacija provodila trostruko duže od destilacije potpomognute mikrovalovima, što je moglo doprinijeti duljem zagrijavanju biljnog materijala i boljem oslobađanju hlapljivih komponenti iz istog.

Marotti i Piccaglia (1992) ispitivali su prinos eteričnog ulja sjemenki komorača iz pokrajne Emilia Romagna u Italiji. Istraživali su utjecaj sljedećih parametara: omjer biljnog materijala i vode, varijetet sjemenke komorača i stupanj usitnjavanja sjemenke. Vrijeme vodene destilacije na aparaturi po Clevengeru iznosilo je 120 min. Veći prinos ulja zabilježen je pri manjem omjeru biljnog materijala i vode (1:6,67) u odnosu na veći omjer (1:20) za sve ispitivane varijetete i stupnjeve usitnjavanja. Najveći prinos ulja imali su uzorci sjemenki gorkog komorača, a prinos se kretao u rasponu 1,83-2,83 %. Prinos je rastao sa stupnjem usitnjavanja sjemenki, a taj trend je zabilježen i u ostalim varijetetima. Raspon prinosa eteričnog ulja sjemenki slatkog komorača iznosio je 1,50-2,20 %, dok je taj raspon bio niži za sjemenke fiorentinskog komorača (1,33-2,17 %). U ovom radu, uzorak ETU4 imao je iste uvjete izolacije

(Tablica 1) kao i uzorak sjemenki gorkog komorača s omjerom otapala 1:6,67. Iako je na uzorku ETU4 provedena vodena destilacija u trajanju od 40 min, dobiveno je $5,10 \pm 0,03$ % eteričnog ulja, što je gotovo dvostruko više od prinosa kojeg su dobili Marotti i Piccaglia (1992).

U Tablici 6 prikazana je jednadžba regresijskog modela uz pripadajući koeficijent determinacije (R^2) i vrijednost nedostataka modela (eng. *lack of fit*). Jednadžba regresijskog modela omogućuje predviđanje prinosa eteričnog ulja za svaku vrijednost omjera biljnog materijala i vode te vremena destilacije, dok pripadajući R^2 pokazuje kolika je preciznost modela. Što je njegova vrijednost bliža 1 to je model precizniji. Sukladno tome, dobivena R^2 vrijednost (0,933) ukazuje na vrlo dobru točnost modela. Također, valjanost modela potvrđena je i vrijednošću nedostatka modela koja nije bila statistički značajna (Tablica 6).



Slika 10. Rezultati optimiranja parametara vodene destilacije za izolaciju eteričnog ulja sjemenki komorača

