

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Ana Marija Medved i Petra Tonković

Kemijski sastav nehlapljivih ulja začinskih sjemenki: utjecaj vrste sjemenki i metode ekstrakcije

Zagreb, 2020.



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).

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća te Laboratoriju za tehnologiju masti i ulja Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo pod vodstvom doc. dr. sc. Maje Repajić (mentor) i doc. dr. sc. Marka Obranovića (komentor) i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. ZAČINSKO BILJE	1
1.2. KEMIJSKI SASTAV ULJA	2
1.2.1. Masne kiseline	2
1.2.2. Steroli	3
1.2.3. Pigmenti.....	4
1.2.4. Ostali lipidni sastojci.....	6
1.3. ODABRANE ZAČINSKE SJEMENKE	7
1.3.1. Sjemenke komorača	7
1.3.2. Sjemenke kima.....	8
1.3.3. Sjemenke korijandera	9
1.3.4. Sjemenke zvjezdastog anisa.....	10
1.4. EKSTRAKCIJA ULJA	11
1.4.1. Ekstrakcija po Soxhlet-u	12
1.4.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku	13
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	15
3. MATERIJAL I METODE	16
3.1. MATERIJAL	16
3.1.1. Sjemenke.....	16
3.1.2. Kemikalije i standardi	16
3.1.3. Aparatura i pribor	17
3.2. METODE RADA	18
3.2.1. Ekstrakcija nehlapljivih ulja	18
3.2.2. Određivanje udjela vode	20
3.2.3. Određivanje udjela ulja.....	21
3.2.4. Određivanje sastava masnih kiselina.....	21
3.2.5. Određivanje sastava sterola	23
3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje pigmenata.....	27
3.2.7. Statistička analiza	28
4. REZULTATI	29
4.1. UDIO ULJA	29
4.2. SASTAV I UDIO MASNIH KISELINA	30

4.3. SASTAV I UDIO STEROLA	34
4.4. SASTAV I UDIO PIGMENATA	37
5. RASPRAVA	39
5.1. UDIO ULJA	39
5.2. SASTAV I UDIO MASNIH KISELINA	42
5.3. SASTAV I UDIO STEROLA	48
5.4. SASTAV I UDIO PIGMENATA	51
6. ZAKLJUČCI	53
7. ZAHVALE	54
8. POPIS LITERATURE	55
9. SAŽETAK	66
10. SUMMARY	67
11. PRILOZI	68
11.1. UDIO ULJA	68
11.2. SASTAV I UDIO MASNIH KISELINA	69
11.3. SASTAV I UDIO STEROLA	71
11.4. SASTAV I UDIO PIGMENATA	72

1. UVOD

1.1. ZAČINSKO BILJE

Začinsko bilje danas ima veliku i široku primjenu u svakodnevnom životu. Različiti dijelovi začinskih biljaka (listovi, cvjetovi, kora, gomolj, korijen, plodovi i sjemenke) koriste se za aromatiziranje i bojanje hrane i pića, a nerijetko se upotrebljavaju i kao konzervansi. Obzirom na to da veliki broj začina posjeduje određene kemijske komponente koje mogu djelovati ljekovito, oni se koriste i u farmaceutske svrhe, ali i u kozmetičkoj industriji (Srinivasan, 2005). Fitokemikalije koje doprinose takvim svojstvima začina spadaju u razne skupine kemijskih spojeva poput alkohola, aldehida, ketona, terpena, estera i etera (Rathore i sur., 2013).

Današnje svjetsko tržište začinima procjenjuje se na 15,09 milijardi dolara, a uključuje prodaju 0,5 milijuna tona začina godišnje. Indija je vodeći proizvođač, potrošač i izvoznik začina, a najviše se izvoze crni i crveni papar, kurkuma, đumbir, kardamom te razne sjemenke začina (Grand View Research, 2018; Srinivasan, 2005).

Začinske sjemenke sadrže brojne biološki aktivne spojeve koji djeluju kao prirodni obrambeni mehanizam biljke, stoga se od davnih vremena koriste i za proizvodnju lijekova, aromatičnih komponenata, bojila i agrokemikalija. Glavnim sjemenskim začinima smatraju se korijander, kumin, komorač, kopar te anis (Rathore i sur., 2013).

Sjemenke začina često su bogati izvor nehlapljivih ulja, ali i drugih kemijskih spojeva poput pigmenta, tokoferola i sterola o čemu ovisi vrijednost takvog ulja kao i njegova upotreba (Matthäus i Musazcan Özcan, 2015). Osim što se nehlapljiva ulja dobivena iz sjemenki najčešće povezuju s prehranom jer mogu biti bogat izvor esencijalnih, omega-3 i omega-6 masnih kiselina (prvenstveno α -linolenske kiseline), ona se upotrebljavaju i u mnoge druge svrhe. Također, sve veću važnost u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji dobivaju nehlapljiva ulja bogata petroselinom (Sayed-Ahmad i sur., 2018). Ova masna kiselina se u visokim količinama nalazi u nehlapljivim uljima sjemenki biljaka koje pripadaju obitelji *Apiaceae*, a jedan od najvećih izvora jest upravo nehlapljivo ulje korijandera. Osim što doprinosi antimikrobnoj djelovanju protiv određenih vrsta bakterija, plijesni i kvasaca, petroselinolna se kiselina može koristiti i kao alternativa konvencionalnim biljnim uljima u prehrani (Placek, 1963; Delbeke i sur., 2016).

1.2. KEMIJSKI SASTAV ULJA

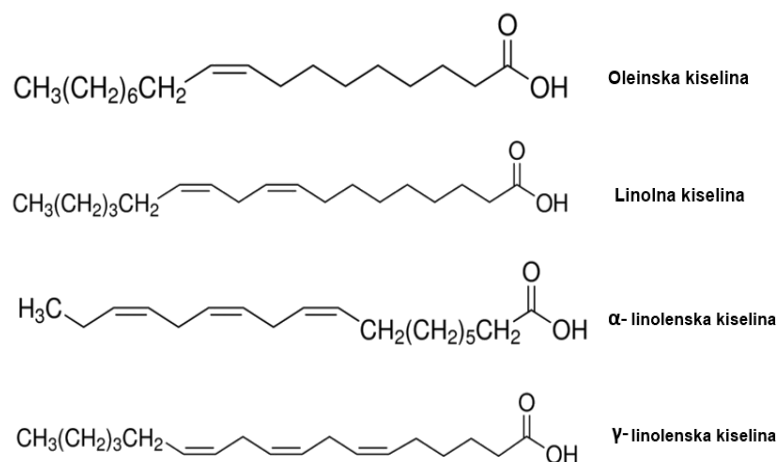
Biljna ulja sastavni su dio ljudske prehrane. Sastoje se od triglicerida, ali mogu sadržavati i brojne druge kemijske spojeve poput masnih kiselina, vitamina topljivih u mastima, sterola i pigmentata. Iako mnogi dijelovi biljke mogu biti izvor ulja, komercijalno se ono dobiva prvenstveno iz sjemenki (Rafiq i sur., 2015).

1.2.1. Masne kiseline

Masne kiseline sastoje se od ugljikovodičnog lanca s terminalnom metilnom na jednom i karboksilnom skupinom na drugom kraju. Dijele se na zasićene (nemaju dvostruku vezu), mononezasićene (s jednom dvostrukom vezom) te polinezasićene masne kiseline (s više od jedne dvostruke veze) (Roche, 1999) (Slika 1).

Najpoznatije zasićene masne kiseline su stearinska, palmitinska i miristinska kiselina (Rustan i Drevon, 2005). Mononezasićene masne kiseline mogu biti prisutne u dvije različite konfiguracije. *Cis*-konfiguracija ima dvostruku vezu s dva vodikova atoma na istoj strani molekule, dok *trans*-konfiguracija ima dva vodikova atoma na suprotnim stranama dvostruke veze (Roche, 1999). Glavni predstavnici ove skupine masnih kiselina su oleinska i palmitoleinska kiselina (Rustan i Drevon, 2005).

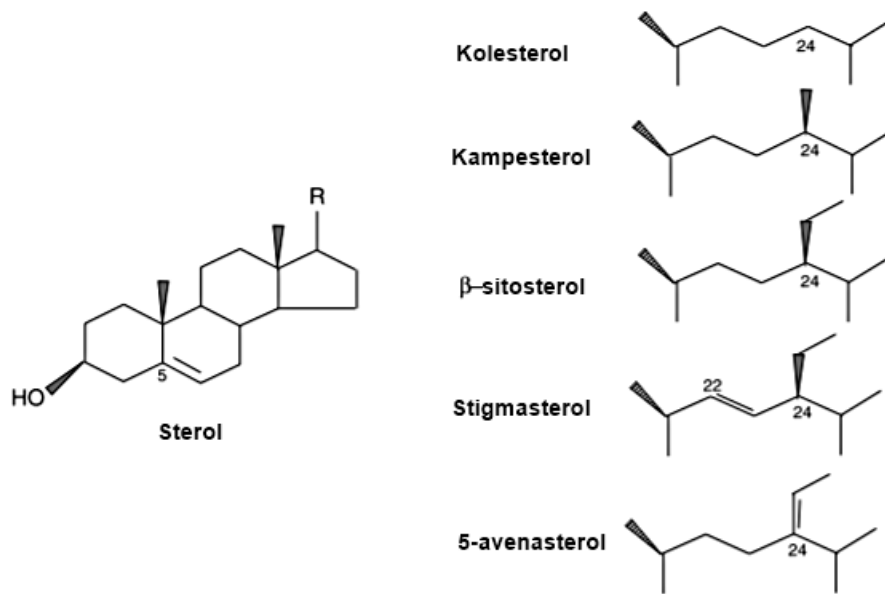
Polinezasićene masne kiseline također se mogu podijeliti u više kategorija od kojih su najznačajnije n-3 i n-6, gdje n-broj označava položaj prve dvostruke veze u ugljikovom lancu brojeno od CH₃ skupine. Važni predstavnici n-3 (omega-3) masnih kiselina je α-linolenska kiselina, a predstavnici skupine n-6 (omega-6) masnih kiselina je linolna kiselina (Karolyi, 2007).



Slika 1. Kemijska struktura određenih masnih kiselina (Tang i sur., 2020)

1.2.2. Steroli

Biljni steroli ili fitosteroli su steroidni alkoholi. Kao i kolesterol, biosintetski se dobivaju iz skvalena. Građeni su od tri cikloheksanska prstena, jednog ciklopentanskog prstena te bočnog lanca na C-17 atomu ugljika (Slika 2).



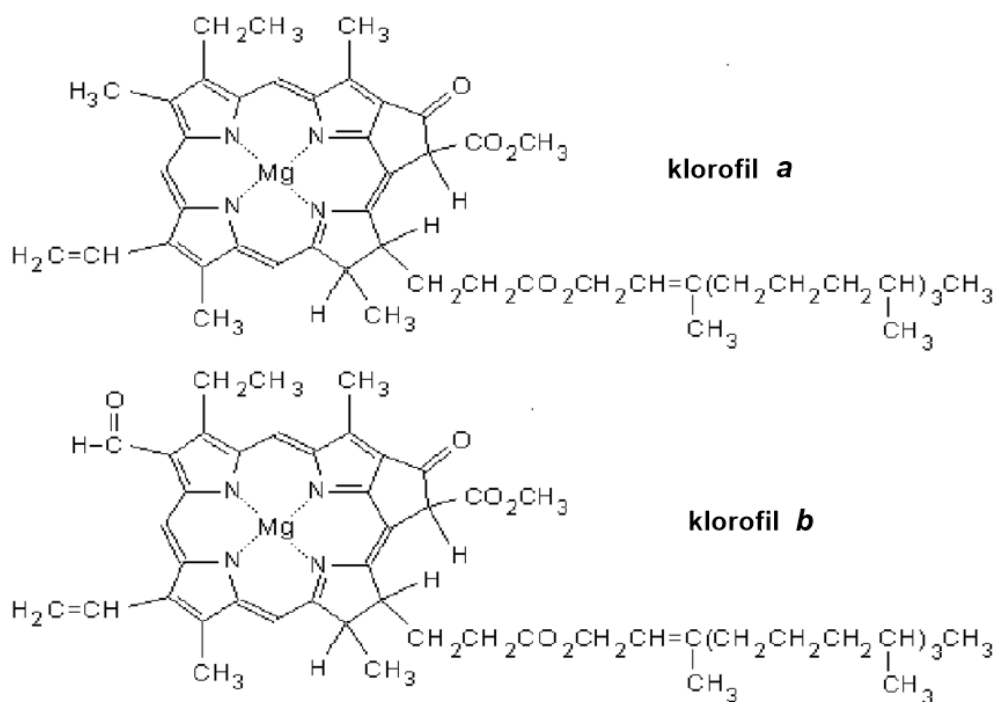
Slika 2. Kemijska struktura sterola (Segura i sur., 2006)

Fitosteroli se nalaze u različitim dijelovima biljaka, a biljna ulja posebno su bogata slobodnim i esteriziranim sterolima te steril-glikozidima. Imaju važnu ulogu u strukturi i funkciji staničnih membrana te kod rasta biljaka (Piironen i sur., 2000). Kao bitne komponente membrane, reguliraju njezinu fluidnost i propusnost, a mogu sudjelovati i u raznim metaboličkim procesima. Biljni steroli poput sitosterola i 24-metilkoesterola u biljkama imaju ulogu sličnu ulozi kolesterola u stanicama sisavaca (Hartmann, 1998). Uobičajen unos fitosterola u ljudskoj prehrani je 200-300 mg/dan, a što se više biljnih sterola unosi u organizam, to je niža apsorpcija kolesterola kao i njegova razina u serumu. U biljkama su najčešće zastupljeni sitosterol, stigmasterol i kampesterol (Piironen i sur., 2000).

1.2.3. Pigmenti

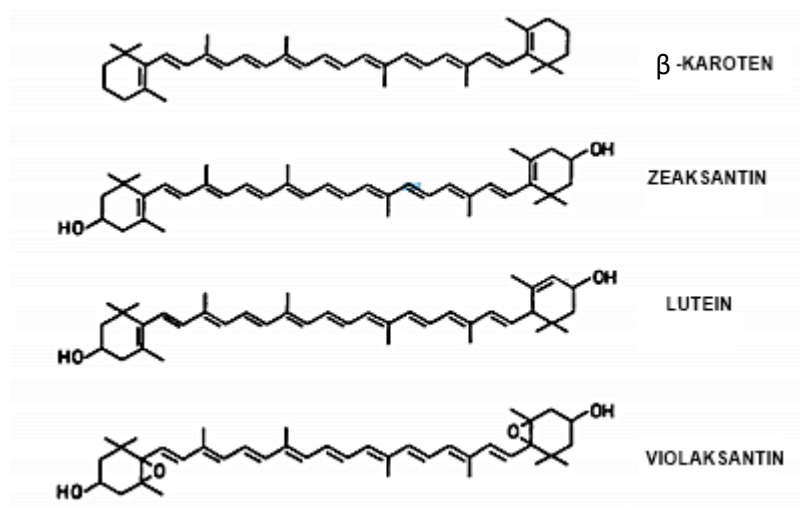
Biljke, uz više od 200 000 drugih spojeva, sadrže i pigmente. Četiri najčešće grupe pigmenata su flavonoidi, karotenoidi, klorofili te betalaini (Tanaka i sur., 2008; Timberlake i Henry, 1986). Klorofili i karotenoidi fotosintetski su pigmenti i pripadaju grupi izoprenoidnih biljnih lipida (Lichtenthaler, 1987) te su zastupljeni i u uljima.

Klorofili su najrasprostranjeniji biljni pigmenti, a najčešće se nalaze u lišću biljaka te imaju bitnu ulogu u procesu fotosinteze. Glavni pigmenti ove skupine su klorofil *a* koji je plavo-zelene te klorofil *b* koji je žuto-zelene boje, a razlikuju se u strukturi jer klorofil *a* posjeduje aldehidnu umjesto metilne grupe na poziciji 3 (Timberlake i Henry, 1986; Gross, 1991) (Slika 3). U višim biljkama, klorofil *a* i *b* javljaju se u omjeru 3:1, a on ovisi o fiziološkom statusu, uvjetima rasta te okolišnim čimbenicima. Klorofili su zapravo porfirini i sadrže tetrapirolni prsten od kojih je jedan reduciran. Ta četiri prstena koordinirana su Mg^{2+} ionom, a na četvrtom je prstenu supstituent propionske kiseline esterificiran sa diterpenskim alkoholom fitolom. Zbog toga je ostatak te molekule hidrofilan. Jedna bitna karakteristika ove grupe pigmenata jest njihova velika labilnost. Vrlo su osjetljivi na prisutnost kisika, svjetlost, toplinu i kemijsku degradaciju (Gross, 1991).



Slika 3. Kemijska struktura klorofila *a* i klorofila *b* (Pérez i sur., 2006)

Karotenoidi su pigmenti koji mogu sadržavati i do 15 konjugiranih dvostrukih veza, a odgovorni su za prisutnost žute, crvene i narančaste boje u biljkama. Metaboliziraju ih prvenstveno biljke, ali i alge, neke gljive, kvasci i fotosintetske bakterije (Saini i sur., 2015). Diješe se na karotenoide bez kisika te ksantofile koji mogu sadržavati kisik u različitim oblicima, dok je druga podjela na primarne i sekundarne karotenoide. U primarne karotenoide svrstavaju se karotenoidi zelenih, fotosintetski aktivnih biljnih tkiva koji su potrebni upravo za fotosintezu. Sekundarni su karotenoidi oni koji se nalaze u crvenim plodovima i cvjetovima (Lichtenthaler, 1987). Neki od karotenoida prisutnih u sjemenkama su lutein, α -karoten, β -karoten, violaksantin i zeaksantin (Slika 4) (Howitt i Pogson, 2006).



Slika 4. Kemijska struktura karotenoida (Lichtenthaler, 1987)

Karotenoidi imaju vrlo bitnu ulogu u životu biljaka zbog fotoprotektivnih funkcija tijekom procesa fotosinteze. Osim toga, važni su i u prehrani ljudi jer su izvor provitamina A (Tanaka i sur., 2008; Yunbo, 2011).

Osim primarnih fizioloških uloga u biljkama, klorofili i karotenoidi se primjenjuju u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji te u proizvodnji parfema. No, zbog svog dokazanog antioksidacijskog karaktera (Ferruzzi i sur., 2002; Lanfer-Marquez i sur., 2005; Hsu i sur., 2013) i protuupalnih, antidijabetičkih, antihipertenzijskih i antikancerogenih svojstava (Dashwood, 1997; Negishi i sur., 1997; Chernomorsky i sur., 1999) imaju primjenu i u medicinske svrhe.

1.2.4. Ostali lipidni sastojci

U biljnim se uljima, osim masnih kiselina, sterola i pigmenata, nalaze i određene druge lipidne komponente. U značajnijem se udjelu nalaze tokoferoli, vitamini vitamina E, a u prirodi postoje α -, β -, γ - i δ -tokoferol. Vitamin E topljiv je u mastima te je esencijalan što znači da ga organizam ne može sintetizirati, već se mora unositi hranom. Tokoferoli su sveprisutni u biljnim tkivima, a najčešće se nalaze u lišću i sjemenkama dvosupnica (Sen i sur., 2006). Mogu uspješno inhibirati oksidaciju lipida u biološkim sustavima i hrani, a samim time dovode do produženja trajnosti, ali i povećanja prehranbene vrijednosti hrane (Kamal-Eldin i Appelqvist, 1996). Vitamin A, kao i vitamin K u biljnim su uljima manje zastupljeni, dok se vitamin D ne može dobiti iz namirnica biljnoga podrijetla (Malhotra, 2012; Ramadan i Mörsel, 2002b). Osim vitamina, u uljima su prisutni i fosfolipidi koji su sastavni dio svake stanične membrane živih organizama, a njihova se struktura sastoji od hidrofilnog i lipofilnog dijela. Među glavnim fosfolipidima u uljima smatraju se fosfatidilkolin, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin te fosfatidilinozitol. Razne vrste sjemenki imaju različite vrste fosfolipida, ali generalno je fosfatidilkolin taj koji prevladava. Međutim, njegova količina u uljima sjemenki je vrlo mala u usporedbi s njegovom količinom u životinjskim tkivima. Fosfolipidi u uljima uzrokuju pjenjenje, zamućenje i njihovo tamnjenje te se zbog toga uklanjaju raznim metodama i industrijskim procesima, a u konačnom se proizvodu mogu naći samo u tragovima (Chen i sur., 2011). Još jedan od zastupljenih sastojaka je i skvalen, visokonezasićeni triterpen otvorenog lanca, a u značajnim količinama prisutan je u maslinovom ulju i jetri morskog psa. Ključnu ulogu ima u biosintezi kolesterola, a može djelovati antioksidativno, kemopreventivno te kao protuotrov za smanjenje slučajnih toksičnosti izazvanih unosom lijekova (Ryan i sur., 2007).

1.3. ODABRANE ZAČINSKE SJEMENKE

1.3.1. Sjemenke komorača

Komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.) je dvogodišnja biljka s aromatičnim i ljekovitim svojstvima, a pripada obitelji *Apiaceae* (Malhotra, 2012). Postoje tri vrste komorača: *Foeniculum vulgare* Mill. var. *piperitum* (gorki komorač), *Foeniculum vulgare* Mill. var. *dulce* (slatki komorač) te *Foeniculum vulgare* Mill. var. *azoricum* (Seidemann, 2005). Gorki komorač se uzgaja zbog plodova i eteričnih ulja, dok se slatki komorač još dodatno uzgaja zbog listova koji se koriste u kulinarstvu (Malhotra, 2012). Komorač je autohtona biljka Mediterana, međutim, naturalizacijom i kultivacijom proširio se u sve dijelove svijeta gdje raste kao samonikli ili kultiviran. Stabljika je uspravna, lišće perasto, a cvjetovi su žuti i sitni (Rather i sur., 2016) (Slika 5a). Komorač ima veliku biološku aktivnost zbog sadržaja hlapljivih i nehlapljivih komponenti.



Slika 5. Cvijet, stabljika (a) i sjemenke (b) komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) (vlastita fotografija)

Kemijski sastav sjemenki komorača (Slika 5b) varira ovisno o morfotipu, klimi te stadiju berbe, ali u prosjeku sadrži 8,8 % vode, 15,8 % proteina, 14,9 % masti i 36,6 % ugljikohidrata. Od mikronutrijenata bitni za navesti su minerali kalcij, kalij i željezo te vitamini A, niacin, tiamin i riboflavin. Sjemenke komorača sadrže još i eterično ulje, masne kiseline, kumarine, flavonoide, monoterpenoide, tanine, i dr. (Rathore i sur., 2013). Prema El-Awadi i Hassan (2010) sjemenke komorača sadrže 0,79 % eteričnog te 5,82 % nehlapljivog ulja.

Od nehlapljivih komponenti izolirani su fenolni spojevi, a određeni rodovi iz obitelji *Apiaceae* vrlo su poznati po visokom udjelu petroselinske kiseline u nehlapljivim uljima sjemenki, koja

se široko primjenjuje u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Osim nje, nehlapljiva ulja sjemenki iz ove obitelji uglavnom sadrže i palmitinsku, oleinsku i linolensku kiselinu (Ngo-Duy i sur., 2009). Prema Rathore i sur. (2013) nehlapljivo ulje sjemenki komorača sadrži otprilike 20 % masnih kiselina, a sjemenke mogu sadržavati još i sluz, škrob, šećere i tanine (Malhotra, 2012). Od sterola su u nehlapljivom ulju komorača prisutni stigmasterol i (22R,24S)-22,24-dimetilkolesterol, a od pigmenata klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi (Conforti i sur., 2009; Majdoub i sur., 2017). Nadalje, spojevi koji pokazuju aktivnost vitamina E prisutnih u nehlapljivom ulju komorača su α -, β -, γ - i δ -tokotrienol, te β - i γ -tokoferol (Ivanov i Aitzetmüller, 1995). Najbitniji antioksidativni spojevi komorača su kafeoilkina, dikafeoilkina i ružmarinska kiselina te flavonoidi (Parejo i sur., 2004a,b).

1.3.2. Sjemenke kima

Kim (*Carum carvi* L.) je jedna od najranije uzgajanih biljaka u Africi, Aziji i Europi, a pripada obitelji *Apiaceae*. Dvogodišnja je razgranata biljka s uskim, sitno izbočenim lisnatim stabljikama. Listovi su usko razdijeljeni i perasto sastavljeni, a ljeti se pojavljuju bijelo-ružičasti cvjetovi. Osim upotrebe u kulinarstvu, aromatične tvari prisutne u ovoj biljci privukle su veliku pažnju znanstvenika širom svijeta kako bi eksperimentalno potvrdili i terapijski učinak kima. Djeluje antibakterijski, karminativno i adstrigentno te se koristi u liječenju blagih probavnih poremećaja, kolika, dispepsije i dispeptične glavobolje, a može poboljšati i funkciju jetre (Goyal i sur., 2018; Johri, 2011).



Slika 6. Sjemenke kima (*Carum carvi* L.) (vlastita fotografija)

Sjemenke (Slika 6) sadrže 1,9 % eteričnih ulja koja sadrže više od 30 spojeva (Goyal i sur., 2018). Neki od spojeva sadržanih u sjemenkama kima su monoterpeni ugljikovodici, monoterpeni s kisikom, zasićene i nezasićene masne kiseline, pigmenti, steroli, aldehidi, esteri, ketoni, flavonoidi, izoflavonoidi, lignini i drugi fenolni spojevi. Sjemenke sadrže i razne vitamine i minerale, prehrambena vlakna, aminokiseline, škrob i šećer (Johri, 2011).

Od masnih kiselina, u uljima sjemenki kima značajne su miristinska, palmitinska, stearinska, oleinska, petroselininska, linolenska te linolna kiselina (Laribi i sur., 2009), dok su Δ^5 -stigmasterol, β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol i sitostanol steroli prisutni u najvećem udjelu (Kozłowska i sur., 2016). Skupine pigmenata zastupljene u nehlapljivom ulju kima su karotenoidi te klorofili *a* i *b* (Petraitytė i Dastikaitė, 2007), a ono još sadrži i α -tokotrienol, γ -tokotrienol, δ -tokotrienol te γ -tokoferol i δ -tokoferol (Ivanov i Aitzetmüller, 1995).

1.3.3. Sjemenke korijandera

Korijander (*Coriandrum sativum* L.) je ljekovita i kulinarska biljka, također iz obitelji *Apiaceae*. Biljka potječe s Mediterana, ali se uglavnom uzgaja u tropskim područjima te je dostupna tijekom cijele godine. Glavne zemlje uzgoja su Indija, Pakistan, Rusija, Bangladeš, središnja Europa, Maroko i Kina (Rathore i sur., 2013). Njegov okus podsjeća na okus kore citrusa i kadulje. Stabljika je uspravna, a svaka grana završava cvatom. Lišće je zelene boje, dok tijekom razdoblja cvatnje može biti crveno ili ljubičasto. Plodovi korijandera su sjemenke kuglastog ili jajolikog oblika (Slika 7) i sastoje se od dva merikarpa. Sjemenke se često koriste u medicini kao diuretik ili sredstvo protiv nadutosti, a mogu se koristiti i kod sezonskih bolesti, mučnina i želučanih problema. Cineol, kao sastojak eteričnog ulja te linolenska kiselina, kao sastojak nehlapljivog ulja korijandera dokazano imaju antireumatsko i antiartritično djelovanje (Rathore i sur., 2013).



Slika 7. Sjemenke korijandera (*Coriandrum sativum* L.) (vlastita fotografija)

Sjemenke korijandera sadrže 7,3 % vode, 21,8 % proteina, 4,8 % masti te 52,1 % ugljikohidrata (Niamah i Alali, 2016). Od vitamina je u najvećem udjelu prisutan vitamin C, a od minerala kalcij, fosfor, natrij, kalij i željezo (Bhat i sur., 2014). Nehlapljivo ulje sjemenki korijandera može se koristiti za pečenje hrane te kao začin, dok su sitno mljevene sjemenke jedan od esencijalnih sastojaka curry mješavine (Msaada i sur., 2009b).

Od masnih kiselina u nehlapljivim uljima sjemenki korijandera prisutne su petroselinjska, linolenska, oleinska i palmitinska masna kiselina, dok su stigmasterol, β -sitosterol i Δ^5 -avenasterol neki od sterola koji su prisutni u najvećem udjelu (Ramadan i Mörsel, 2002a). Također, nehlapljivo ulje sadrži i α -, γ -, i δ -tokoferol te α -, γ -, i δ -tokotrienol (Ivanov i Aitzetmüller, 1995). Od pigmenata, nehlapljivo ulje sjemenki korijandera sadrži brojne karotenoide poput β -karotena, β -kriptoksantin epoksida te lutein-5,6-epoksida. Ostali pigmenti koji se nalaze u biljci su klorofili *a* i *b*, lutein, neoksantin i violaksantin (Divya i sur., 2012).

1.3.4. Sjemenke zvjezdastog anisa

Zvjezdasti anis (*Illicium verum* Hook. f.) je aromatično zimzeleno stablo s crvenim cvjetovima te zvjezdastim plodovima. Pripada obitelji *Schisandraceae*. Uzgaja se uglavnom u južnoj Kini i Vijetnamu. Listovi su aromatični i eliptični, cvjetovi dvospolni i ružičaste do tamnocrvene boje, a stabljika može biti eliptična do jajolika. Plod je zvjezdast, crvenkast i sastoji se od 6 do 8 folikula (Slika 8). Koristi se kao začin, a veoma je važan i u kineskoj medicini gdje se koristi za ublažavanje povraćanja, bolova u želucu, nesanice, kožnih upala te reumatske boli (Wang i sur., 2011).



Slika 8. Plod i sjemenke zvjezdastog anisa (*Illicium verum* Hook. f.) (vlastita fotografija)

Zvezdasti anis bogat je lignanima i seskviterpenima koji pripadaju jedinstvenom strukturnom sastavu i javljaju se isključivo u vrstama *Illicium*. Ova vrsta je bitan industrijski izvor šikiminske kiseline koja se koristi za stvaranje antivirusnog lijeka „Tamiflu“ (Wang i sur., 2011).

Prinos eteričnog ulja ovisi o podrijetlu, vremenu berbe, sezonskom čimbeniku te svježini biljke. U svježem plodu zvezdastog anisa, sadržaj hlapljivih komponenti iznosi 2,5-3,5 %, dok je u osušenom plodu njihov sadržaj 8-9 % (Wang i sur., 2011). (E)-anetol, limonen, linalol i α -pinen su glavne komponente eteričnog ulja zvezdastog anisa (Yang i sur., 2010). Od ostalih spojeva eteričnog ulja zastupljeni su i mircen, estragol, β -pinen, α -terpineol, kariofilen te terpinolen (Padmashree i sur., 2007). Skupina flavonola je također prisutna u plodu zvezdastog anisa, a najznačajniji predstavnici su kempferol i njegovi glikozidi te kvercetin i njegovi glikozidi (Wang i sur., 2011).

Sjemenke zvezdastog anisa sadrže 55 % nehlapljivog ulja u čijem sastavu dominiraju sljedeće masne kiseline: 63,24 % oleinske, 24,4 % linolne, 7,93 % stearinske te 4,43 % miristinske (George, 2012). Od tokoferola, u biljci je prisutan α -tokoferol (Dinesha i sur., 2014).

1.4. EKSTRAKCIJA ULJA

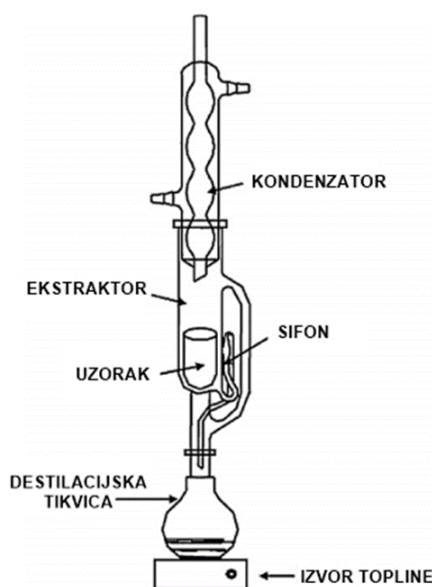
Ekstrakcija je proces prelaska određene tvari iz krute ili tekuće faze u otapalo. Obzirom na agregatno stanje faza, mogu se podijeliti na čvrsto-tekuću i tekuće-tekuću ekstrakciju. Otapalo se odabire tako da u njemu ciljane komponente budu topljivije u odnosu na pripremljeni uzorak, što omogućava separaciju ciljanih spojeva npr. iz biljnog materijala. Cijeli proces zasniva se na odjeljivanju faza između kojih se događa prijelaz tvari, a može se provoditi tako da se željena tvar ekstrahira i balastne tvari ostanu u uzorku ili se uklanjaju prigodnim otapalom (Rapić, 1994).

Biljna ulja obično se dobivaju mehaničkim prešanjem ili ekstrakcijom organskim otapalima. Učinkovitost ekstrakcije ovisit će o udjelu vode u sjemenkama te temperaturi pri kojoj se sama ekstrakcija ulja odvija. Ekstrakcija organskim otapalima dodatno će ovisiti i o prirodi otapala, omjeru tvari i otapala te vremenu ekstrakcije. Novije i naprednije metode ekstrakcije poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (eng. *microwave assisted extraction*, MAE) te ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (eng. *ultrasound assisted extraction*, UAE) pokazale su da je ekstrakcija ulja iz sjemenki učinkovitija pri višim temperaturama zbog smanjenja viskoznosti otapala i povećane brzine prijenosa mase (Ali i Watson, 2014). Iako su u današnje vrijeme razvijene nove metode za ekstrakciju poput spomenutih MAE i UAE te ekstrakcije potpomognute visokim hidrostatskim tlakom (eng. *high hydrostatic pressure extraction*

HHPE), ekstrakcije visokonaponskim pražnjenjem (HVED) i ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (eng. *accelerated solvent extraction*, ASE), za ekstrakciju ulja i dalje se koriste i konvencionalne metode poput ekstrakcije po Soxhlet-u i tzv. „hladne“ ekstrakcije odnosno ekstrakcije na tresilici pri sobnoj temperaturi.

1.4.1. Ekstrakcija po Soxhlet-u

Franz von Soxhlet je 1879. godine razvio ekstrakcijski sustav koji od tada ima široku primjenu. Upravo ova konvencionalna metoda koristi se već duže od jednog stoljeća kao standardna tehnika ekstrakcije ulja, a provodi se tako da se uzorak stavi u držač koji se postepeno puni kondenziranim otapalom iz tikvice za destilaciju koja se zagrijava. Ekstrahirani uzorak cjevčicom odlazi u destilacijsku tikvicu pri čemu se sakuplja zajedno s otapalom sve dok se ekstrakcija ne završi (Luque de Castro i Priego-Capote, 2010) (Slika 9).



Slika 9. Ekstrakcija uz Soxhlet-u (Luque de Castro i Priego-Capote, 2010)

Prednosti ovakve metode su te da se uzorak u više navrata dovodi u kontakt s otapalom za ekstrakciju što omogućava pomak ravnoteže prijenosa mase. Isto tako, nakon ispiranja nije potrebno filtriranje, a propusnost uzorka može se povećati paralelnom ekstrakcijom pa zbog toga ovakva tehnika ne zahtjeva značajne troškove.

Ipak, nedostaci ove tehnike su dugotrajno provođenje ekstrakcije i upotreba velikih količina otapala (što se odnosi ne samo na cijenu već i na očuvanje okoliša). Također, uzorci se ekstrahiraju pri temperaturi vrenja otapala pa se ne može zanemariti i mogućnost termičke razgradnje termolabilnih spojeva. Također, ekstrakcija po Soxhlet-u je ograničena na selektivnost otapala i ne može se lako automatizirati (López-Bascón i Luque de Castro, 2020).

1.4.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE) je novija i naprednija tehnika ekstrakcije koja u posljednje vrijeme ima sve veću primjenu zbog brojnih prednosti. To je automatizirana metoda koja predstavlja alternativu ekstrakciji po Soxhlet-u. Ova metoda ekstrakcije uključuje korištenje povišenog tlaka čime se tijekom ekstrakcije pri višim temperaturama (koje mogu biti više od temperature vrenja samog otapala) otapalo održava u tekućem stanju te se na taj način sprječava njegovo isparavanje. Isto tako, primjena povišene temperature povećava kinetičku energiju molekula u sustavu što dovodi do povećanja brzine kemijskih reakcija, veće topljivosti i veće brzine difuzije otopljenih tvari u otapalu (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001; Dean, 1998; Heemken i sur., 1997). Nadalje, princip ASE omogućuje provoditi ekstrakciju u više ciklusa, čija je svrha uvođenje svježeg otapala, a time i održavanje povoljne ekstrakcijske ravnoteže (Mottaleb i Sarker, 2012). Ekstrakcija se provodi na posebno konstruiranom ASE uređaju (Slika 10), što pridonosi automatiziranosti i jednostavnosti korištenja ove metode ekstrakcije.

Heemken i sur. (1997) smatraju da bi se za ovakav tip ekstrakcije trebalo koristiti isto otapalo koje bi se koristilo za Soxhlet ekstrakciju. Organska polarna otapala su optimalna otapala za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz raznih sjemenki ASE metodom.

Uzorak prije same ekstrakcije mora biti usitnjen i homogeniziran te se on, zajedno sa specijalnim filterom (celulozni filter ili filter od staklenih mikrovlakana, ovisno o vrsti otapala) i disperzijskim sredstvom (dijatomejska zemlja ili pijesak, ovisno o vrsti uzorka), postavlja u ćelije od nehrđajućeg čelika. Disperzijsko sredstvo poput dijatomejske zemlje povećava učinkovitost ekstrakcije tako da povećava brzinu protoka i površinu uzorka te pospješuje apsorpciju vode (Losic i sur., 2009). Dva glavna načina rada ASE uređaja su statički i dinamički način. U dinamičkom načinu rada, svježe ekstrakcijsko otapalo se kontinuirano pumpa kroz ćeliju s uzorkom. Statički dio sastoji se od jednog ili više ciklusa ekstrakcije tijekom kojih dolazi do zamjene otapala između tih ciklusa (Mustafa i Turner, 2011). Na uređaju je moguće podešavanje parametara poput statičkog vremena koje označava duljinu trajanja ekstrakcijske faze, temperature (najčešće do 200 °C), broja ciklusa, volumena otapala za ispiranje ćelija

između faza te vrijeme propuhivanja ćelija dušikom. Nakon završene ekstrakcije, ekstrakti uzorka prikupljaju se u boce postavljene na rotirajućem pladnju (Thermo Fisher Scientific Inc., 2011).



Slika 10. Dionex™ ASE™ 350 uređaj (vlastita fotografija)

U usporedbi sa Soxhlet ekstrakcijom prednosti ove metode su velike. Zbog povišene temperature i tlaka, poboljšava se prinos ekstrakcije, a istovremeno se smanjuje vrijeme trajanja ekstrakcije te potrošnja otapala. Smanjena potrošnja energije i količine organskih otapala ovu metodu čini ekološki prihvatljivijom od tradicionalnih metoda. ASE uređaj također pruža zaštitu spojevima osjetljivim na kisik i svjetlost. Smanjeni su i troškovi za ekstrakciju komponenti iz biljnog materijala ili prehrambenih proizvoda. Međutim, treba ipak biti na oprezu s termolabilnim spojevima koji se mogu razgraditi ako parametri nisu pažljivo postavljeni, a sam uređaj je veoma skup što je veliki nedostatak metode (Richter i sur., 1996; Raut i sur., 2015; Mustafa i Turner, 2011).