Na Slici 10 prikazani su rezultati optimiranja parametara vodene destilacije za izolaciju eteričnog ulja sjemenki komorača prema metodi poželjnosti. Optimalni omjer biljnog materijala i vode za vodenu destilaciju sjemenki komorača je 1:10, dok optimalno vrijeme vodene destilacije iznosi 120 min. Uvrštavanjem ovih vrijednosti parametara u jednadžbu regresijskog modela predviđa se prinos eteričnog ulja od 5,37 %. Provedbom izolacije eteričnog ulja vodenom destilacijom pri optimalnim parametrima dobiven je eksperimentalni prinos eteričnog ulja od 5,50 % što je u skladu s vrijednostima predviđenim modelom.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Tijekom optimiranja procesa vodene destilacije za izolaciju eteričnog ulja sjemenki komorača određen je prinos u rasponu $4,40 \pm 0,07$ do $5,50 \pm 0,01$ %. Signifikantno najviši prinos eteričnog ulja određen je u uzorku u kojem je korišten omjer biljnog materijala i vode 1:10, a vrijeme destilacije iznosilo je 120 min. Signifikantno najniži prinos zabilježen je u uzorku gdje se vodena destilacija provodila 23,5 min uz omjer biljnog materijala i vode 1:20. Rezultati su pokazali da se viši prinos eteričnog ulja sjemenki komorača postiže duljim vremenom destilacije.
2. Primjenom GC-MS analize u svim uzorcima eteričnog ulja sjemenki komorača identificirano je ukupno 18 spojeva iz skupine monoterpena (α -pinen, kamfen, sabinen, β -pinen, mircen, α -felandren, α -terpinen, *p*-cimen, D-limonen, γ -terpinen i *cis*-sabinen hidrat), oksidiranih monoterpena (eukaliptol, L-fenhon, kamfor i karvon), fenilpropanoida (estragol i *trans*-anetol) i aromatskih aldehda (*p*-anisaldehid).
3. Najzastupljeniji hlapljivi spojevi eteričnog ulja sjemenki komorača bili su fenilpropanoidi (prosječna vrijednost 71,09 %), a slijede oksidirani monoterpeni (prosječna vrijednost 18,51 %) i monoterpeni (prosječna vrijednost 9,92 %) dok su aromatski aldehidi prisutni u najnižem udjelu (prosječna vrijednost 0,48 %).
4. Najzastupljeniji pojedinačni hlapljivi spojevi bili su *trans*-anetol (prosječna vrijednost $586,40 \pm 41,58$ mg mL⁻¹) i L-fenhon (prosječna vrijednost $151,48 \pm 14,65$ mg mL⁻¹). Slijede α -pinen (prosječna vrijednost $30,16 \pm 4,72$ mg mL⁻¹), estragol (prosječna vrijednost $21,16 \pm 1,75$ mg mL⁻¹), mircen (prosječna vrijednost $19,15 \pm 1,94$ mg mL⁻¹), D-limonen (prosječna vrijednost $13,73 \pm 1,35$ mg mL⁻¹), γ -terpinen (prosječna vrijednost $6,15 \pm 0,47$ mg mL⁻¹) i kamfen (prosječna vrijednost $5,71 \pm 0,75$ mg mL⁻¹), dok su eukaliptol, kamfor, karvon, *p*-anisaldehid, sabinen, β -pinen, α -felandren, α -terpinen, *p*-cimen i *cis*-sabinen hidrat detektirani u udjelima nižim od 5 mg mL⁻¹.

5. Rezultati statističke analize pokazali su signifikantne razlike u sastavu eteričnog ulja sjemenki komorača obzirom na primijenjene parametre vodene destilacije. Najviši i najniži udio fenilpropanoida dobiveni su destilacijom od 40 min. Omjer biljnog materijala i vode u uzorku sa signifikantno najvišim udjelom fenilpropanoida iznosio je 1:30, dok je taj omjer iznosio 1:10 za uzorak u kojem je zabilježen signifikantno najniži udio ove skupine spojeva. Veći udio monoterpena dobiven je primjenom duljeg vremena destilacije uz manji omjer biljnog materijala i vode, dok je za izolaciju oksidiranih monoterpena učinkovitije kraće vrijeme destilacije i manji omjer biljnog materijala i vode. Izolaciji aromatskih aldehida pogoduje primjena duljeg vremena destilacije uz veći omjer biljnog materijala i vode.

6. Omjer biljnog materijala i vode te vrijeme destilacije imali su statistički značajan utjecaj na prinos eteričnog ulja sjemenki komorača, kao i kombinacija tih dvaju parametara. Provedenim optimiranjem definirani su sljedeći optimalni parametri za dobivanje maksimalnog prinosa eteričnog ulja sjemenki komorača postupkom vodene destilacije: omjer biljnog materijala i vode 1:10 te vrijeme vodene destilacije 120 min.

6. LITERATURA

Abdellaoui, M., Kasrati, A., El Rhaffari, L. (2017) The effect of domestication on seed yield, essential oil yield and antioxidant activities of fennel seed (*Foeniculum vulgare* Mill) grown in Moroccan oasis. *J. Assoc. Arab Univ. Basic Appl. Sci.* **24**, 107-114. doi:10.1016/j.jaubas.2017.06.005

Ahmad, B. S., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., Cerny, M., Kanaan, H., ... Merah, O. (2018) Fennel oil and by-products seed characterization and their potential applications. *Ind. Crops Prod.* **111**, 92-98. doi:10.1016/j.indcrop.2017.10.008

Alexandrovich, I., O. Rakovitskaya, E. Kolmo, E. Sidorova, and S. Shushunov (2003) The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed oil emulsion in infantile colic: A randomised, placebo controlled study. *Altern. Ther.* **9**, 58–61.