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Nehlapljiva ulja začinskih sjemenki bogata su fitonutrijentima poput nezasićenih masnih kiselina, sterola, klorofila i karotenoida koji dokazano imaju povoljan utjecaj na zdravlje. Upravo zbog svojeg poželjnog kemijskog sastava, nehlapljiva ulja začinskih sjemenki imaju veliki potencijal za primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj, kemijskoj i farmaceutskoj industriji. Međutim, udio i sastav pojedinih komponenata može znatno varirati ovisno o vrsti sjemenki i primijenjenoj tehnici za ekstrakciju ulja. Kako je u dostupnoj literaturi vrlo malo podataka o kemijskom sastavu nehlapljivih ulja sjemenki komorača, kima, korijandera i zvjezdastog anisa, a podataka o primjeni ASE za ekstrakciju ulja iz navedenih sjemenki nema, ciljevi ovog rada bili su:

1. Ispitati udio nehlapljivog ulja te njegov kemijski sastav (masne kiseline, steroli i pigmenti) u sjemenkama gorkog komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.), kima (*Carum carvi* L.), korijandera (*Coriandrum sativum* L.) i zvjezdastog anisa (*Illicium verum* Hook. f.)
2. Ispitati učinkovitost ekstrakcije ulja s ASE pri 25 i 100 °C, ekstrakcijom po Soxhlet-u te ekstrakcijom na tresilici pri sobnoj temperaturi

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Sjemenke

U ovom istraživanju korištene su komercijalno dostupne osušene sjemenke gorkog komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.), kima (*Carum carvi* L.), korijandera (*Coriandrum sativum* L.) i zvjezdastog anisa (*Illicium verum* Hook. f.) (Harissa d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Neposredno prije provođenja ekstrakcije ulja, sjemenke su usitnjene pomoću električnog mlinca, a usitnjeni uzorak koristio se za ekstrakciju ulja primjenom ASE pri 25 i 100 °C, ekstrakcijom po Soxhlet-u te ekstrakcijom na tresilici pri sobnoj temperaturi.

3.1.2. Kemikalije i standardi

- Heksan, p.a.
- Etanolna otopina kalijevog hidroksida (0,5 mol/L)
Priprema: 3 g kalijevog hidroksida otopi se u 5 mL vode i razrijedi u 100 mL 95 %-tnog etanola (v/v).
- Interni standard, α -kolestanol
Priprema: 1,0 mg/mL u 95 %-tnom etanolu (v/v)
- Etanol, p.a.
- Aluminijski oksid (0,063 mm – 0,200 mm; udio vode 0 %)
- Dietil-eter, p.a.
- Razvijajući reagens (TLC) – heksan/dietil-eter (v/v)
Priprema: Otopina heksana i otopina dietil-etera pomiješaju se u omjeru 1:1
- Otopina standarda za TLC
Priprema: 1,0 mg/mL α -kolestanola u acetonu doda se u otopinu 1,0 mg/mL kolesterola u acetonu.
- Aceton, p.a.
- Metanol, p.a.
- Metanolna otopina kalijevog hidroksida (2 mol/L)
Priprema: 11,78 g kalijevog hidroksida otopi se u 5 mL vode i razrijedi u 100 mL 95 %-tnog metanola
- Izooktan, p.a.
- Bezvodni natrijev hidrogensulfat
- Zasićena otopina natrijevog klorida (40 %-tna otopina)
Priprema: 40 g natrijevog klorida otopi se u 100 mL vode.

- Sililirajući reagens

Priprema: Piridin, heksametilidisilazan i trimetilklorsilan miješaju se u omjeru 5:2:1 (v/v)

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
- Vodena kupelj (BÜCHI Heating Bath B-490, Flawil, Švicarska)
- Električni mlinac (GT11, Tefal, Rumilly, Francuska)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern, Balingen, Njemačka)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker, IKA, Staufen, Njemačka)
- Aparatura po Soxhlet-u
- Vortex tresilica (LLG-uniTEXER, Meckenheim, Njemačka)
- Rotacijski vakuum otparivač (Heidolph, Schwabach, Njemačka)
- Sušionik (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- 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)

Pribor:

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

- Povratno hladilo
- Plinski plamenik
- Graduirane pipete, volumena 5 mL
- Kolona za kromatografiju sa sinterom na dnu
- Stakleni štapić
- Laboratorijske čaše, volumena 50 mL
- Kapilarne cjevčice
- Razvijajuće kadice za TLC
- Metalna špatula
- Büchnerov lijevak
- Büchnerova tikvica
- Eksikator sa silikagelom i indikatorom zasićenosti
- Spremnik s dušikom
- Vijale volumena 1,5 mL s insertom
- Silikagel ploče za tankoslojnu kromatografiju (TLC) (Silikagel F254, Macherey-Nagel, GmbH, Co. KG)
- Metalna posudica s poklopcem

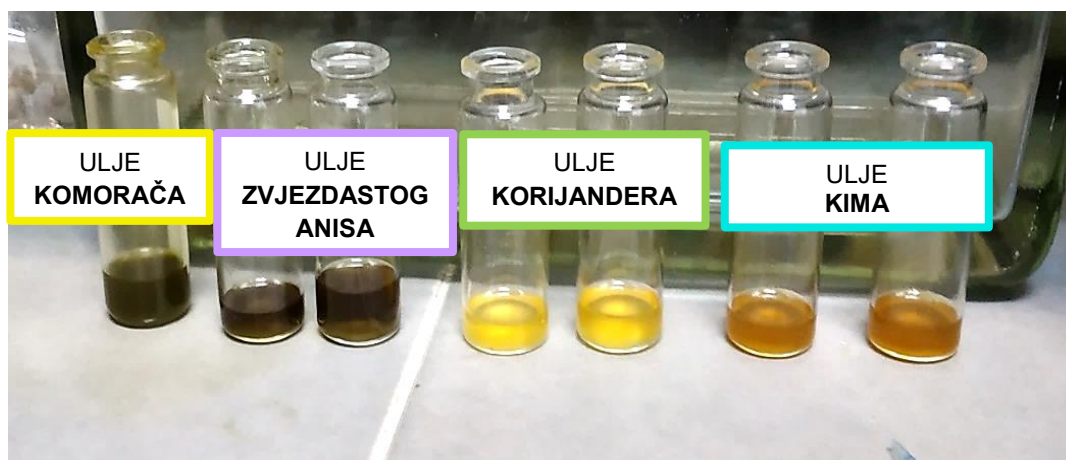
3.2. METODE RADA

3.2.1. Ekstrakcija nehlapljivih ulja

3.2.1.1. ASE

Ekstrakcija nehlapljivih ulja iz usitnjenih sjemenki komorača, kima, korijandera i zvjezdastog anisa provedena je primjenom ASE uz upotrebu heksana kao otapala. Za potrebe ekstrakcije na analitičkoj vagi odvaži se $8 \pm 0,0001$ g usitnjenih suhih sjemenki te se uzorak pomiješa s ~1,5 g dijatomejske zemlje. Na dno ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika volumena 34 mL stave se 2 celulozna filtera te se doda pripremljena smjesa uzorka i dijatomejske zemlje. Potom se ćelija zatvori i postavi na predviđeno mjesto u ASE Dionex 350® uređaju. Ekstrakcijski proces provodi se pri 25 i 100 °C uz fiksne uvjete ekstrakcije: statičko vrijeme ekstrakcije 10 min, 2 ekstrakcijska ciklusa, tlak 10,34 MPa, volumen ispiranja 150 % te vrijeme propuhivanja dušikom 30 s. Dobiveni ekstrakti, sakupljeni u staklenim bočicama (250 mL) u rotirajućem dijelu uređaja, prenesu se u tikvice s okruglim dnom prije postupka otparivanja otapala. Ekstrakti se otpare na rotacijskom vakuum otparivaču pri temperaturi vodene kupelji od 60 °C. Dobiveno ulje prenese se u prethodno izvagane vijale (Slika 11), propuše se

dušikom kako bi se uklonio ostatak otapala i hermetički se zatvori. Ulje se čuva pri temperaturi od -18 °C do provođenja analiza.



Slika 11. Nehlapljiva ulja začinskih sjemenki ekstrahirana primjenom ASE pri temperaturi 100 °C (vlastita fotografija)

3.2.1.2. Soxhlet ekstrakcija

Za ekstrakciju po Soxhlet-u, u čahuri za ekstrakciju izvaže se $10 \pm 0,0001$ g usitnjenih sjemenki. Čahura s uzorkom zatvori se vatom te se postavi u aparaturu u koju se prethodno ulije heksan. Pare otapala (heksana) se nakon zagrijavanja u tikvici kondenziraju u hladilu i tako natapaju uzorak. Ekstrakt dobiven interakcijom heksana i uzorka u uvjetima Soxhlet ekstrakcije skuplja se u prethodno postavljenu tikvicu u koju su stavljene staklene kuglice za vrenje. Proces ekstrakcije provodi se 8 sati, a zatim se dobiveni ekstrakt otpari prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.1.

3.2.1.3. Ekstrakcija na tresilici

U plastičnu kivetu od 50 mL odvaže se $4 \pm 0,0001$ g prethodno usitnjenih sjemenki. Potom se doda 40 mL heksana te se ekstrakcija provodi 30 minuta pri sobnoj temperaturi uz neprekidno miješanje na tresilici pri brzini 1000 o/min. Nakon ekstrakcije, uzorak se centrifugira 10 min pri 5000 o/min te se supernatant profiltrira pomoću Bücherovog lijevka i prenese u tikvicu s okruglim dnom. U zaostali talog doda se 40 mL heksana te se postupak ekstrakcije ponovi još 2 puta pri prethodno opisanim uvjetima. Sakupljeni ekstrakti se spoje i otapalo se ukloni otparivanjem prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.1.

Ekstrakcija svih uzoraka nehlapljivih ulja provedena je u paraleli, a popis svih uzoraka nehlapljivih ulja naveden je u Tablici 1.

Tablica 1. Eksperimentalni dizajn

VRSTA SJEMENKI	TIP EKSTRAKCIJE	OZNAKA UZORKA
KOMORAČ	ASE/25 °C	1-ASE/25 °C
	ASE/100 °C	1-ASE/100 °C
	SOXHLET	1-SE
	TRESILICA	1-TE
KIM	ASE/25 °C	2-ASE/25 °C
	ASE/100 °C	2-ASE/100 °C
	SOXHLET	2-SE
	TRESILICA	2-TE
KORIJANDER	ASE/25 °C	3-ASE/25 °C
	ASE/100 °C	3-ASE/100 °C
	SOXHLET	3-SE
	TRESILICA	3-TE
ZVJEZDASTI ANIS	ASE/25 °C	4-ASE/25 °C
	ASE/100 °C	4-ASE/100 °C
	SOXHLET	4-SE
	TRESILICA	4-TE

3.2.2. Određivanje udjela vode

Princip metode:

Udio vode u sjemenkama određuje se standardnom metodom HRN EN ISO 665:2004. Metoda se temelji na sušenju sjemenki pri 103 ± 2 °C do konstantne mase i za potrebe ove analize proces mljevenja sjemenki se ne provodi.

Postupak određivanja:

$5\pm 0,0001$ g uzorka sjemenki odvaži se u osušenu i izvaganu posudicu. Udio vode u svakoj vrsti sjemenke određuje se u zasebnoj posudici te se za svaki uzorak rade dva paralelna određivanja. Potom se u sušionik, koji je prethodno zagrijan na 103 ± 2 °C, postavi posudica s podignutim poklopcem. Proces sušenja provodi se 2 sata nakon čega se posudica u sušioniku zatvori poklopcem i stavi u eksikator da se ohladi do sobne temperature. Posudica se izvaži i ponovno stavi u sušionik s podignutim poklopcem na 1 sat. Potom se posudica ponovno hladi i važe, a sušenje se nastavlja po 1 sat dok razlika između dva uzastopna mjerenja ne bude

najviše 0,005 g. Kao konačan rezultat uzima se srednja vrijednost dva paralelna određivanja.

Udio vode u sjemenkama izražava se prema formuli [2]:

$$\% \text{ vode} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \quad [2]$$

gdje je: m_0 = masa prazne posudice (g)

m_1 = masa posudice s uzorkom sjemenki prije sušenja (g)

m_2 = masa posudice s uzorkom sjemenki nakon sušenja (g)

3.2.3. Određivanje udjela ulja

Udio ulja dobiven ekstrakcijom izražen je na 100 g suhe tvari sjemenki, a izračuna se prema formuli [1]:

$$\text{ulje (\%)} = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \quad [1]$$

gdje je: m_0 = masa suhe tvari sjemenki (g)

m_1 = ukupna masa ekstrahiranog ulja (g)

3.2.4. Određivanje sastava masnih kiselina

Princip metode:

Masne kiseline u uzorcima ulja određuju se metodom plinske kromatografije za čiju je provedbu potrebno prevesti masne kiseline u njihove metilne estere. Priprema metilnih estera uključuje provedbu procesa transmetilacije i to prema standardnoj metodi HRN EN ISO 12966-2:2017.

Postupak određivanja:

Priprema metilnih estera masnih kiselina

Postupak se provodi tako da se prvo odvaži $0,1 \pm 0,0001$ g uzorka ulja i otopi u 2 mL otopine izooktana u epruveti volumena 10 mL te se zatvori sa čepom. Potom se u epruvetu doda 100 μ L metanolne otopine KOH ($c=2$ mol/L) i snažno protrese 1 minutu na vortex tresilici te se epruveta ostavi na sobnoj temperaturi da bi sadržaj reagirao. Nakon 2 minute u reakcijsku smjesu doda se 2 mL otopine NaCl te se smjesa kratko protrese. Izooktanski sloj se odvoji i u

njega se doda 1 g bezvodnog natrijeva hidrogensulfata kako bi se uklonili mogući ostaci vode. Smjesa se protrese, a bistra otopina se prebaci u praznu vijalu. Tako pripremljen uzorak analizira se na uređaju za plinsku kromatografiju.

Analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom:

Pripremljen uzorak analizira se prema standardnoj metodi HRN EN ISO 12966-4:2015 na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System s plameno-ionizacijskim detektorom (FID) (Slika 12). Uvjeti kromatografske analize prikazani su u Tablici 2.

Identifikacija masnih kiselina

Za određivanje kvantitativnog i kvalitativnog sastava masnih kiselina u uzorcima koristi se metoda normalizacije površine. Nakon provođenja plinske kromatografije, rezultati analize prikazani su u računalnom sustavu. Na svakom dobivenom kromatogramu zabilježen je udio pojedine masne kiseline te je prikazan redoslijed eluiranja metilnih estera masnih kiselina. Identifikacija masnih kiselina u sjemenkama komorača, kima, korijandera i zvjezdastog anisa provodi se usporedbom retencijskih vremena pripremljenih metilnih estera pojedine masne kiseline s retencijskim vremenima metilnih estera standardne smjese masnih kiselina poznatog sastava.

Analiza masnih kiselina provedena je u paraleli, a koncentracije masnih kiselina izražene su kao % od ukupnih masnih kiselina.

Tablica 2. Uvjeti analize za određivanje masnih kiselina na plinskom kromatografu

Kolona	kapilarna TR-FAME (Thermo), 30 m x 0,22 mm, debljina filma 0,25 µm
Stacionarna faza	70 % cijanopropil-polisilfenilen siloksan
Temperaturni program kolone	120 °C do 160 °C – 4 °C/min, 160 °C do 190 °C – 10 °C/min, 190 °C – 10 min
Trajanje analize	23 min
Plin nosioc	helij
Protok plina nosioca	0,7 mL/min
Temperatura injektora	250 °C
Split	1:75
Temperatura detektora	280 °C
Volumen injektiranog uzorka	1,0 µL



Slika 12. Plinski kromatograf Agilent Technologies 6890N Network GC System s plameno-ionizacijskim detektorom te masenim detektorom tipa 5973 inert Mass Selective Detector (vlastita fotografija)

3.2.5. Određivanje sastava sterola

Princip metode:

Za određivanje koncentracije i sastava sterola u uzorcima nepolarne frakcije ekstrahirane iz uzoraka korištena je metoda HRN EN ISO 12228-1:2014. Metoda određivanja sterola u ulju temelji se na saponifikaciji uzorka s etanolnom otopinom kalijevog hidroksida. Prethodno se uzorku dodaje interni standard, odnosno α -kolestanol, a dobivena neosapunjiva frakcija podvrgava se kromatografiji na stupcu da bi se iz uzorka ekstrahirale negliceridne komponente. Pritom aluminijev oksid u kromatografskoj koloni veže anione masnih kiselina prisutne u uzorku ulja. Potom se iz negliceridnog dijela uzorka tankoslojnom kromatografijom izdvaja frakcija sterola koja se prevodi u trimetilsililetere nakon čega slijedi analiza pomoću plinske kromatografije.

Postupak određivanja:

Priprema neosapunjive frakcije:

U tikvicu s okruglim dnom od 25 mL odvaži se $0,25 \pm 0,0001$ g uzorka ulja i doda 1 mL prethodno pripremljenog internog standarda, odnosno etanolne otopine α -kolestanola te 5 mL otopine kalijevog hidroksida. U tikvicu s uzorkom dodaju se i 2 kuglice za vrenje. Tikvica se

spoji na povratno hladilo i zagrijava na plameniku 15 minuta od početka vrenja. Nakon isteka vremena, tikvica se ukloni s povratnog hladila te se u vrući sadržaj tikvice doda 5 mL etanola nakon kojeg slijedi miješanje s ciljem homogenizacije uzorka i hlađenje tikvice.

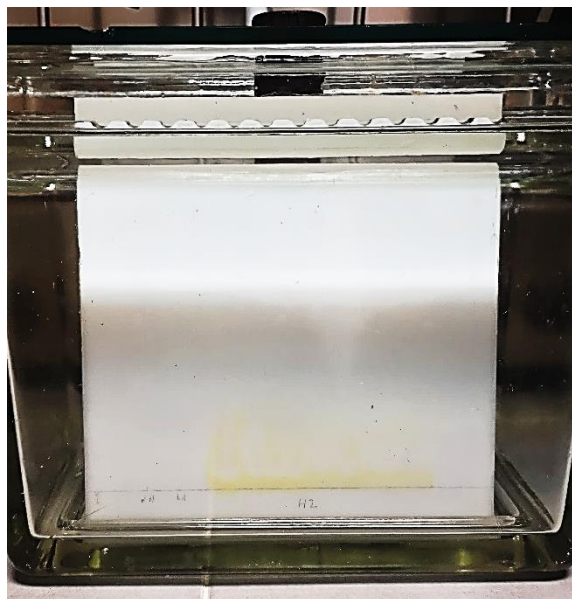
Ekstrakcija neosapunjive frakcije kromatografijom na stupcu:

Na dno kromatografske kolone postavi se vata uz dodavanje nekoliko kapi etanola za što bolje prijanjanje. Odvaži se 10 g aluminijskog oksida i kvantitativno prenese u kromatografsku kolonu uz dodavanje 20 mL otopine etanola uz pažljivo ulijevanje kako bi se izbjegli mjehurići zraka u sloju aluminijskog oksida. Potom se iz kolone ispusti otopina etanola sve dok nivo etanola ne bude 0,5 cm iznad nivoa aluminijskog oksida. Na kraju kolone postavi se prethodno izvagana tikvica s okruglim dnom od 50 mL. Otpipetira se 5 mL uzorka u kolonu i eluira dok nivo uzorka ne dosegne vrh sloja aluminijskog oksida. Potom se na isti način doda i eluira s 5 mL etanola, a nakon toga 3 puta s 10 mL dietil-etera. Brzina protoka otapala kroz kolonu treba biti do 2 mL/min. Eluat, odnosno neosapunjiva frakcija u sakupljenom sadržaju tikvice, otpari se do suhog pomoću rotacijskog vakuum otparivača pri temperaturi od 45 °C. Tikvica se izvaži nakon otparavanja.

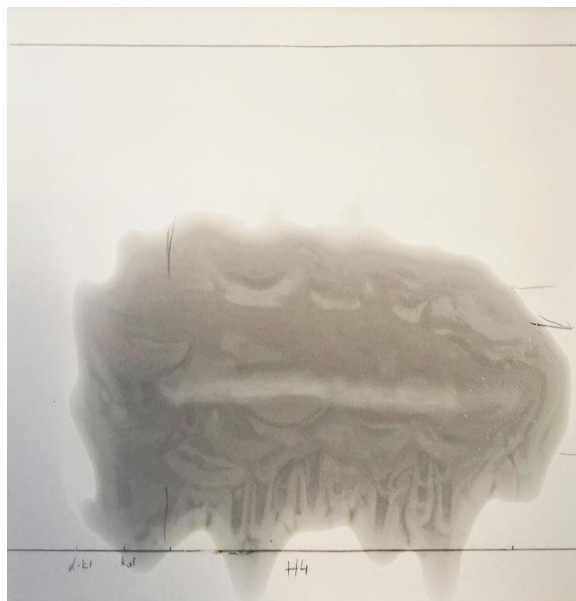
Izdvajanje sterolne frakcije tankoslojnom kromatografijom:

U uzorak neosapunjive frakcije doda se 0,5 mL dietil-etera te se nanosi mikropipetom na kromatografsku ploču na kojoj je sloj silikagela. Uzorak se nanosi 2 cm od donjeg ruba ploče u ravnoj liniji. U tikvicu s uzorkom doda se još nekoliko kapi dietil-etera s ciljem prenošenja cijelog neosapunjivog dijela na ploču. Na istoj visini, u praznini između linije uzorka i ruba ploče, nanosi se 2 µL otopine α -kolesterola te α -kolestanol pomoću kojih se identificiraju steroli nakon razvijanja kromatograma. Ploča se potom postavi u kadicu u koju je prethodno dodano 50 mL heksana i 50 mL dietil-etera te se zatvori poklopcem. Ploča se uklanja iz kadice nakon što otopina za razvijanje kromatograma dosegne visinu od 1 cm ispod gornjeg ruba ploče. Postupak se provodi pri sobnoj temperaturi, a vrijeme razvijanja ploče iznosi otprilike 1 h. Razvijena ploča (Slika 13) suši se u digestoru te se potom ravnomjerno popraska metanolom da bi se uočila zona sterola (Slika 14). Zone se označe tako da se obuhvati 2 mm iznad i 4 mm ispod vidljivog traga sterola. Označeni prostor ostruže se metalnom špatulom i kvantitativno prenese u laboratorijsku čašu pomoću staklenog štapića nakon čega se dodaje 0,5 mL etanola da se sadržaj učinkovitije prenese u Büchnerov lijevak. Dno lijevka umetnuto je u epruvetu koja je postavljena u Büchnerovu tikvicu. Sterolna frakcija izdvoji se filtracijom s 5 mL dietil-etera, a postupak se ponovi 3 puta. Sakupljeni filtrat prebaci se u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL i otpari na rotacijskom otparivaču pri temperaturi od 45 °C do volumena 1 mL. Dobiveni volumen prenese se mikropipetom u vijalu, a tikvica se dodatno ispere s par kapi dietil-etera radi što boljeg kvantitativnog prenošenja sterolne frakcije. Vijala se potom propuše

strujom dušika do suhog.



Slika 13. Razvijanje kromatografske ploče
(vlastita fotografija)



Slika 14. Zona izoliranih sterola
(vlastita fotografija)

Derivatizacija:

Pripremi se reagens za sililiranje koji je mješavina piridina, heksametildisilazana i trimetilklorsilana u omjeru 5:2:1 (v:v:v). U epruvetu koja sadrži sterolnu frakciju doda se 100 μL prethodno pripremljenog reagensa za sililiranje. Epruveta se zatvori i suši 15 min pri temperaturi od 105 $^{\circ}\text{C}$. Nakon sušenja, epruveta se ohladi na sobnu temperaturu i potom centrifugira 10 minuta pri 5000 o/min. Bistri supernatant prebaci se u vijale od 2 mL s insertom od 100 μL .

Analiza sastava sterola plinskom kromatografijom:

Pripremljeni uzorak analizira se na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System s masenim detektorom tipa 5973 inert Mass Selective Detector. Uvjeti kromatografske analize prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti analize za određivanje sterola na plinskom kromatografu

Kolona	kapilarna DB-17MS (Agilent), 30 m x 0,32 mm, debljina filma 0,25 µm
Stacionarna faza	(50 %-fenil)-metilpolisiloksan
Temperaturni program kolone	180 °C do 270 °C – 6 °C/min, 270 °C – 30 min
Trajanje analize	45 min
Plin nosioc	helij
Protok plina nosioca	1,5 mL/min
Temperatura injektora	290 °C
Split	13,3:1
Temperatura detektora	280 °C
Volumen injektiranog uzorka	1,0 µL

Identifikacija sterola:

Identifikacija i analiza sterola provodi se usporedbom retencijskih vremena ispitivanih uzoraka s retencijskim vremenima komercijalno dostupnih standardnih smjesa sterola. Da bi se odredio kvantitativni sastav sterola, potrebno je provesti metodu normalizacije površine ispod pikova.

Udio ukupnih sterola izražava se u mg/100 g i računa po zadanoj formuli [3]:

$$\text{Ukupni steroli (mg/100 g)} = \frac{\sum A_s \times 100}{A_\alpha \cdot m} \quad [3]$$

gdje je:

A_s - površina svakog pojedinačnog pika fitosterola

A_α - površina pika α -kolestanola

m - masa uzorka ulja (g)

Koncentracije pojedinačnih sterola izražene su u mg/100 g ulja i izračunate prema formuli [4]:

$$\text{Pojedinačni sterol (mg/100 g)} = \frac{A \times 100}{A_\alpha \cdot m} \quad [4]$$

gdje je:

A - površina ispod pika određenog sterola

A_α - površina pika α-kolestanola

m - masa uzorka ulja (g)

Analiza sterola provedena je u duplikatu.

3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje pigmenata

Princip metode:

Spektrofotometrijsko određivanje udjela klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida temelji se na jakim apsorpcijskim spektrima tih pigmenata. Apsorpcijski maksimumi ekstrahiranih pigmenata uvelike ovise o vrsti otapala i u određenoj mjeri o tipu spektrofotometra koji se koristi (Lichtenthaler i Buschmann, 2005).

Postupak određivanja:

Za spektrofotometrijsko određivanje pigmenta 0,1±0,0001 g ulja otopi se u 5 mL acetona te se uzorak dobro promiješa na vortex miješalici.

Kvantitativno određivanje provodi se spektrofotometrijski pri sljedećim valnim duljinama: 644,8 i 661,6 nm, za klorofil *a* i *b* (u skladu s korištenim ekstrakcijskim otapalom) te 470 nm za karotenoide. Kao slijepa proba koristi se aceton. Apsorbancija slijepa probe oduzima se od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Udjeli klorofila *a* i *b* te karotenoida računaju se prema sljedećim formulama [5, 6 i 7] (Lichtenthaler i Buschmann, 2005; Sumanta i sur., 2014):

Aceton:

$$c_a (\mu\text{g/mL}) = 11,24 A_{661,6} - 2,04 A_{644,8} \quad [5]$$

$$c_b (\mu\text{g/mL}) = 20,13 A_{644,8} - 4,19 A_{661,6} \quad [6]$$

$$c_{(x+c)} (\mu\text{g/mL}) = (1000 A_{470} - 1,90 c_a - 63,14 c_b)/214 \quad [7]$$

gdje su:

A = apsorbancija

c_a = maseni udio klorofila *a*

c_b = maseni udio klorofila *b*

$c_{(x+c)}$ = maseni udio karotenoida (ksantofili + karoteni)

Koncentracije pigmenata izražene su u mg/100 g ulja, a predstavljaju srednju vrijednost dvaju paralelnih određivanja.

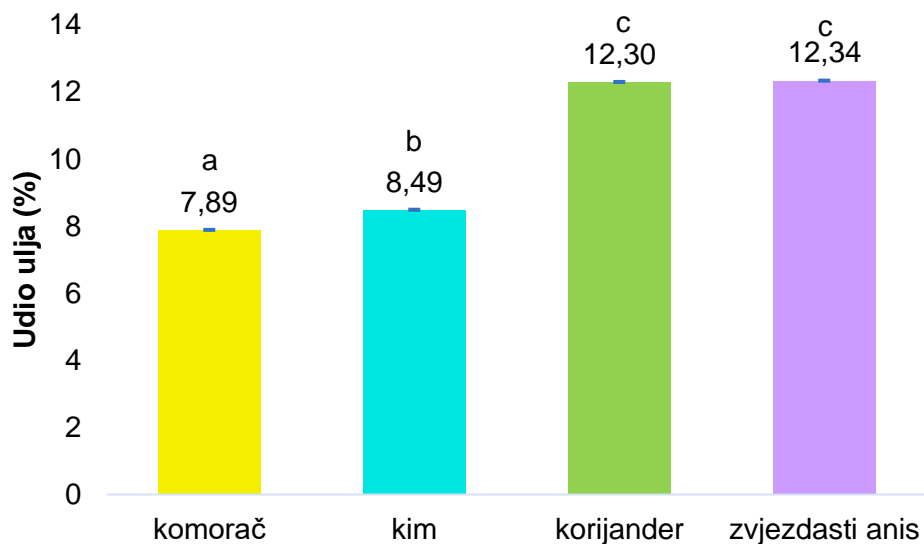
3.2.7. Statistička analiza

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Eksperiment je dizajniran kao puni faktorijski dizajn. Nezavisne varijable bile su vrsta sjemenki (komorač, kim, korijander i zvjezdasti anis) i metode ekstrakcije (ASE pri 25 i 100 °C, ekstrakcija po Soxhlet-u i ekstrakcija na tresilici pri sobnoj temperaturi), a kao zavisne varijable promatrane su: udio ulja (%), sastav i udio masnih kiselina (%), sastav i udio sterola (mg/100 g) te sastav i udio pigmenata (mg/100 g). Za usporedbu uzoraka korištena je dvosmjerna analiza varijance (two-way ANOVA), a marginalni prosjeci uspoređeni su s Tukey HSD testom. Rezultati statističke analize prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Također, izračunat je i Pearsonov koeficijent korelacije između masnih kiselina C12:0 i C18:1. Svi statistički testovi provedeni su na razini značajnosti $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti).

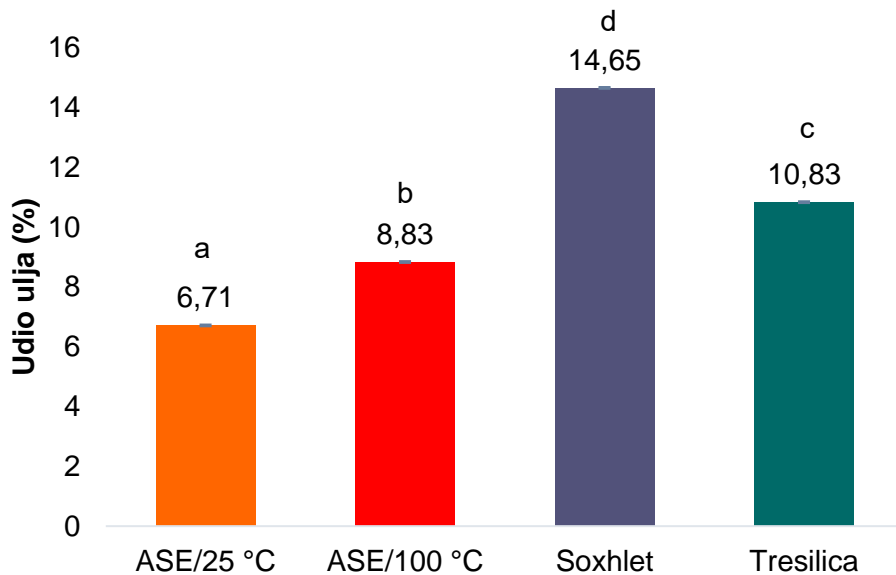
4. REZULTATI

4.1. UDIO ULJA

a)



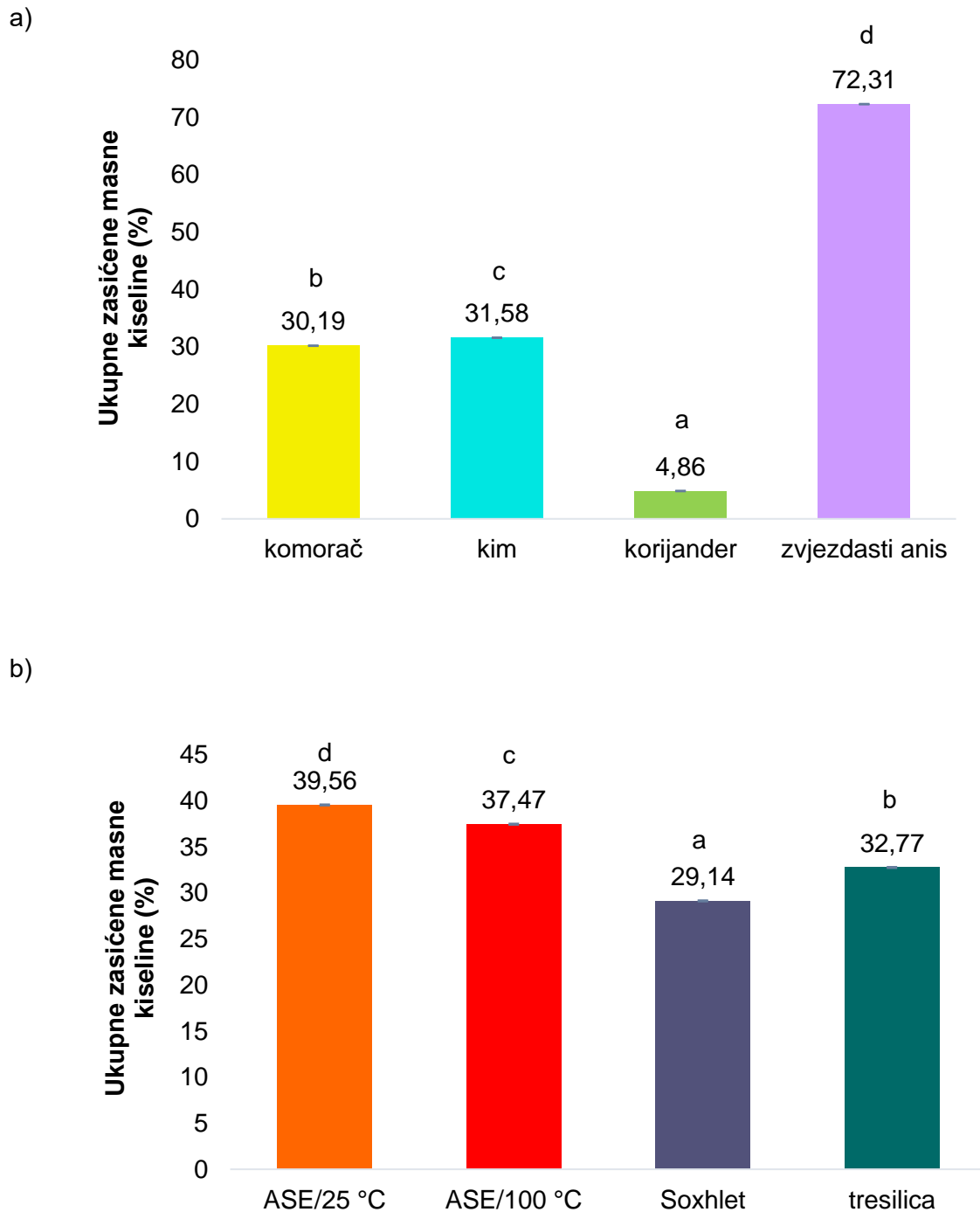
b)



Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.
Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod $p \leq 0,05$.

Slika 15. Udio ulja (%) u odabranim začinskim sjemenkama ovisno o vrsti sjemenki (a) i metodi ekstrakcije (b)

4.2. SASTAV I UDIO MASNIH KISELINA



Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna pogreška.
Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod $p \leq 0,05$.

Slika 16. Udio ukupnih zasićenih masnih kiselina (%) u uljima odabranih začinskih sjemenki ovisno o vrsti sjemenki (a) i metodi ekstrakcije (b)

Tablica 4. Utjecaj vrste sjemenki i metode ekstrakcije na sastav i udio (%) zasićenih masnih kiselina u uljima odabranih začinskih sjemenki

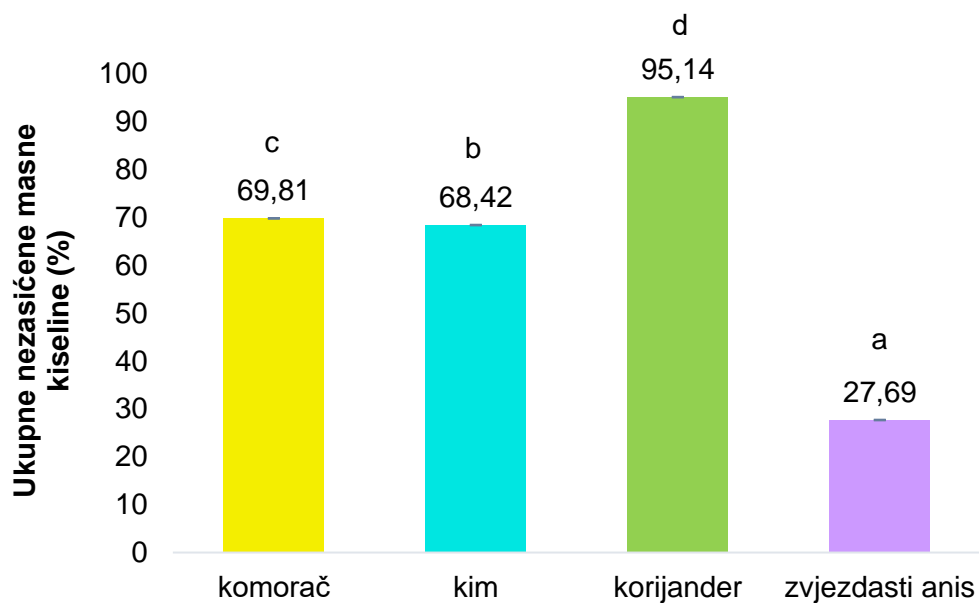
Izvor varijacije	C6:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0	C22:0	C23:0	C24:0
Vrsta sjemenki	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*
komorač	0,11±0,02 ^a	0,81±0,00 ^c	24,63±0,05 ^c	0,04±0,00 ^b	3,14±0,01 ^b	0,05±0,00 ^b	1,13±0,01 ^c	0,17±0,01 ^c	0,05±0,00 ^a	0,01±0,00 ^{ab}	0,06±0,01 ^b
kim	6,20±0,02 ^c	0,04±0,00 ^a	21,66±0,05 ^b	0,01±0,00 ^a	2,14±0,01 ^a	0,04±0,00 ^b	0,95±0,01 ^b	0,15±0,01 ^b	0,24±0,00 ^c	0,11±0,00 ^c	0,02±0,01 ^a
korijander	0,19±0,02 ^b	0,18±0,00 ^b	0,22±0,05 ^a	0,02±0,00 ^a	3,35±0,01 ^c	0,03±0,00 ^a	0,71±0,01 ^a	0,09±0,01 ^a	0,03±0,00 ^a	0,02±0,00 ^b	0,02±0,01 ^a
zvjezdasti anis	0,14±0,02 ^{ab}	0,04±0,00 ^a	61,87±0,05 ^d	0,06±0,00 ^c	8,10±0,01 ^d	0,06±0,00 ^c	1,64±0,01 ^d	0,18±0,01 ^d	0,12±0,00 ^b	0,00±0,00 ^a	0,10±0,01 ^c
Metoda ekstrakcije	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p=0,09	p<0,01*	p=0,42	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*
ASE/25 °C	2,29±0,02 ^d	0,42±0,00 ^d	31,36±0,05 ^d	0,03±0,00 ^a	3,92±0,01 ^a	0,04±0,00 ^a	1,03±0,01 ^a	0,14±0,01 ^a	0,24±0,00 ^c	0,04±0,00 ^b	0,07±0,01 ^b
ASE/100 °C	1,95±0,02 ^c	0,35±0,00 ^c	29,44±0,05 ^c	0,04±0,00 ^a	4,26±0,01 ^b	0,05±0,00 ^a	1,06±0,01 ^b	0,15±0,01 ^b	0,05±0,00 ^a	0,04±0,00 ^b	0,07±0,01 ^b
SE	0,79±0,02 ^a	0,05±0,00 ^a	22,85±0,05 ^a	0,04±0,00 ^a	3,88±0,01 ^a	0,05±0,00 ^a	1,18±0,01 ^d	0,15±0,01 ^a	0,08±0,00 ^b	0,05±0,00 ^b	0,04±0,01 ^{ab}
TE	1,62±0,02 ^b	0,25±0,00 ^b	24,73±0,05 ^b	0,04±0,00 ^a	4,67±0,01 ^c	0,05±0,00 ^a	1,16±0,01 ^c	0,15±0,01 ^b	0,07±0,00 ^b	0,02±0,00 ^a	0,03±0,01 ^a
Prosječna vrijednost	1,66	0,27	27,10	0,03	4,18	0,05	1,11	0,15	0,11	0,03	0,05