Al-Snai, A. E., Mousa, H. M., Majid, W. J. (2019). Medicinal plants possessed hepatoprotective activity. *J. Pharm.* **9(8)**, 26-56.

Anwar, F., Ali, M., Hussain, A. I., Shahid, M. (2009a) Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour Fragr. J.* **24(4)**, 170-176. doi:10.1016/j.indcrop.2012.10.012

Anwar, F., Hussain, A. I., Sherazi, S. T. H., Bhangar, M. I. (2009b) Changes in composition and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruit at different stages of maturity. *J. Herbs Spices Med. Plants.* **15(2)**, 187-202. doi:10.1080/10496470903139488

Aprotosoae, A. C., Hancianu, M., Poiata, A. (2008) In vitro antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Foeniculum vulgare* Mill. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* **112**, 832–836.

Badgujar, S. B., Patel, V. V., Bandivdekar, A. H. (2014) *Foeniculum vulgare* Mill: a review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *Biomed Res. Int.* **2014**, 5-10. [doi:10.1155/2014/842674](https://doi.org/10.1155/2014/842674)

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem. Toxicol.* **46(2)**, 446-475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106

Balbino, S., Repajić, M., Obranović, M., Medved, A. M., Tonković, P., Dragović-Uzelac, V. (2021) Characterization of lipid fraction of Apiaceae family seed spices: Impact of species and extraction method. *J.Appl.Res.Med.Aromat.Plants.* **25**, 3-7. [doi:10.1016/j.jarmap.2021.100326](https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100326)

Baser, K. H. C., Buchbauer, G. (2009) Handbook of essential oils: science, technology, and applications, CRC press, Boca Raton, str. 316-333.

Başer, K. H. C., Demirci, F. (2007) Chemistry of essential oils. U: Fragrance and Flavours, (Berger, R.G., ured.) Chemistr, Bioprocessing and Sustainability, 1.izd., Springer, Leipzig, str. 176-180.

Bedini, S., Bougherra, H. H., Flamini, G., Cosci, F., Belhamel, K., Ascriczzi, R., Conti, B. (2016) Repellency of anethole-and estragole-type fennel essential oils against stored grain pests: the different twins. *Bull. Insectol.* **69(1)**, 149-57.

Behl, T., Rocchetti, G., Chadha, S., Zengin, G., Bungau, S., Kumar, A., ... Montesano, D. (2021) Phytochemicals from Plant Foods as Potential Source of Antiviral Agents: An Overview. *Pharmaceuticals.* **14(4)**, 381. doi:10.3390/ph14040381

Ben, Abdesslem, S., Boulares, M., Elbaz, M., Ben Moussa, O., St-Gelais, A., Hassouna, M., Aider, M. (2021) Chemical composition and biological activities of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) essential oils and ethanolic extracts of conventional and organic seeds. *J. Food Process. Preserv.* **45(1)**, 4-13. doi:10.1111/jfpp.15034

Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3(1)**, 32-47.

- Bukhari, H., Shehzad, A., Saeed, K., Sadiq, B. M., Tanveer, S., Iftikhar, T. (2014) Compositional profiling of fennel seed. *Pak. J. Food Sci.* **24(3)**, 132-6.
- Burčul, F., Blažević, I., Radan, M., Politeo, O. (2020) Terpenes, phenylpropanoids, sulfur and other essential oil constituents as inhibitors of cholinesterases. *Curr. Med. Chem.* **27(26)**, 4297-4343. doi:10.2174/0929867325666180330092607
- Chouhan, S., Sharma, K., Guleria, S. (2017) Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines.* **4(3)**, 58. doi:10.3390/medicines4030058
- de Groot, A. C., Schmidt, E. (2016) Essential oils, part III: chemical composition. *Dermatitis*, **27(4)**, 161-169. doi:10.1097/DER.000000000000193
- Diao, W. R., Hu, Q. P., Zhang, H., Xu, J. G. (2014) Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food control.* **35(1)**, 109-116. doi:10.1016/j.foodcont.2013.06.056
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S., Wang, L. (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* **3(5)**, 371-390. doi:10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x
- El-Awadi, M. E., Hassan, E. A. (2010) Physiological Responses of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) Plants to Some Growth Substances: The Effect of Certain Amino Acids and a Pyrimidine Derivative. *J. Am. Sci.* **6(7)**, 120-125.
- European Pharmacopoeia 6.0 (2008) European Directorate for the Quality of Medicine, Council of Europe, Strassbourg, France.
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., Talalay, P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry.* **56**, 5–51. doi:10.1016/S0031-9422(00)00316-2
- Faten, A. E., Farag, M., Hanan, A. K. (2011) Chemical analysis of fennel seeds, basil leaves and their essential oil contents. *J. Biol. Chem. Environ. Sci.* **6(2)**, 127-145.

Filly, A., Fabiano-Tixier, A. S., Louis, C., Fernandez, X., Chemat, F. (2016) Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers. *C. R. Chim.* **19(6)**, 707-717. doi:10.1016/j.crci.2016.01.018

Gamiz-Gracia, L., De Castro, M. L. (2000) Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta.* **51(6)**, 1179-1185. doi:10.1016/S0039-9140(00)00294-0

Ghasemian, A., Al-Marzoqi, A. H., Mostafavi, S. K. S., Alghanimi, Y. K., Teimouri, M. (2020) Chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of *Foeniculum vulgare* Mill essential oils. *J. Dig. Cancer Rep.* **51(1)**, 260-266. doi:10.1007/s12029-019-00241-w

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

Hammer, K.A., Carson, C. F., Riley, T. V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 985–990. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x

Hammouda, F. M., Saleh, M. A., Abdel-Azim, N. S., Shams, K. A., Ismail, S. I., Shahat, A. A., Saleh, I. A. (2014) Evaluation of the essential oil of *Foeniculum vulgare* Mill (fennel) fruits extracted by three different extraction methods by GC/MS. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **11(2)**, 277-279. doi:10.4314/ajtcam.v11i2.8

Handa, S. S. (2008) An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. U: Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, (Swami, S., Singh, K. S. P., Longo, G., Dutt, D., ured.), United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, Trst, str. 42-133.

Hassan, O. M., Elhassan, I. A. (2017) Characterization of essential oils from fruits of umbelliferous crop cultivated in Sudan II. *Coriandrum sativum* L.(Coriander) and *Foeniculum vulgare* Mill (Fennel). *J. Pharmacogn. Phytochem.* **6(1)**, 113-116.

- He, W., Huang, B. (2011) A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice: *Foeniculum vulgare*. *J. Med. Plant Res.* **5(16)**, 3595-3600.
- Janssen, A.M., Scheffer, J. J. C., Baerheim Svendsen, A. (1987) Antimicrobial activity of essential oils: a 1976–1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Med.* **53**, 396–398. doi:10.1055/s-2006-962755
- Kalemba, D., Kunicka, A. (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10(10)**, 813-829. [doi:10.2174/0929867033457719](https://doi.org/10.2174/0929867033457719)
- Kalođera, Z., Blažević, N., Salopek, N., Jurišić, R. (1998) Eterična ulja (aetherolea). *Farmaceutski glasnik*, **54(6)**, 195-210.
- Khuri, A. I., Mukhopadhyay, S. (2010) Response surface methodology. *Wiley Comput. Stat.* **2**, 128-149. doi:10.1002/wics.73
- Koşar, M., Özek, T., Kürkçüođlu, M., Başer, K. H. C. (2007) Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and hydrodistillation methods for the fruit essential oils of *Foeniculum vulgare*. *J. Essent. Oil Res.* **19(5)**, 426-429. doi:10.1080/10412905.2007.9699943
- Koul, O., Walia, S., Dhaliwal, G. S. (2008) Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides international*. **4(1)**, 63-84.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J. E. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 453–462. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x
- Marčetić, M., Kovačević, N., Lakušić, D., Lakušić, B. (2017) Habitat-related variation in composition of the essential oil of *Seseli rigidum* Waldst. & Kit.(Apiaceae). *Phytochemistry*. **135**, 80-92. doi:10.1016/j.phytochem.2016.12.004