ASE=ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, SE=ekstrakcija po Soxhletu, TE=ekstrakcija na tresilici pri sobnoj temperaturi

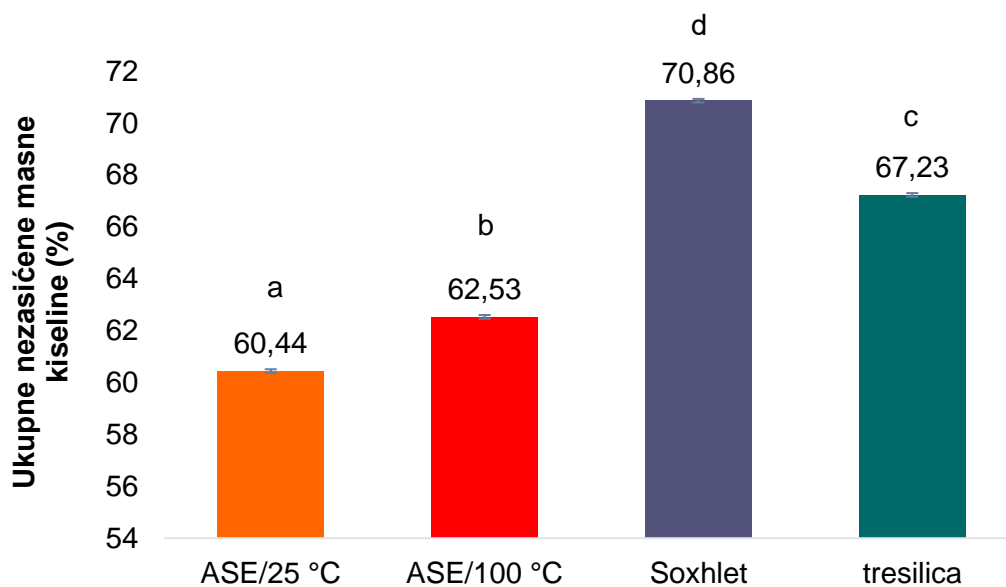
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna pogreška.

*Statistički značajna varijacija kod p≤0,05. Vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima statistički se razlikuju kod p≤0,05.

a)



b)



Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna pogreška.
Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod $p \leq 0,05$.

Slika 17. Udio ukupnih nezasićenih masnih kiselina (%) u uljima odabranih začinskih sjemenki ovisno o vrsti sjemenki (a) i metodi ekstrakcije (b)

Tablica 5. Utjecaj vrste sjemenki i metode ekstrakcije na sastav i udio (%) nezasićenih masnih kiselina u uljima odabranih začinskih sjemenki

Izvor varijacije	C14:1	C16:1	C17:1	C18:1**	C18:2n6	C18:3n6	C18:3n3	C20:1n9
Vrsta sjemenki	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*
komorač	0,60±0,00 ^c	0,09±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a	60,20±0,15 ^c	8,52±0,10 ^a	0,04±0,00 ^a	0,29±0,01 ^c	0,04±0,00 ^a
kim	0,03±0,00 ^b	0,10±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a	43,62±0,15 ^b	24,15±0,10 ^c	0,10±0,00 ^c	0,34±0,01 ^d	0,06±0,00 ^b
korijander	0,00±0,00 ^a	0,22±0,01 ^b	0,04±0,01 ^a	81,07±0,15 ^d	13,63±0,10 ^b	0,04±0,00 ^a	0,11±0,01 ^a	0,04±0,00 ^a
zvjezdasti anis	0,85±0,00 ^d	0,42±0,01 ^c	0,09±0,01 ^b	12,81±0,15 ^a	13,25±0,10 ^b	0,06±0,00 ^b	0,16±0,01 ^b	0,06±0,00 ^b
Metoda ekstrakcije	p<0,01*	p<0,01*	p=0,29	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p=0,11
ASE/25 °C	0,18±0,00 ^a	0,13±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	46,05±0,15 ^a	13,70±0,10 ^a	0,10±0,00 ^d	0,18±0,01 ^a	0,05±0,00 ^a
ASE/100 °C	0,52±0,00 ^d	0,13±0,01 ^a	0,05±0,01 ^a	47,19±0,15 ^b	14,31±0,10 ^b	0,04±0,00 ^b	0,23±0,01 ^b	0,06±0,00 ^a
SE	0,42±0,00 ^c	0,43±0,01 ^b	0,05±0,01 ^a	53,37±0,15 ^d	16,20±0,10 ^d	0,07±0,00 ^c	0,26±0,01 ^b	0,05±0,00 ^a
TE	0,35±0,00 ^b	0,12±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	51,10±0,15 ^c	15,32±0,10 ^c	0,03±0,00 ^a	0,23±0,01 ^b	0,04±0,00 ^a
Prosječna vrijednost	0,37	0,20	0,05	49,43	14,88	0,06	0,23	0,05

ASE=ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, SE=ekstrakcija po Soxhletu, TE=ekstrakcija na tresilici pri sobnoj temperaturi

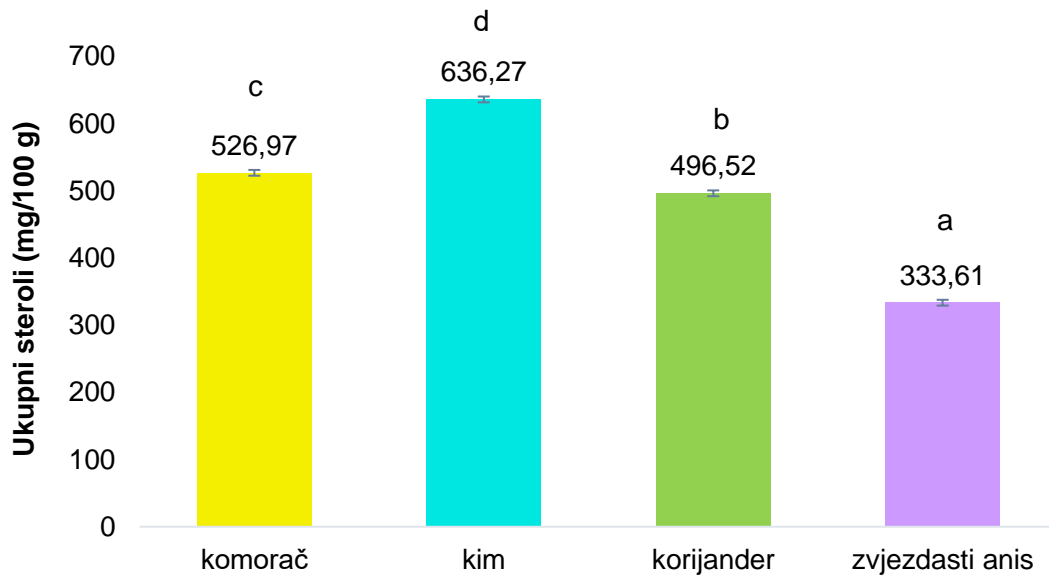
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna pogreška.

*Statistički značajna varijacija kod p≤0,05. Vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima statistički se razlikuju kod p≤0,05.

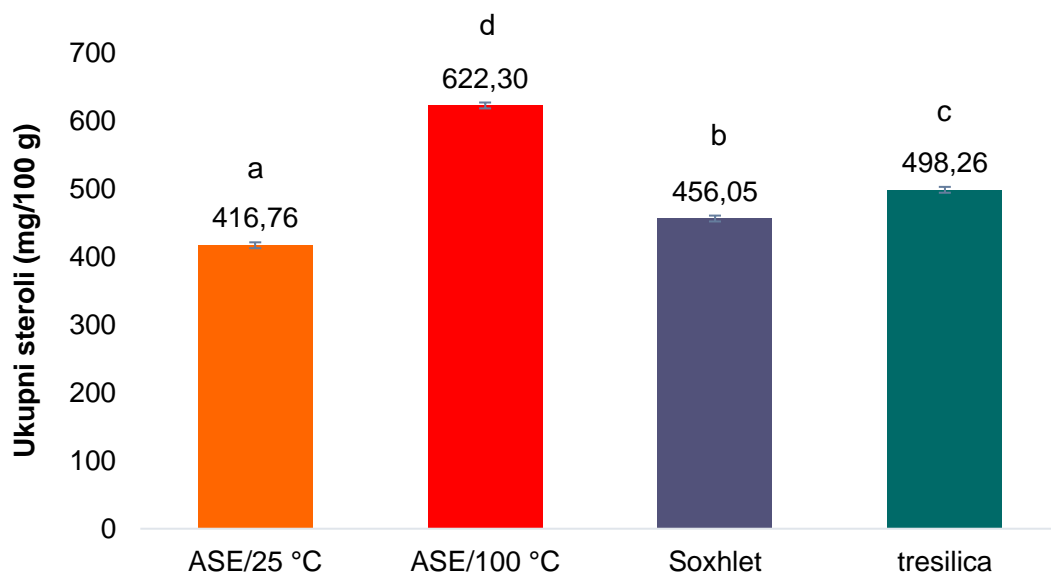
** Vrijednost predstavlja zbroj udjela C18:1n12 i C18:1n9 masnih kiselina.

4.3. SASTAV I UDIO STEROLA

a)



b)



Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod $p \leq 0,05$.

Slika 18. Udio ukupnih sterola (mg/100 g ulja) u uljima odabranih začinskih sjemenki ovisno o vrsti sjemenki (a) i metodi ekstrakcije (b)

Tablica 6. Utjecaj vrste sjemenki i metode ekstrakcije na sastav i udio (mg/100 g) sterola u uljima odabranih začinskih sjemenki

Izvor varijacije	Kampesterol	Kampestanol	Stigmasterol	Klerosterol	β-sitosterol	Sitostanol
Vrsta sjemenki	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*
komorač	23,77±0,73 ^a	16,55±0,51 ^c	156,16±1,32 ^d	0,00±0,37 ^a	135,13±1,86 ^a	14,01±0,63 ^b
kim	29,77±0,73 ^b	25,70±0,51 ^d	143,91±1,32 ^c	8,80±0,37 ^c	241,03±1,86 ^c	17,80±0,63 ^c
korijander	47,71±0,73 ^d	8,82±0,51 ^b	109,24±1,32 ^b	6,65±0,37 ^b	177,82±1,86 ^b	0,00±0,63 ^a
zvjezdasti anis	47,10±0,73 ^c	4,08±0,51 ^a	15,51±1,32 ^a	0,00±0,37 ^a	256,93±1,86 ^d	0,00±0,63 ^a
Metoda ekstrakcije	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*
ASE/25 °C	32,70±0,73 ^a	24,52±0,51 ^d	99,09±1,32 ^a	1,78±0,37 ^a	180,58±1,86 ^a	5,11±0,63 ^a
ASE/100 °C	43,09±0,73 ^c	16,93±0,51 ^c	107,77±1,32 ^b	6,52±0,37 ^c	252,36±1,86 ^c	12,80±0,63 ^c
SE	33,82±0,73 ^a	2,52±0,51 ^a	107,55±1,32 ^b	2,58±0,37 ^a	192,68±1,86 ^b	4,59±0,63 ^a
TE	38,74±0,73 ^b	11,18±0,51 ^b	110,42±1,32 ^b	4,57±0,37 ^b	185,29±1,86 ^{ab}	9,31±0,63 ^b
Prosječna vrijednost	37,09	13,79	106,21	3,86	202,73	7,95

ASE=ubrzanja ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, SE=ekstrakcija po Soxhletu, TE=ekstrakcija na tresilici pri sobnoj temperaturi
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna pogreška.

*Statistički značajna varijacija kod p≤0,05. Vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima statistički se razlikuju kod p≤0,05.

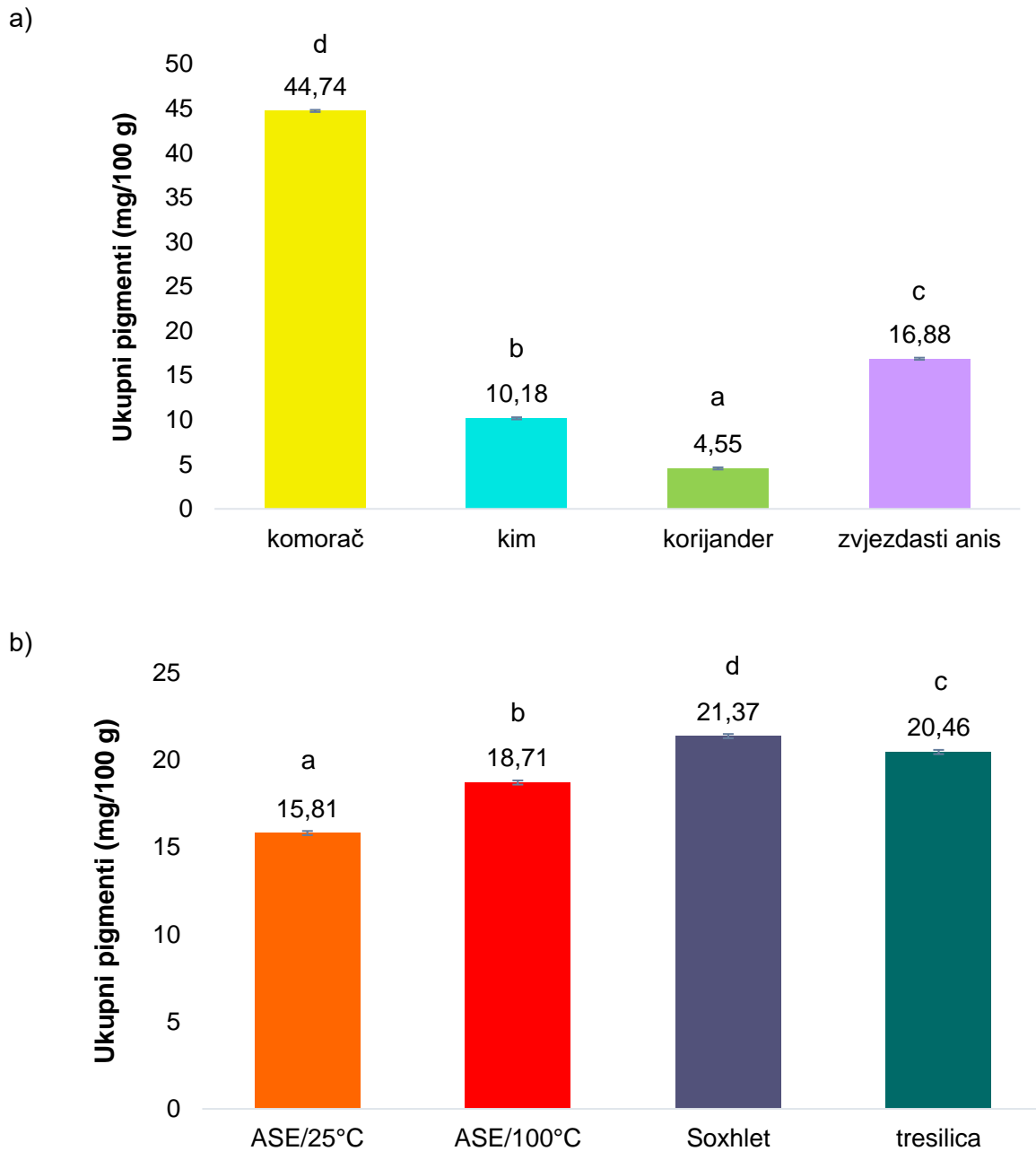
Tablica 6. Nastavak

Izvor varijacije	$\Delta 5$ -avenasterol	$\Delta 5, 24$ -stigmastadienol	$\Delta 7$ -stigmasterol	Cikloartenol	$\Delta 7$ -avenasterol
Vrsta sjemenki	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*
komorač	20,03±0,43 ^d	73,45±2,35 ^d	56,42±1,76 ^c	0,00±0,05 ^a	31,45±0,63 ^c
kim	13,65±0,43 ^b	53,44±2,35 ^c	17,09±1,76 ^b	44,62±0,05 ^b	40,47±0,63 ^d
korijander	17,35±0,43 ^c	34,17±2,35 ^b	70,40±1,76 ^d	0,00±0,05 ^a	24,35±0,63 ^b
zvjezdasti anis	0,77±0,43 ^a	5,49±2,35 ^a	2,63±1,76 ^a	0,00±0,05 ^a	1,11±0,63 ^a
Metoda ekstrakcije	p<0,01*	p<0,01*	p=0,01*	p<0,01*	p<0,01*
ASE/25 °C	8,82±0,43 ^a	7,37±2,35 ^a	35,42±1,76 ^{ab}	9,26±0,05 ^b	12,09±0,63 ^a
ASE/100 °C	19,10±0,43 ^d	77,15±2,35 ^c	40,05±1,76 ^c	6,08±0,05 ^a	40,45±0,63 ^d
SE	10,89±0,43 ^b	37,77±2,35 ^b	31,12±1,76 ^a	13,49±0,05 ^c	19,05±0,63 ^b
TE	12,99±0,43 ^c	44,26±2,35 ^b	39,94±1,76 ^c	15,79±0,05 ^d	25,78±0,63 ^c
Prosječna vrijednost	12,95	41,64	36,63	11,16	24,34

ASE=ubrzanja ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, SE=ekstrakcija po Soxhletu, TE=ekstrakcija na tresilici pri sobnoj temperaturi
 Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna pogreška.

*Statistički značajna varijacija kod p≤0,05. Vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima statistički se razlikuju kod p≤0,05.

4.4. SASTAV I UDIO PIGMENATA



Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna pogreška.
Vrijednosti označene različitim slovima statistički se razlikuju kod $p \leq 0,05$.