- Marotti, M., Piccaglia, R. (1992) The Influence of Distillation Conditions on the Essential Oil Composition of Three Varieties of *Foeniculum vulgare* Mill. *J. Essent. Oil Res.* **4(6)**, 569-576. doi:10.1080/10412905.1992.9698137
- Marriott, P. J., Shellie, R., Cornwell, C. (2001) Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J. Chromatogr. A.* **936(1-2)**, 1-22. doi:10.1016/S0021-9673(01)01314-0
- Masako, K., Hideyuki, I., Shigeyuki, O., Zenro, I. (2005) A novel method to control the balance of skin microflora: Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. *J. Dermatol. Sci.* **38(3)**, 197-205. doi:10.1016/j.jdermsci.2005.01.006
- Matthäus, B., Musazcan Özcan, M. (2015) Oil content, fatty acid composition and distributions of vitamin-E-active compounds of some fruit seed oils. *Antioxidants.* **4(1)**, 124-133. doi:10.3390/antiox4010124
- Medved, A. M., Tonković, P. (2020) Kemijski sastav nehlapljivih ulja začinskih sjemenki: utjecaj vrste sjemenki i metode ekstrakcije. Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu, rad za Rektorovu nagradu.
- Mimica-Dukic, N., Kujundzic, S., Sokovic, M., Couladis, M. (2003) Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytother.Res.* **17**, 368. doi:10.1002/ptr.1159
- Mohammed, M. S. A., Tawfik, M. S. H., Ibrahim, A. E. G. (2019) Influence of two extraction methods on essential oils of some Apiaceae family plants. *Egypt. Pharm. J.* **18(2)**, 160. doi:10.4103/epj.epj_25_18
- Morris, J. A., Khettry, A., Seitz, E. W. (1979) Anti-microbial activity of aroma chemicals and essential oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **56**, 595–603. doi:10.1007/BF02660245
- Mota, A., Martins, M. R., Arantes, S., Lopes, V., Bettencourt, E., Pombal, S., ... Silva, L. (2015) Antimicrobial Activity and Chemical Composition of the Essential Oils of

Portuguese *Foeniculum vulgare* Fruits. *Nat. Prod. Commun.* **10(4)**, 673-676.
doi:10.1177/1934578X1501000437

Najdoska-Bogdanov, M., Bogdanov, J. B., Stefova, M. (2016) Changes in Volatile Compounds During Aging of Sweet Fennel Fruits-Comparison of Hydrodistillation and Static Headspace Sampling Methods. *Nat. Prod. Commun.* **11(3)**, 423-429.
doi:10.1177/1934578X1601100326

Ostad, S.N., Soodi, M., Sharifzadeh, M., Khorsidi, N. (2001) The effect of fennel essential oil on uterine contraction as a model for dysmenorrhoea, pharmacology and toxicology study. *J. Ethnopharmacol.* **76**, 299–304. doi:10.1016/S0378-8741(01)00249-5

Pepeljnjak, S., Kozarić, Z. (2019) Začini: Mikrobi, antimikrobna svojstva i primjena, Medicinska naklada, Zagreb, str. 60-203.