Slika 19. Udio ukupnih pigmenata (mg/100 g ulja) u uljima odabranih začinskih sjemenki ovisno o vrsti sjemenki (a) i metodi ekstrakcije (b)

Tablica 7. Utjecaj vrste sjemenki i metode ekstrakcije na sastav i udio (mg/100 g) pigmentata u uljima odabranih začinskih sjemenki

Izvor varijacije	Klorofil a	Klorofil b	Ukupni karotenoidi
Vrsta sjemenki	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*
komorač	23,60±0,10d	8,83±0,09d	12,31±0,02d
kim	2,71±0,10b	2,65±0,09b	4,82±0,02c
korijander	1,73±0,10a	2,16±0,09a	0,66±0,02a
zvjezdasti anis	10,94±0,10c	4,75±0,09c	1,20±0,02b
Metoda ekstrakcije	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*
ASE/25 °C	7,06±0,10a	4,18±0,09a	4,10±0,02a
ASE/100 °C	9,92±0,10c	4,70±0,09b	4,57±0,02b
SE	12,42±0,10d	3,85±0,09a	5,10±0,02c
TE	9,58±0,10b	5,66±0,09c	5,22±0,02d
Prosječna vrijednost	9,75	4,60	4,75

ASE=ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, SE=ekstrakcija po Soxhletu, TE=ekstrakcija na tresilici pri sobnoj temperaturi
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna pogreška.

*Statistički značajna varijacija kod p≤0,05. Vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima statistički se razlikuju kod p≤0,05.

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati udio i sastav nehlapljivih ulja sjemenki gorkog komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.), kima (*Carum carvi* L.), korijandera (*Coriandrum sativum* L.) i zvjezdastog anisa (*Illicium verum* Hook. f.). Također, cilj je bio ispitati i učinkovitost ekstrakcije ulja primjenom više tehnika ekstrakcije: ASE pri 25 (ASE/25 °C) i 100 °C (ASE/100 °C), ekstrakcija po Soxhlet-u (SE) te ekstrakcija na tresilici pri sobnoj temperaturi (TE). Na ovaj način dobiveno je 16 uzoraka ulja u kojima je određen sastav i udio masnih kiselina, sterola i pigmenata.

5.1. UDIO ULJA

U ovom radu korištene su osušene sjemenke, pa se na početku istraživanja provelo određivanje udjela vode u ispitivanim sjemenkama. Najviši prosječni udio vode određen je u sjemenkama zvjezdastog anisa ($14,65 \pm 0,06$ %), dok su ostale sjemenke sadržavale gotovo dvostruko niži prosječni udio vode: komorač $7,24 \pm 0,04$ %, kim $8,77 \pm 0,02$ % te korijander $7,95 \pm 0,04$ % (rezultati nisu prikazani). Obzirom na različite udjele vode u sjemenkama, udio ulja (%) dobiven ekstrakcijom izražen je na 100 g suhe tvari sjemenki.

Rezultati na Slici 15 dobiveni su na temelju provedene statističke obrade i prikazuju utjecaj ispitivanih vrsta sjemenki i primijenjenih metoda ekstrakcije na udio ekstrahiranog ulja (%).

Prinos ekstrakcije ulja uobičajeno ovisi o unutarnjim i vanjskim parametrima sustava. Unutarnji parametri vezani su uz materijal koji se ekstrahira i u slučaju ekstrakcije ulja odnose se na karakteristike kao što su udio ulja u sjemenkama, veličina čestica te građa stanica i oleosoma. Vanjski parametri ovise o primijenjenoj metodi ekstrakcije i uključuju vrstu otapala, temperaturu i vrijeme ekstrakcije, intenzitet miješanja, omjer sjemena i otapala i sl. (Lebovka i sur., 2016).

Udjeli ulja dobiveni ekstrakcijom u sklopu ovog istraživanja statistički su se značajno razlikovali ($p < 0,01$) ovisno o vrsti sjemenki, pri čemu su najviši prosječni udjeli ekstrahirani iz sjemenki zvjezdastoga anisa ($12,34 \pm 0,03$ %) i korijandera ($12,30 \pm 0,03$ %), dok je ekstrakcijom sjemenki kima i komorača dobiven niži udio ulja (prosječno kim $8,49 \pm 0,03$ %, komorač $7,89 \pm 0,03$ %) (Slika 15a). Prema Ramadanu i Mörselu (2002a), udio ulja u sjemenkama korijandera bio je 28,4 %, dok su Kozłowska i sur. (2016) potvrdili niži udio u istim sjemenkama (20,00 %). Isti autori navode 20,13 % ulja u sjemenkama kima, za koji Sedlakova i sur. (2001) navode udio ulja u rasponu od 13-21 %. Sriti i sur. (2010) iz sjemenki komorača ekstrahirali su 22,6 % ulja,

Matthäus i Musazcan Özcan (2015) 18,2 % ulja, dok su Coşge i sur. (2008) iz sjemenki gorkog komorača ekstrahirali znatno niži udio ulja (14,41 %). Navedene vrijednosti više su od prosječnih udjela ulja dobivenih u ovom radu. S druge strane, Cu i sur. (1990) su iz sjemenki zvjezdastog anisa ekstrahirali 8 % ulja, dok za istu vrstu sjemenki Madhu i sur. (2014) navode 7,65 % ulja što su niže vrijednosti od onih dobivenih u ovom radu. Razlozi zamijećenih razlika mogu biti različito geografsko porijeklo sjemenki, stupanj zrelosti, uvjeti uzgoja, varijetet i dr. Također, Yusuf (2018) navodi da je za izdvajanje ulja vrlo bitno i mljevenje ili drobljenje sjemenki prije ekstrakcije kako bi se stanice koje sadrže ulje razbile i ispustile ulje, a osim toga važno je i prethodno tretiranje sjemenki poput sortiranja i čišćenja. Laribi i sur. (2009) u sjemenkama kima uzgojenim u uvjetima umjerene i teške suše utvrdili su smanjenje udjela ulja za 35,17 % odnosno 56,59 %.

Kao što je navedeno, razlike u udjelima ulja mogu nastati uslijed korištenja različitih metoda ekstrakcije ili primjena različitog otapala. U ovom istraživanju ispitana su 2 tipa konvencionalnih metoda ekstrakcije ulja (SE i TE) te ASE kao novija i napredna tehnika ekstrakcije. SE i TE pripadaju konvencionalnim metodama, čije je vrijeme ekstrakcije dugotrajno te zahtijevaju upotrebu većih količina otapala (López-Bascón i Luque de Castro, 2020). Nasuprot tome, ASE kao novija metoda znatno skraćuje vrijeme ekstrakcije, automatizirana je te ekološki prihvatljivija zbog smanjene upotrebe otapala (Richter i sur., 1996). Za ovo istraživanje, ASE je provedena pri temperaturama od 25 i 100 °C kao alternativa uvjetima SE i TE, gdje se posebno stavio naglasak na utjecaj povišenog tlaka kao specifičnosti ASE metode.

Metode ekstrakcije primijenjene u ovom radu pokazale su statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) na udio ulja (Slika 15b). Može se primijetiti da je najviši prosječni udio ulja ekstrahiran primjenom SE ($14,65 \pm 0,03$ %), s TE je dobiven udio od $10,83 \pm 0,03$ %, dok je ASE rezultirala najnižim prosječnim udjelima ulja za obje testirane temperature: $6,71 \pm 0,03$ % (ASE/25 °C), odnosno $8,83 \pm 0,03$ % (ASE/100 °C). Ipak, unatoč rezultatima statističke analize, trend udjela ulja obzirom na metodu ekstrakcije nije bio jednak za svaku vrstu sjemenki. Iz Slike 20 vidljivo je da su primjenom SE dobiveni najviši udjeli ulja iz sjemenki kima ($14,79 \pm 0,13$ %) i korijandera ($20,42 \pm 0,04$ %), ali kod sjemenki komorača TE je rezultirala najvišim udjelom ulja ($11,41 \pm 0,23$ %). S druge strane, ASE/100 °C je bila najviše učinkovita za ekstrakciju ulja iz sjemenki zvjezdastog anisa ($13,97 \pm 0,08$ %). O primjeni različitih tehnika ekstrakcije na ekstrakciju nehlapljivih ulja iz nekih od sjemenki koje su ispitivane u ovom istraživanju ima vrlo malo dostupnih literaturnih podataka, a za neke sjemenke čak nedostaju literaturni podaci, pa je bilo zahtjevno detaljno usporediti dobivene rezultate s podacima iz dostupne literature. Također, prema našim saznanjima, ovo istraživanje predstavlja prvo istraživanje koje je primijenilo ASE za ekstrakciju ulja iz ispitivanih sjemenki. Među rijetkim objavljenim

istraživanjima nalazi se istraživanje Coşge i sur. (2008), koji su nehlapljivo ulje iz sjemenki komorača ekstrahirali primjenom SE/eter i udio ulja je iznosio 14,41 %, što je više od rezultata dobivenih u ovom radu ($9,74 \pm 0,04$ %; Slika 20). Uočene razlike između literaturnih podataka i rezultata udjela ulja dobivenih u ovom radu moguće su zbog primjene različitih otapala, ali kao što je već spomenuto i razlika u ispitivanom uzorku (geografsko porijeklo, stupanj zrelosti, uvjeti uzgoja, varijetet i dr.). Kozłowska i sur. (2016) ispitali su utjecaj dviju metoda ekstrakcije (SE/*n*-heksan te TE/kloroform/metanol) na ekstrakciju ulja iz nekoliko vrsta sjemenki među kojima su bile i sjemenke anisa (*Pimpinella anisum* L.), korijandera te kima. Prema njihovim rezultatima, nije bilo značajnih razlika u udjelu ulja u spomenutim sjemenkama obzirom na metodu ekstrakcije. Castejón i sur. (2018) proveli su istraživanje u kojem su usporedili više naprednih tehnika ekstrakcije [ASE, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)] s konvencionalnom SE za ekstrakciju ulja iz sjemenki biljke *Echium plantagineum* L. Također, varirali su i upotrebu otapala za ekstrakciju (etil-acetat, etanol, voda i vodene otopine etanola) kako bi razvili „zelenu“ ekstrakciju bez upotrebe heksana. Uspoređujući njihove rezultate dobivene primjenom ASE na 60 °C (što je približno temperatura vrelišta heksana) uz *n*-heksan kao otapala sa SE uz isto otapalo, također se može primijetiti dobiveno niže iskorištenje tijekom primjene ASE ($26,4 \pm 0,03$ %) u odnosu na SE ($31,3 \pm 0,2$ %). Međutim, povišenje temperature uz etanol kao otapalo rezultiralo je povećanjem iskorištenja i višim udjelima ekstrahiranog ulja, pokazujući ASE kao odličnu alternativu konvencionalnoj SE, budući da je vrijeme ekstrakcije znatno smanjeno (ASE 20 min prema SE 8 h) kao i upotreba većih količina otapala. Lohani i sur. (2015) u svom su istraživanju ispitali utjecaj temperature (80, 100 i 120 °C) i vremena ekstrakcije (40, 65 i 90 min) primjenom ASE i *n*-heksana te etil-acetata kao otapala na ekstrakciju ulja iz sjemenki uljane repice (*Brassica napus* L.), podlanka (*Camelina sativa* L. Crantz), lana (*Linum usitatissimum* L.) i gorušice (*Brassica juncea* L.). Također su usporedili udjele ulja dobivene s ASE i SE, ali samo uz *n*-heksan kao ekstrakcijsko otapalo. Udjeli dobivenih ulja značajno su varirali ($p < 0,05$) obzirom na ispitivane parametre, ali je iz rezultata vidljivo da udio ulja ekstrahiran s ASE generalno raste s porastom temperature i vremenom ekstrakcije te su najviši udjeli dobiveni pri 120 °C i 90 min ekstrakcijom s oba otapala, pri čemu autori prednost daju etil-acetatu. Međutim, usporedbom najviših vrijednosti udjela ulja dobivenih s ASE i *n*-heksanom s udjelima ulja dobivenim sa SE, primjećuju se znatno viši udjeli dobiveni sa SE, što je slučaj i u ovom istraživanju. Nadalje, usporedbom vrijednosti udjela ulja u njihovom istraživanju dobivenih s ASE pri 100 °C i najkraćem vremenu ekstrakcije (40 min), što bi bilo najbliže ASE uvjetima korištenim u ovom istraživanju, udjeli ulja dobiveni sa SE viši su 40-65 % (ovisno o vrsti sjemenki) u odnosu na udjele dobivene s ASE. Približno isti rezultati proizlaze i iz ovog istraživanja, gdje je prosječno 68 % više ulja ekstrahirano sa SE u odnosu na ASE/100 °C (Slika 15b). Dunford i Zhang (2003) su usporedbom udjela ulja iz pšeničnih klica

ekstrahiranog s ASE (105 °C, 30 min) i SE dobili približne vrijednosti za obje tehnike (ASE 11,0±0,1 %, SE 10,8±0,1 %), pri čemu naglašavaju prednost ASE u smislu znatno kraćeg vremena ekstrakcije (ASE 30 min prema SE 360 min) i količine otapala (ASE 80 mL prema SE 130 mL). Nasuprot gore navedenom, Krulj i sur. (2016) navode učinkovitiju ekstrakciju ulja iz 3 genotipa sjemenki amaranta (*Amaranthus* sp.) s ASE (65,1-78,1 %) u odnosu na SE (62,1-75,7 %). Temeljem svega, vidljivo je da udjeli ulja ekstrahirani s ASE znatno variraju ovisno o ispitivanom uzorku, uvjetima ekstrakcije te ekstrakcijskom otapalu. Također, evidentno je da samo utjecaj povišenog tlaka (ASE/25 °C) ne rezultira zadovoljavajućim iskorištenjem te da je kombinacija povišenih temperatura i tlaka ključna za učinkovitiju ASE. Slijedom svega navedenog, za buduća istraživanja ekstrakcije ulja iz začinskih sjemenki s ASE važno je provesti daljnje optimiranje ekstrakcijskih uvjeta uz primjenu temperatura >100 °C, ali i drugih otapala radi povećanja učinkovitosti, odnosno iskorištenja.

5.2. SASTAV I UDIO MASNIH KISELINA

Kao što je navedeno u prethodnim poglavljima, sjemenke iz botaničke obitelji *Apiaceae* često se koriste kao začini ili sirovina za proizvodnju kozmetičkih i farmaceutskih pripravaka. Neki od njihovih glavnih predstavnika su kim, komorač i korijander koji su bili u fokusu ovog rada. Do sada su znanstvena istraživanja u većoj mjeri bila usmjerena na eterična ulja ovih biljaka s malo objavljenih podataka na temu njihovih nehlapljivih ulja. Prema postojećim literaturnim podacima, dominantna masna kiselina (i do preko 70 % udjela) u uljima ovih sjemenki je petroselinska kiselina (C18:1n12). Petroselinska kiselina je neuobičajena masna kiselina s jednom dvostrukom vezom na 6, 7 poziciji koja se oksidacijskim procesima može razgraditi na laurinsku (C12:0) i adipinsku kiselinu (Kozłowska i sur., 2016). Takav položaj također značajno utječe na kemijska svojstva pa joj je npr. točka tališta na 30 °C dok je oleinskoj masnoj kiselini iste kemijske formule (C18:1n9), ali drugačijeg položaja dvostruke veze na 14 °C. Do sada postoji malo istraživanja na temu petroselinske kiseline, ali utvrđena su njena antimikrobna svojstva i inhibicija sinteze arahidonske kiseline čime se može spriječiti vazokonstriktorski efekt uzrokovan pretjeranom sintezom ove masne kiseline u organizmu. Petroselinska masna kiselina koristi se i u kozmetičkim formulacijama za hidrataciju i „anti-age“ tretmane kože te reduciranje kožnih iritacija. Također, adipinska kiselina, kao produkt oksidacije petroselinske kiseline, može se iskoristiti u proizvodnji najlona i surfaktanata dok se laurinska kiselina koristi u proizvodnji deterdženata, kozmetike i farmaceutskoj industriji (Isbell i sur., 2006; Delbeke i sur., 2016). Zanimljivo je kako kod komorača, za razliku od drugih biljaka iz ove obitelji, prisustvo petroselinske kiseline nije potvrđeno u drugim dijelovima biljke – stabljika, list, korijen (Barros i sur., 2010). Četvrta biljka istraživana u ovom radu, zvjezdasti anis, pripada botaničkoj obitelji *Schisandraceae* i ranija istraživanja također su bila fokusirana

na eterična ulja s vrlo malo podataka o sastavu nehlapljivih ulja.

Standardna metoda određivanja sastava masnih kiselina u uljima (HRN EN ISO 12966) uključuje metilaciju masnih kiselina u metanolnoj otopini kalijevog hidroksida te primjenu plinske kromatografije uz korištenje FID detektora (GC-FID). Obzirom na izrazitu strukturnu sličnost između oleinske i petroselinske masne kiseline, kod ove se metode javljaju problemi pri točnoj detekciji i identifikaciji tih dviju molekula zbog njihovog nepotpunog razdvajanja. Iz tog razloga velik dio ranijih radova koji obrađuju ovu temu prikazuju zbroj udjela oleinske i petroselinske masne kiseline dok su malobrojni istraživači posljednjih 15-tak godina probali riješiti ovaj problem upotrebom drugih alkohola u pripremi estera za GC-FID analize (Charvet i sur., 1991; Isbell i sur., 2006). Postupkom pripreme metilnih estera i uvjetima kromatografske analize primijenjenih u ovom istraživanju, petroselinska i oleinska masna kiselina razdvojene su samo u ulju kima. U uljima komorača i korijandera, koja sadrže visoke udjele petroselinske kiseline, došlo je do preklapanja njihovih pikova koje nije bilo moguće razdvojiti uobičajenim modifikacijama kromatografskih uvjeta (volumen injektiranja, split omjer), dok je kod ulja zvjezdastog anisa zabilježeni pik pripadao isključivo oleinskoj buduću da ono prema literaturi ne sadrži petroselinsku masnu kiselinu (George, 2012). Obzirom na dobivene rezultate u ovom istraživanju te u svrhu pouzdanije statističke obrade rezultata, odabran je zbrojeni prikaz ovih masnih kiselina, a sama analitička metoda zahtijeva dodatne modifikacije i prilagodbu uljima s visokim udjelom petroselinske masne kiseline prvenstveno kod pripreme uzoraka za plinsku kromatografiju.

Iz podataka za udio zasićenih i nezasićenih masnih kiselina prikazanih na Slikama 16 i 17 jasno su vidljive značajne razlike u sastavu masnih kiselina ulja pojedinih sjemenki, posebice ulja korijandera s jedne i zvjezdastog anisa s druge strane. Udio ukupnih zasićenih masnih kiselina bio je daleko najviši u ulju zvjezdastog anisa i u prosjeku je iznosio $72,31 \pm 0,07$ %, dok su ulja kima i komorača sadržavala oko 30 % zasićenih masnih kiselina (Slika 16a). Ulje korijandera sadržavalo je prosječno najniži udio zasićenih masnih kiselina, svega $4,86 \pm 0,07$ %, ali je, s druge strane, u njemu prosječni udio nezasićenih masnih kiselina bio najviši, odnosno $95,14 \pm 0,07$ % (Slika 17a). Sastav masnih kiselina sjemenki ovisi o njegovim genetskim karakteristikama, ali snažan utjecaj na biosintezu masnih kiselina imaju i geografska širina te klimatske prilike uzgoja. Omjer zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u uljima sjemenki omogućava optimizaciju zaliha i razinu proizvodnje energije za vrijeme klijanja, a to općenito znači da će biljke koje su prilagođene rastu pri nižim okolišnim temperaturama imati više udjele nezasićenih masnih kiselina (Linder, 2000). Rezultati dobiveni na osnovu ovog istraživanja također potvrđuju taj generalni princip budući da je kao zemlja porijekla korijandera korištenog u ovom istraživanju navedena EU, kima i komorača Turska te zvjezdastog anisa Vijetnam, a stupanj zasićenosti masnih kiselina ulja izoliranih iz tih biljaka

upravo je proporcionalan geografskoj širini navedenih zemalja porijekla.