Portincasa, P., Bonfrate, L., Scribano, M. L., Kohn, A., Caporaso, N., Festi, D., Gasbarrini, A. (2016) Curcumin and Fennel Essential Oil Improve Symptoms and Quality of Life in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *J. Gastrointestin. Liver Dis.* **25(2)**, 152-156.
[doi:10.15403/jgld.2014.1121.252.ccm](https://doi.org/10.15403/jgld.2014.1121.252.ccm)

Pourmortazavi, S.M., Hajimirsadeghi, S.S. (2007) Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A.* **1163**, 2–24.
doi:10.1016/j.chroma.2007.06.021

Putnik, P., Barba, F. J., Lucini, L., Rocchetti, G., Montesano, D. (2019) Conventional, non-conventional extraction techniques and new strategies for the recovery of bioactive compounds from plant material for human nutrition. *Food Res. Int.* **123**, 516-517.
doi:10.1016/j.foodres.2019.05.010

Raghavan, S. (2006) Handbook of Spices, Seasoning and Flavourings, 2. izd., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, New York, str. 62- 186.

Ramezani, S., Saharkhiz, M. J., Ramezani, F., Fotokian, M. H. (2008) Use of essential oils as bioherbicides. *J. Essent. Oil Bear. Plants.* **11(3)**, 319-327. doi:10.1080/0972060X.2008.10643636

Raveau, R., Fontaine, J., Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2020) Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review. *Foods*, **9**, 365. doi:10.3390/foods9030365

Sadgrove, N., Jones, G. (2015) A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. *Agriculture.* **5(1)**, 48–102. doi:10.5897/JMPR.9000022

Sadgrove, N., Jones, G. L., Greatrex, B.W. (2014) Isolation and characterisation of (–)-genifural: The principal antimicrobial component in traditional smoking applications of *Eremophila longifolia* (Scrophulariaceae) by Australian Aboriginal peoples. *J. Ethnopharmacol.* **154**, 758–766. doi:10.1016/j.jep.2014.05.003

Saharkhiz, M. J., Tarakeme, A. (2011) Essential oil content and composition of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) fruits at different stages of development. *J. Essent. Oil Bear. Plants.* **14(5)**, 605-609. doi:10.1080/0972060X.2011.10643978

Shahat, A. A., Ibrahim, A. Y., Hendawy, S. F., Omer, E. A., Hammouda, F. M., Abdel-Rahman, F. H., Saleh, M. A. (2011) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules.* **16(2)**, 1366-1377. doi:10.3390/molecules16021366

Sintim, H. Y., Burkhardt, A., Gawde, A., Cantrell, C. L., Astatkie, T., Obour, A. E., ... Schlegel, V. (2015) Hydrodistillation time affects dill seed essential oil yield, composition, and bioactivity. *Ind. Crops Prod.* **63**, 190-196. doi:10.1016/j.indcrop.2014.09.058

Soylu, E. M., Incekara, R. (2017) Biofungicidal activities of plant essential oils against cucumber root and stem rot disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. *J. Plant Pathol.* **2017**, 437-444. doi:10.4454/jpp.v99i2.3889

Stefanini, M. B., Ming, L. C., Marques, M. O. M., Facanali, R., Meireles, M. A. A., Moura, L. S., ... Sousa, L. A. (2006) Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, **8**, 193-198.

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

Tanveer, M., Wagner, C., ul Haq, M. I., Ribeiro, N. C., Rathinasabapathy, T., Butt, M. S., Komarnytsky, S. (2020) Spicing up gastrointestinal health with dietary essential oils. *Phytochem. Rev.* **19(2)**, 243-263. doi:10.1007/s11101-020-09664-x

Telci, I., Demirtas, I., Sahin, A. (2009) Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. *Ind. Crops Prod.* **30(1)**, 126-130. doi:10.1016/j.indcrop.2009.02.010

Telci, I., Toncer, O.G., Sahbaz, N. Yield (2006) Essential oil content and composition of *Coriandrum sativum* cultivars (var. *vulgare* Alef. and var. *microcarpum* DC.) grown in two different locations. *J. Essent. Oil Res.* **18**, 189-193. doi:10.1080/10412905.2006.9699063

Tognolini, M., Ballabeni, V., Bertoni S., Bruni R., Impicciatore, M., Barocelli, E. (2007) Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. *Pharmacol. Res.* **56(3)**, 254–260. doi:10.1016/j.phrs.2007.07.002