Iz rezultata za udjele pojedinih masnih kiselina prikazanih u Tablicama 4 i 5 te 8 i 9, općenito je vidljivo da u uzorcima kima, korijandera i komorača dominira zbroj petroselinske i oleinske masne kiseline (prosječno $43,62-81,07 \pm 0,15$ %) (Tablica 5), dok je laurinska kiselina dominantna masna kiselina u uzorcima zvjezdastog anisa s prosječno $61,87 \pm 0,05$ % (Tablica 4). Laurinska masna kiselina je ujedno i druga najzastupljenija u uljima kima i komorača (kim $21,66 \pm 0,05$ %, komorač $24,63 \pm 0,05$ %). U svim uzorcima u značajnoj količini identificirane su i linolna (C18:2; $8,52-24,15 \pm 0,10$ %), stearinska (C18:0; $0,71-1,64 \pm 0,01$ %) i palmitinska (C16:0; $2,14-8,10 \pm 0,01$ %) masna kiselina te kapronska kiselina (C6:0; $0,11-6,20 \pm 0,02$ %). U sastavu ispitivanih ulja, ovih sedam masnih kiselina čine prosječno $98,36$ % ukupnog sastava. U manjim količinama i tragovima detektirano je još 13 masnih kiselina. Iz grupe zasićenih masnih kiselina identificirane su i kaprinska (C10:0), miristinska (C14:0), margarinska (C17:0), arahinska (C20:0), behenska (C22:0), dokotriozenska (C23:0) i lignocerinska kiselina (C24:0) (Tablice 4 i 8). Osim navedenih, ostale identificirane nezasićene masne kiseline su miristoleinska kiselina (C14:1), palmitoleinska kiselina (C16:1), margaroleinska kiselina (C17:1), gondoinska kiselina (C20:1n9), α -linolenska kiselina (C18:3n3) i γ -linolenska kiselina (C18:3n6). Njihov ukupan udio od $3,01$ % najviši je kod uzorka ulja zvjezdastog anisa dobivenog sa SE, dok je najniži udio, od samo $0,38$ %, kod ulja korijandera dobivenog s ASE/25 °C (Tablica 9).

Statistička analiza rezultata prikazana u Tablicama 4 i 5 ukazuje na značajne ($p < 0,01$) razlike profila masnih kiselina i specifičnosti vezanih uz pojedinu biljku. Prosječno najviši udio petroselinske i oleinske masne kiseline određen je u ulju korijandera ($81,07 \pm 0,15$ %). Ovaj rezultat usporediv je s rezultatima istraživanja Kozłowska i sur. (2016) koji su u ulju korijandera identificirali $73,41$ % petroselinske i $6,03$ % oleinske (ukupno $79,43$ %), te Uitterhaegen i sur. (2016) kod kojih je zbroj iznosio $78,60$ %, odnosno identificirano je $72,6$ % petroselinske te $6,0$ % oleinske kiseline. Unatoč problematici razdvajanja ovih masnih kiselina na GC-FID (Isbell i sur., 2006), niti jedan od navedenih autora ne navodi modifikaciju standardnih metoda radi njihove bolje detekcije i kvantifikacije. Msaada i sur. (2009a) u istom su ulju detektirali $80,9$ % petroselinske masne kiseline, dok je udio oleinske bio svega $0,2$ %. S druge strane, Yetim i sur. (2008) u uljima korijandera navode samo oleinsku masnu kiselinu ($78,82$ %). U ulju korijandera utvrđeno je prosječno i $3,35 \pm 0,01$ % palmitinske i $0,71 \pm 0,01$ % stearinske kiseline (Tablica 4). Navedene vrijednosti ovih zasićenih masnih kiselina približno su jednake podacima iz istraživanja Reiter i sur. (1998) koji su u sjemenkama korijandera odredili vrijednosti od $3,8$ % za palmitinsku i $0,7$ % za stearinsku kiselinu.

Ulje komorača prosječno sadrži $60,20 \pm 0,15$ % petroselinske i oleinske masne kiseline, a zbroj

ovih masnih kiselina bio je dominantan u ulju komorača i u istraživanju Matthäus i Musazcan Özcan (2015), gdje je njihov udio bio još viši (80,5 %). Ulje kima je među biljkama iz obitelji *Apiaceae* imalo najniže prosječne vrijednosti petroselinke i oleinske kiseline ($43,62 \pm 0,15$ %), što je niže od rezultata Kozłowska i sur. (2016) koji su u ulju kima utvrdili 62,49 % ovih masnih kiselina. Palmitinska i stearinska kiselina identificirane su u vrijednostima od prosječno $3,14 \pm 0,01$ % i $1,13 \pm 0,01$ % u ulju komorača te $2,14 \pm 0,01$ % i $0,95 \pm 0,01$ % u ulju kima (Tablica 4) što je također u skladu s rezultatima istraživanja Reiter i sur. (1998).

Specifičnost ulja kima, osim nižeg udjela zbroja petroselinke i oleinske kiseline, značajno ($p < 0,01$) je viši udio kapronske (C6:0) od prosječno $6,20 \pm 0,02$ % (Tablica 4). Ova masna kiselina je vrlo netipična za biljna ulja i rijetko se javlja, uglavnom u tragovima. Iako se može dobiti iz palminog ili kokosovog ulja putem frakcijske destilacije, njen udio ne prelazi 1 %. Ima vrlo široku primjenu kao antimikrobni preparat u farmaceutskoj industriji, aditiv u prehrani svinja i peradi, aditiv u prehrambenoj industriji, sirovina za kemijsku industriju i mogući prekursor u proizvodnji biogoriva (De Araújo Cavalcante i sur., 2017). Obzirom da literaturni podaci rijetko prikazuju rezultate za masne kiseline nižeg reda od C12 (Laribi i sur., 2009; Kozłowska i sur., 2016), ovaj rezultat nije usporediv s ranijim istraživanjima. Prisutnost ove masne kiseline također može biti razlog relativno nižeg udjela petroselinke i oleinske kiseline.

U ulju zvjezdastog anisa ne nalazi se petroselinška masna kiselina već samo oleinska u prosječnom udjelu $12,81 \pm 0,15$ % (Tablica 5), koja uvelike može doprinijeti zdravlju organizma jer djeluje antitrombotički, antitrombotski, smanjuje LDL kolesterol te povisuje udio HDL lipoproteina (Dabović-Rac i sur., 2005). Iako su istraživanja sastava masnih kiselina izuzetno rijetka, George (2012) navodi da je oleinska kiselina u ulju zvjezdastog anisa zastupljena u udjelu od 63,24 %, što je znatno više od rezultata ovog istraživanja. Navedene razlike mogu biti uvjetovane čimbenicima poput vrste sjemenki, područje i uvjeti uzgoja i dr. (Onemli, 2012). Izrazito visok udio laurinske masne kiseline u ulju zvjezdastog anisa zabilježen u ovom radu također govori o izrazito velikom potencijalu ove sirovine. Laurinska kiselina, odnosno monolaurin, monoester koji nastaje iz laurinske kiseline, posjeduju antimikrobna svojstva, odnosno antibakterijsko i antivirusno djelovanje. Također, vrlo je učinkovit protiv gram-pozitivnih bakterija, inhibira rast niz štetnih kvasaca, gljivica i protozoa, a uspješno djeluje i protiv virusa poput ospica i HIV-a (Lieberman i sur., 2006). Nadalje, George (2012) je naveo kako sjemenke zvjezdastog anisa sadrže 4,43 % miristinske i 7,93 % stearinske kiseline, što je više od koncentracija tih masnih kiselina u ulju zvjezdastog anisa određenih u ovome radu (prosječne vrijednosti za miristinsku $0,06 \pm 0,00$ % i stearinsku $1,64 \pm 0,01$ %; Tablica 4). Također, prema Li-juanu (2012) dominantne zasićene masne kiseline u ulju zvjezdastog anisa su palmitinska, margarinska te stearinska kiselina, dok su prema našim rezultatima iste kiseline izolirane u prosječnim udjelima od $8,10 \pm 0,01$ % (palmitinska kiselina), $0,06 \pm 0,00$ %

(margarinska kiselina) i $1,64\pm 0,00$ % (stearinska kiselina) (Tablica 4).

Iz rezultata u Tablici 5 također je vidljivo da su se ulja sjemenki međusobno statistički značajno razlikovala u udjelu pojedinih polinezasićenih masnih kiselina – linolne, α -linolenske i γ -linolenske ($p < 0,01$). U svim uzorcima dominira linolna kiselina (prosječno $8,52$ do $24,15\pm 0,10$ %). Ulje kima pokazalo se kao ulje s najvišim udjelom svih triju polinezasićenih masnih kiselina – prosječno $24,15\pm 0,10$ % linolne, $0,34\pm 0,01$ % α -linolenske i $0,10\pm 0,00$ % γ -linolenske. Linolna kiselina je vrlo interesantna mnogim znanstvenicima zbog učinaka na sastav tijela i regulaciju tjelesne masne mase, dok je od ostalih korisnih učinaka bitno spomenuti imunomodulirajuće, antikancerogeno, antidijabetogeno i antiaterogeno djelovanje (Rainer i Heiss, 2004). Slične rezultate o udjelu linolne i α -linolenske kiseline u uljima kima i korijandera navode Kozłowska i sur. (2016). Prema njihovim rezultatima, vrijednost linolne kiseline bila je $31,00$ % za kim i $15,35$ % za korijander, dok su vrijednosti α -linolenske kiseline bile $0,37$ % (kim) te $0,22$ % (korijander). Nasuprot tome, Coşge i sur. (2008) odredili su nešto više udjele linolne kiseline u ulju gorkog komorača ($14,78$ %) kao i George (2012) u ulju zvjezdastog anisa ($24,4$ %). Kozłowska i sur. (2016) istražili su utjecaj dviju metoda ekstrakcije (SE i metodu po Folchu) i obje su imale podjednak učinak na ekstrakciju polinezasićenih masnih kiselina iz sjemenki kima i korijandera.

Primijećene varijacije u udjelima masnih kiselina dobivenih u ovom radu i istraživanjima drugih autora uobičajena su pojava kod ulja istih biljnih vrsti i ovise o brojnim utjecajima: sorti, vremenu žetve/berbe, vrsti tla te klimatskim uvjetima za vrijeme rasta biljke (Onemli, 2012). Međutim, razlike u navedenim rezultatima također upućuju na oprez pri analitičkom određivanju i detekciji petroselinske masne kiseline.

Zbog svog kemijskog sastava, ulja komorača i korijandera mogla bi se koristiti i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Sayed-Ahmad i sur., 2018). Isti autori naveli su kako je 2014. godine Europska Komisija odobrila upotrebu ulja korijandera kao novog prehrambenog sastojka upravo zbog bogatstva petroselinskom kiselinom te smatraju kako i ulje komorača može predstavljati novi prehrambeni sastojak jer sadrži preko 80 % petroselinske kiseline u ukupnom udjelu masnih kiselina. Budući da je petroselinska kiselina vrlo vrijedna sirovina za sintezu različitih spojeva u kemijskoj industriji, zastupljenost ove masne kiseline od iznimne je važnosti. Osim toga, ima potencijalno protuupalno djelovanje te se također može koristiti u kozmetičkim formulacijama kao hidratantno sredstvo (Sayed-Ahmad i sur., 2017). I druga istraživanja potvrđuju zastupljenost petroselinske kiseline u ispitivanim sjemenkama, pa su tako Coşge i sur. (2008) u ulju komorača odredili $72,07$ % petroselinske kiseline, dok Kozłowska i sur. (2016) navode $73,41\pm 0,05$ % iz ulja korijandera te $33,37\pm 0,04$ % iste kiseline iz ulja kima. U istome su radu u uljima identificirane i palmitoleinska kiselina (C16:1) u udjelima

od 0,05 % za kim i 0,28 % za korijander, oleinska kiselina u udjelima od 29,12 % za kim i 6,03 % za korijander te gondoinska kiselina koje ima 0,24 % u kimu i 0,22 % u korijanderu, čije su vrijednosti usporedive s rezultatima u ovom radu.

U Tablicama 4 i 5 prikazani su i rezultati statističke analize utjecaja metode ekstrakcije na sastav masnih kiselina u ispitivanim uljima. Iako je metoda ekstrakcije imala značajan utjecaj ($p < 0,01$) na udjele većine identificiranih masnih kiselina, najizraženije razlike vidljive su u udjelu zbroja petroselinske i oleinske (Tablica 5) te udjelu laurinske masne kiseline (Tablica 4), pri čemu ovisno o metodi ekstrakcije i temperaturnim uvjetima dolazi do relativnog porasta udjela laurinske i proporcionalnog smanjenja udjela petroselinske. Najviši prosječni udio petroselinske i oleinske zabilježen je kod uzoraka dobivenih sa SE ($53,37 \pm 0,15$ %), a najniži kod uzoraka dobivenih s ASE ($25\text{ °C } 46,05 \pm 0,15$ %, $100\text{ °C } 47,19 \pm 0,15$ %), dok su kod istih ASE uvjeta prosječne vrijednosti laurinske masne kiseline bile najviše ($25\text{ °C } 31,36 \pm 0,05$ %, $100\text{ °C } 29,44 \pm 0,05$ %). Iako je odavno poznato kako pri oksidaciji petroselinske kiseline dolazi do nastanka laurinske i adipinske kiseline (Charvet i sur., 1991), sam mehanizam nije detaljno objašnjen, a prema našim saznanjima i dostupnoj znanstvenoj literaturi u ovom istraživanju prvi put su objavljeni rezultati ekstrakcije ulja bogatih petroselinskom masnom kiselinom pri povišenim tlakovima. Budući da je statističkom metodom utvrđivanja korelacije zbroja petroselinske i oleinske te laurinske masne kiseline utvrđen koeficijent korelacije $r = -0,957$ koji pokazuje izuzetno jaku negativnu korelaciju ovih spojeva, dobiveni rezultati upućuju na značajnu pojavu razgradnje petroselinske masne kiseline uzrokovanu primjenom ASE.

Kao što je spomenuto, SE je rezultirala najvišim prosječnim udjelom petroselinske i oleinske ($53,37 \pm 0,15$ %) te najnižim prosječnim udjelom laurinske masne kiseline ($22,85 \pm 0,05$ %). Pretpostavlja se da kod SE koja se odvijala u trajanju od 8 h u zatvorenom sustavu pri temperaturi vrelišta otapala (za *n*-heksan iznosi 69 °C) i s malim dodirima s kisikom nije došlo do značajnije oksidacije (Tablice 4 i 5). S druge strane, prema dobivenim rezultatima, većim kontaktom s kisikom uzrokovanim višestrukim izmućkivanjem s *n*-heksanom tijekom TE ili povećanjem tlaka i/ili temperature tijekom ASE dolazi do smanjenja petroselinske i oleinske te porasta laurinske. Kao što je već spomenuto, najniža prosječna vrijednost petroselinske i oleinske od $46,05 \pm 0,15$ % te najviša prosječna vrijednost laurinske kiseline od $31,36 \pm 0,05$ % zabilježene su kod ASE/ 25 °C , a ove razlike odražavaju se i na primijećene razlike u udjelu ukupnih zasićenih i nezasićenih masnih kiselina prikazanih na Slikama 16b i 17b. Budući da na primjeru ekstrakcije lanenog ulja s *n*-heksanom putem SE i ASE/ 100 °C nije primijećena nikakva značajna promjena u udjelima oleinske masne kiseline (18,30 i 18,21 %) (Khattab i Zeitoun, 2013), može se pretpostaviti kako su glavne oksidacijske promjene doista nastale na samoj petroselinskoj masnoj kiselini. Za jasnije zaključke ovog fenomena potrebna su daljnja istraživanja, ali prema dosadašnjim rezultatima možemo zaključiti kako je petroselinska

masna kiselina znatno osjetljivija na uvjete ASE, odnosno uvjete povišenog tlaka. Također, polinezasićene masne kiseline smatraju se daleko podložnijima oksidaciji od mononezasićenih masnih kiselina. Udio esencijalne linolne masne kiseline (C18:2n6) prosječno je najviši kod SE (16,20±0,10 %) i najniži kod ASE/25°C (13,70±0,10 %). Također, vrijednosti za α-linolensku masnu kiselinu (C18:3n3) slijede isti trend unatoč malim vrijednostima – SE (0,26±0,01 %) i ASE/25°C (0,18±0,01 %). Suprotno ovim rezultatima, Khattab i Zeitoun (2013) ne navode veće razlike između rezultata SE (56,28 %) i ASE/100 °C (56,42 %) za α-linolensku unatoč njenoj izrazito velikoj sklonosti oksidaciji. Udio γ-linolenske masne kiseline (18:3n6) je prenizak (velika prosječna vrijednost 0,06 %) kako bi donijeli detaljniji zaključak.

5.3. SASTAV I UDIO STEROLA

Osim masnim kiselinama, ulja sjemenki bogata su i drugim vrstama lipida, među kojima su značajni i biljni steroli ili fitosteroli. Steroli se obzirom na broj metilnih skupina na atomu C-4 dijele u tri podvrste: (i) 4,4'-dimetilsteroli, (ii) 4-metilsteroli i 4-desmetilsteroli. 4,4'-dimetil i 4-metilsteroli su metabolički intermedijeri u putevima biosinteze 4-desmetilsterola. Dodatno, prema razlici u poziciji dvostruke veze u sterolnom prstenu fitosteroli se dijele na Δ5- i Δ7-sterole (Zhang i sur., 2006). Sastav i udio sterola određen je u svim ispitivanim uljima, a dobiveni rezultati su prikazani na Slici 18 te Tablicama 6 i 10.

U uljima sjemenki identificirani su kampesterol, kampestanol, stigmasterol, klerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ5-avenasterol, Δ5,24-stigmastadienol, Δ7-stigmasterol, cikloartenol i Δ7-avenasterol (Tablice 6 i 10).

Obzirom na vrstu sjemenki statistička analiza pokazala je značajne razlike ($p < 0,01$) u udjelu ukupnih sterola u ispitivanim uljima (Slika 18a). Najviši prosječni udio sterola zabilježen je u ulju kima (636,27±4,33 mg/100 g), kojeg slijede ulje komorača (526,97±4,33 mg/100 g) i korijandera (496,52±4,33 mg/100 g), a ulje zvjezdastog anisa pokazalo je prosječno najnižu zastupljenost sterola (333,61±4,33 mg/100 g) (Slika 18a). Dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim podacima Kozłowska i sur. (2016). Međutim, Ramadan i Mörsel (2002a), koji su također ispitivali sastav sterola u ulju korijandera, prikazali su nešto više koncentracije ukupnih sterola (518,6 mg/100 g). S druge strane, Islam i sur. (2017) naveli su kako je koncentracija ukupnih sterola u sjemenkama komorača 156,3±5,1 mg/100 g uzorka, što predstavlja znatno nižu koncentraciju u usporedbi s rezultatima u ovom radu. Varijabilnost u rezultatima navedenih istraživanja može se objasniti različitim uvjetima uzgoja vezanim uz geografsko porijeklo biljnog materijala (Kodad i sur., 2015), ali i razlikama u genskoj strukturi pojedinog varijeteta (Yamaya i sur., 2007).