Tongnuanchan, P. Benjakul, S. (2014) Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *J. Food Sci.* **79**, 1231–1249. doi:10.1111/1750-3841.12492

Turek, C., Stintzing, F. C. (2013) Stability of essential oils: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **12(1)**, 40-53. doi:10.1111/1541-4337.12006

USDA (2019) Spices, fennel seed. USDA - U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service, Washington, <<https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171323/nutrients>> . Pristupljeno 27. svibnja 2021

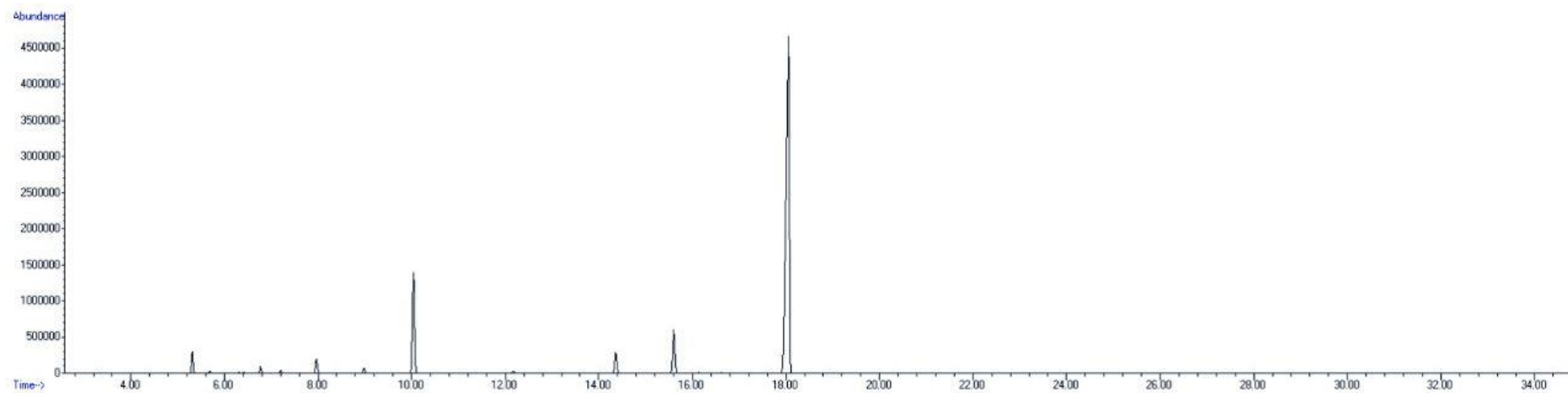
Vinceković, M., Jurić, S., Vlahoviček-Kahlina, K., Vugrinec, B., Lemić, D. (2020) Primjena inkapsuliranih eteričnih ulja u suzbijanju štetnih organizama. *Glasilo biljne zaštite*. **20(6)**, 584-606.

Wiwattanarattanabut, K., Choonharuangdej, S., Srithavaj, T. (2017) In vitro anti-cariogenic plaque effects of essential oils extracted from culinary herbs. *J. clin. diagn.* **11(9)**, 30-35. doi: 10.7860/JCDR/2017/28327.10668

Yamini, Y., Sefidkon, F., Pourmortazavi, S. M. (2002) Comparison of essential oil composition of Iranian fennel (*Foeniculum vulgare*) obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Flavour Fragr. J.* **17(5)**, 345-348. doi:10.1002/ffj.1117

Yip, Y. B., Tam, A. C. Y. (2008) An experimental study on the effectiveness of massage with aromatic ginger and orange essential oil for moderate-to-severe knee pain among the elderly in Hong Kong. *Complement. Ther. Med.* **16(3)**, 131-138. [doi:10.1080/13548500701584030](https://doi.org/10.1080/13548500701584030)

7. PRILOZI



Prilog 1. Primjer kromatograma hlapljivih spojeva eteričnog ulja sjemenki komorača (uzorak ETU3)

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Petra Tonković

Petra Tonković