Nadalje, iz Tablice 6 vidljivo je da je vrsta sjemenki ponovo pokazala statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) na sastav i udio (mg/100 g) pojedinačnih sterola u uljima sjemenki. Sterol koji se u najvećem udjelu nalazi u uljima kima, korijandera i zvjezdastog anisa jest β -sitosterol s prosječnom vrijednosti od 202,73 mg/100 g, a najviša koncentracija β -sitosterola zabilježena je u ulju zvjezdastog anisa (256,93 \pm 1,86 mg/100 g). Ulje kima također sadrži zamjetnu koncentraciju β -sitosterola (prosječno 241,03 \pm 1,86 mg/100 g), dok je koncentracija β -sitosterola gotovo dvostruka niža u ulju komorača (prosječno 135,13 \pm 1,86 mg/100 g). U ulju komorača najzastupljeniji je stigmasterol (prosječno 156,16 \pm 1,32), a ulje zvjezdastog anisa sadrži ga znatno manje od ostalih ulja (prosječno 15,51 \pm 1,32 mg/100 g). U ulju zvjezdastog anisa se u značajnijem udjelu nalazi kampesterol (prosječno 47,10 \pm 0,73 mg/100 g), kao i u ulju korijandera (prosječno 47,71 \pm 0,73 mg/100 g), dok je najmanje prisutan u ulju komorača (prosječno 23,77 \pm 0,73 mg/100 g). Zanimljivi su rezultati za kampestanol, Δ 5-avenasterol, Δ 5, 24-stigmastadienol, Δ 7-stigmasterol i Δ 7-avenasterol čije su prosječne vrijednosti znatno niže u ulju zvjezdastog anisa u odnosu na ulja drugih vrsta sjemenki. Nadalje, Δ 5-avenasterol u najvećem je udjelu prisutan u ulju komorača (prosječno 20,03 \pm 0,43 mg/100 g) kao i Δ 5, 24-stigmastadienol (prosječno 73,45 \pm 2,35 mg/100 g), dok je Δ 7-stigmasterol dominantan u ulju korijandera (prosječno 70,40 \pm 1,76 mg/100 g), a kampestanol (prosječno 25,70 \pm 0,51 mg/100 g) i Δ 7-avenasterol (prosječno 40,47 \pm 0,63 mg/100 g) u ulju kima. Klerosterol je identificiran samo u uljima kima i korijandera (prosječno kim 8,80 \pm 0,37 mg/100 g, korijander 6,65 \pm 0,37 mg/100 g), dok u uljima komorača i zvjezdastog anisa nije identificiran. Također, sitostanol nije identificiran u ulju korijandera kao niti u ulju zvjezdastog anisa, ali je izoliran iz ulja drugih dviju vrsta sjemenki (prosječno kim 17,80 \pm 0,63 mg/100 g i korijander 14,01 \pm 0,63 mg/100 g). Još jedna zanimljivost jest da je cikloartenol fitosterol koji je identificiran jedino u ulju kima (prosječno 44,62 \pm 0,05 mg/100 g). Gotovo jednaki sastav za većinu sterola u uljima kima i korijandera kao u ovom radu potvrdili su i Kozłowska i sur. (2016), dok su se koncentracije neznatno ili nimalo razlikovale. Obzirom da je sastav sterola karakterističan za pojedinu biljnu vrstu i moguće ga je koristiti kao identifikacijsku oznaku pojedinog biljnog ulja (Jiang i sur., 2019), za očekivati je da će razlike varijeteta unutar pojedine vrste biti manje u odnosu na varijabilnost između različitih vrsti ili obitelji. U prilog ovoj tvrdnji idu i sličnosti u vrijednostima postotnih udjela Δ 5 i Δ 7-sterola između ulja sjemenki ispitivanih u ovom radu, gdje ulja komorača, kima i korijandera koji pripadaju obitelji *Apiaceae* u prosjeku sadrže 16-19 % Δ 7-sterola, dok je njihov udio u zvjezdastom anisu iz obitelji *Schisandraceae* svega 1 %. Ipak, znatnije razlike u koncentracijama određenim u ovom radu i literaturnim podacima uočene su kod stigmasterola, sitostanola, Δ 5-avenasterola u ulju kima te kod kampesterola, β -sitosterola, sitostanola, Δ 5-avenasterola i Δ 7-avenasterola u ulju korijandera. U radu koji su objavili Ramadan i Mörsel (2002a), a koji se odnosi na istraživanje sastava fitosterola u ulju korijandera, u najvećem se udjelu nalaze stigmasterol (158,4 mg/100 g), β -sitosterol (146,g

mg/100 g) i Δ 5-avenasterol (123,5 mg/100 g), dok su još identificirani i ergosterol, kampesterol, lanosterol i Δ 7-avenasterol. Znatnija razlika u odnosu na rezultate u ovom radu primijećena je jedino kod Δ 5-avenasterola. Također, Conforti i sur. (2009) te Islam i sur. (2017) navode stigmasterol kao dominantan sterol u komoraču, što potvrđuju i rezultati ovog rada. Prema našim saznanjima, literaturni podaci za sterole u ulju zvjezdastog anisa nisu dostupni. Fitosteroli, od kojih najčešće β -sitosterol, stigmasterol i kampesterol, imaju veliku primjenu u funkcionalnoj hrani kao komponente za snižavanje razine kolesterola, a imaju i antikancerogena svojstva. Koriste se u kozmetičkoj industriji kao dodatak raznim kremama i ruževima, ali i u farmaceutskoj industriji u svrhu proizvodnje terapijskih steroida (Itoh i sur., 1973; Fernandes i Cabral, 2007). Budući da ulja ispitivanih začinskih sjemenki u ovom radu obiluju raznim fitosterolima, potencijalno bi se mogla koristiti u raznim granama industrije. Nadalje, obzirom da se Δ 7-sterole specifično povezuje s inhibicijom konverzije testosterona u dihidrotesteron putem 5α -reduktaze što uzrokuje benignu hiperplaziju prostate (Heim i sur., 2018), lipidni ekstrakti sjemenki obitelji *Apiaceae* zbog svojeg bi se sastava sterola potencijalno mogli istražiti i u razvoju farmaceutika za profilaksu i liječenje ovog stanja.

Uz utjecaj vrste sjemenki, statističkom analizom ispitan je i utjecaj metoda ekstrakcije na sastav i udio sterola u ispitivanim uljima, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 18b i Tablici 6. Ulja su se statistički značajno ($p < 0,01$) razlikovala u udjelu ukupnih sterola obzirom na primijenjenu metodu ekstrakcije (Slika 18b). Najviši prosječni udio ukupnih sterola ($622,30 \pm 4,33$ mg/100 g) određen je u uljima dobivenim primjenom ASE/100 °C, a nešto niži udjeli zabilježeni su u uljima ekstrahiranim s TE (prosječno $498,26 \pm 4,33$ mg/100 g) i SE (prosječno $456,05 \pm 4,33$ mg/100 g). Kao najmanje učinkovita metoda pokazala se ASE/25 °C (prosječno $416,76 \pm 4,33$ mg/100 g) (Slika 18b). Međutim, iako se metoda ASE/100 °C pokazala kao najučinkovitija za ekstrakciju ukupnih sterola iz ulja sjemenki, ona ipak nije jednako učinkovito utjecala na svaki od pojedinačnih sterola. Tako je za ekstrakciju kampestanola najučinkovitija bila ASE/25 °C kojom je ekstrahirano prosječno $24,52 \pm 0,51$ mg/100 g, dok je u ekstrakciji ovog spoja najmanje učinkovita bila SE (prosječno $2,52 \pm 0,51$ mg/100 g) (Tablica 6). Nadalje, TE se pokazala kao najučinkovitija za ekstrakciju stigmasterola i cikloartenola, dok je najmanje navedenih sterola ekstrahirano primjenom ASE/25 °C (stigmasterol) te primjenom ASE/100 °C (cikloartenol). Iako je prema našim saznanjima ovo istraživanje prvo istraživanje o utjecaju ASE tehnike na ekstrakciju sterola iz začinskih sjemenki, rezultati su usporedivi s rezultatima istraživanja provedenih na drugim biljnih vrstama. Moreau i sur. (2003) upotrijebili su ASE pri 40 i 100 °C za ekstrakciju sterolne frakcije iz kukuruza i zobi te utvrdili da se primjenom više temperature povećava njena koncentracija u ekstraktu. U istraživanju provedenom na listovima duhana, Shen i Shao (2005) uspoređivali su učinkovitost tehnika ASE i SE u ekstrakciji sterola iz lista duhana. Dobiveni rezultati

pokazali su da, zbog svoje brzine i manje potrošnje otapala, ASE predstavlja dobru alternativu konvencionalnoj metodi iako su udjeli sterola bili niži. Primjenom ASE dobiveni su viši udjeli β -sitosterola, a niži udjeli kampesterola i stigmasterol-5,22-dien-3-ola i [3 α ,24Z]-stigmasta-5,24[28]-dien-3-ola, što potvrđuje pojavu različite učinkovitosti ekstrakcije za pojedine spojeve unutar sterolne frakcije koja je primijećena i ovom radu.

5.4. SASTAV I UDIO PIGMENATA

Pigmenti prisutni u uljima doprinose vizualnom izgledu, ali i ljekovitim svojstvima ulja zbog antioksidacijskog karaktera prisutnih pigmenata poput klorofila i karotenoida. Stoga se u ovom radu određivao sastav i udio pigmenata u svim ekstrahiranim uljima.

Spektrofotometrijski su određeni pigmenti iz skupine klorofila i karotenoida te su na Slici 19 prikazani rezultati statističke analize utjecaja vrste sjemenki i metode ekstrakcije na udio ukupnih pigmenata u ispitivanim uljima. Rezultati statističke analize utjecaja vrste sjemenki i metode ekstrakcije na udio (mg/100 g) klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida prikazani su u Tablici 7.

Iz Slike 19a vidljivo je da su se ulja statistički značajno razlikovala u udjelu ukupnih pigmenata ($p < 0,01$). Ulje komorača istaknulo se kao ulje najbogatije pigmentima (prosječno $44,74 \pm 0,12$ mg/100 g), dok su ostala ispitivana ulja sadržavala znatno niže udjele ukupnih pigmenata (prosječno zvjezdasti anis $16,88 \pm 0,12$ mg/100 g, kim $10,18 \pm 0,12$ mg/100 g i korijander $4,55 \pm 0,12$ mg/100 g).

Nadalje, ulje komorača tajoder se istaklo kao ulje s najvišim koncentracijama klorofila i karotenoida, dok ulje korijandera karakterizira najniža koncentracija navedenih pigmenata (Tablice 7 i 11). Isto tako, u ulju komorača su se klorofil *a* i klorofil *b* nalazili u prosječnim koncentracijama od $23,60 \pm 0,10$ mg/100 g (klorofil *a*) i $8,83 \pm 0,09$ mg/100 g (klorofil *b*). Ulje zvjezdastog anisa sadržavalo je prosječno $10,94 \pm 0,10$ mg/100 g klorofila *a* te $4,75 \pm 0,09$ mg/100 g klorofila *b*, a 2-3 puta niže koncentracije navedenih pigmenata u odnosu na ulje zvjezdastog anisa određene su u uljima kima i korijandera (Tablica 7). Može se primijetiti da je u ulju komorača i zvjezdastog anisa odnos klorofila *a* i klorofila *b* u omjeru 3:1, odnosno 2:1, što je karakteristično za više biljke (Alkema i Seager, 1982; Hojnik i sur., 2007). Klorofili su najzastupljeniji pigmenti u višim biljkama (Ferruzzi i sur., 2002). Osim primarne uloge u procesu fotosinteze, klorofili posjeduju antioksidativna svojstva (Ferruzzi i sur., 2002; Lanfer-Marquez i sur., 2005; Hsu i sur., 2013), pa značajno doprinose ljudskom zdravlju (Dashwood, 1997; Negishi i sur., 1997; Chernomorsky i sur., 1999).

Uspoređujući koncentracije ukupnih karotenoida, najviša prosječna koncentracija zabilježena je u ulju komorača ($12,31 \pm 0,02$ mg/100 g), a slijedi ulje kima (prosječno $4,82 \pm 0,02$ mg/100 g) i zvjezdastog anisa (prosječno $1,20 \pm 0,02$ mg/100 g). Ulje korijandera karakterizira najniža prosječna koncentracija karotenoida, svega $0,66 \pm 0,02$ mg/100 g. Divya i sur. (2012) odredili su udio karotenoida u listovima i sjemenkama različitih sorti korijandera te je iz njihovih rezultata vidljivo kako se koncentracija ukupnih karotenoida u suhim sjemenkama korijandera kretala od $1,76 \pm 0,042$ do $2,15 \pm 0,049$ mg/100 g suhe tvari. Također, kvantificirali su udio β -karotena kao najzastupljenijeg spoja iz skupine karotenoida (30 % udjela ukupnih karotenoida) čija se koncentracija kretala od $0,29 \pm 0,011$ do $0,60 \pm 0,014$ mg/100 g suhe tvari. Đurović i sur. (2017) navode kako su karotenoidi značajni antioksidansi s pozitivnim utjecajem na ljudsko zdravlje. Najpoznatiji su prekursori vitamina A koji je ključan za rast, razvoj i vizualne funkcije (Yunbo, 2011). Aruna i Baskaran (2010) su u sjemenkama korijandera identificirali karotenoide neoksantin, violaksantin, lutein, zeaksantin te α - i β -karoten. Isti profil karotenoida potvrdili su i u sjemenkama zvjezdastog anisa uz izostanak zeaksantina i neoksantina. Prema njihovim rezultatima, udio ukupnih karotenoida u sjemenkama korijandera iznosio je 1 mg/100 g suhe tvari, a u sjemenkama zvjezdastog anisa 0,26 mg/100 g suhe tvari. Uspoređujući njihove rezultate s rezultatima ovog rada, može se primijetiti suprotnost u zastupljenosti karotenoida između navedenih sjemenki gdje u njihovom istraživanju korijander ima viši udio karotenoida od zvjezdastog anisa. To se može objasniti sortnim razlikama upotrijebljenih sjemenki, iako informacije o sorti sjemenki upotrijebljenih u ovom istraživanju nisu poznate. Nažalost, vrlo je malo dostupnih literaturnih podataka o sastavu pigmenata u nehlapljivim uljima začinskih sjemenki pa nije moguća daljnja detaljnija usporedba dobivenih rezultata.

I primijenjena metoda ekstrakcije pokazala je statistički značajne razlike u udjelu ukupnih pigmenata (Slika 19b). Iz prikaza je vidljivo da je najviši prosječni udio ukupnih pigmenata ekstrahiran sa SE metodom ($21,37 \pm 0,12$ mg/100 g), potom s TE ($20,46 \pm 0,12$ mg/100 g), dok je primjena ASE rezultirala nešto nižim iskorištenjem (prosječno ASE/100 °C $18,71 \pm 0,12$ mg/100 g, ASE/25 °C $15,81 \pm 0,12$ mg/100 g). Međutim, ASE/100 °C je pokazala visoku učinkovitost u ekstrakciji klorofila, osobito klorofila *b* (Tablica 7). Kako mnoga istraživanja navode uspješnu ekstrakciju pigmenata tehnikom ASE (Cha i sur., 2010; Saha i sur., 2015; Repajić i sur., 2020), ali uz upotrebu drugih otapala, poput acetona ili etanola te njihovih vodenih otopina, ovo istraživanje bi se moglo nastaviti u smjeru primjene ASE uz korištenje drugog otapala za uspješniju ekstrakciju pigmenata iz začinskih sjemenki. Također, kako je već napomenuto, dostupna literatura ne pruža dovoljno podataka o ekstrakciji pigmenata iz začinskih sjemenki, pa daljnja usporedba podataka dobivenih u ovom istraživanju o učinkovitosti metoda ekstrakcije nije moguća.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata i provedene statističke analize može se zaključiti:

1. Nehlapljiva ulja sjemenki gorkog komorača, kima, korijandera i zvjezdastog anisa pokazala su raznolik i bogat kemijski sastav koji uključuje veliku zastupljenost bioaktivnih spojeva poput nezasićenih masnih kiselina, sterola, klorofila i karotenoida, posebno u uljima sjemenki iz obitelji *Apiaceae*, što ukazuje na njihov veliki potencijal za daljnju primjenu u prehrambenoj industriji u proizvodnji funkcionalnih poluproizvoda i proizvoda, ali i drugim industrijama poput kozmetičke, kemijske ili farmaceutske. Također, obzirom da je u dostupnoj literaturi uglavnom prisutno vrlo malo podataka o kemijskom sastavu nehlapljivih ulja začinskih sjemenki, ovaj rad predstavlja vrijedne rezultate za buduća istraživanja.
2. Najviši prosječni udjeli ulja ekstrahirani su iz sjemenki zvjezdastog anisa (12,34 %) i korijandera (12,30 %), dok su iz sjemenki kima i komorača ekstrahirani niži udjeli ulja (prosječno kim 8,49 %, komorač 7,89 %).
3. U ulju zvjezdastog anisa određen je najviši prosječni udio zasićenih masnih kiselina (72,31 %), dok su ulja komorača, kima i korijandera bogatija nezasićenim masnim kiselinama: ulje korijandera sadrži prosječno 95,14 %, ulje komorača 69,81 %, a ulje kima 68,42 % nezasićenih masnih kiselina, od čega su najzastupljenije petroselinska i oleinska kiselina. Najzastupljenija zasićena masna kiselina u svim ispitivanim uljima je laurinska kiselina.
4. Najviši prosječni udio sterola sadrži ulje kima (636,27 mg/100 g), a slijede ga ulje komorača (526,97 mg/100 g) i korijandera (496,52 mg/100 g), dok je u ulju zvjezdastog anisa njihov udio najniži (333,61 mg/100 g). β -sitosterol je najzastupljeniji sterol u uljima kima, korijandera i zvjezdastog anisa, a stigmasterol je najzastupljeniji u ulju komorača.
5. Ulje komorača sadrži najviši prosječni udio pigmenata (44,74 mg/100 g), dok se u ostalim uljima oni nalaze u nižim koncentracijama (zvjezdasti anis 16,88 mg/100 g, kim 10,18 mg/100 g i korijander 4,55 mg/100 g), pri čemu ulje komorača sadrži 23,60 mg/100 g klorofila *a*, 8,83 mg/100 g klorofila *b* te 12,31 mg/100 g ukupnih karotenoida.
6. Obzirom na primijenjenu metodu ekstrakcije, nije se pokazao uniforman trend učinkovitosti ispitivanih metoda ekstrakcije na udio analiziranih spojeva. ASE je kao napredna tehnika ekstrakcije pokazala potencijal za ekstrakciju nehlapljivih ulja iz začinskih sjemenki kao alternativa dugotrajnim konvencionalnim metodama, ali je svakako potrebno provesti daljnje optimiranje ekstrakcijskih parametara ASE, kao i ispitati upotrebu drugih otapala, s ciljem povećanja učinkovitosti i dobivanja zadovoljavajućih prinosa ciljanih spojeva.

7. ZAHVALE

Zahvaljujemo se mentorici doc. dr. sc. Maji Repajić i komentoru doc. dr. sc. Marku Obranoviću na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju i stručnim savjetima. Također se zahvaljujemo izv. prof. dr. sc. Sandri Balbino na nesebičnoj pomoći tijekom svih faza izrade ovog rada. Zahvaljujemo se i Valentini Kruk, mag.ing. te tehničarki Melisi Trputec na doprinosu prilikom provedbe eksperimentalnog dijela rada.

Posebno se zahvaljujemo obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj ljubavi, podršci, pomoći i ohrabivanju prilikom suočavanja sa svim izazovima tijekom razdoblja pisanja ovoga rada.

8. POPIS LITERATURE

Ali, M., Watson, I. A. (2014) Comparison of oil extraction methods, energy analysis and biodiesel production from flax seeds. *Int. J. Energy Res.* **38(5)**, 614-625.

Alkema, J., Seager, S. L. (1982) The chemical pigments of plants. *J. Chem. Educ.* **59(3)**, 183.

Aruna, G., Baskaran, V. (2010) Comparative study on the levels of carotenoids lutein, zeaxanthin and β -carotene in Indian spices of nutritional and medicinal importance. *Food Chem.* **123(2)**, 404-409.

Barros, L., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R. (2010) The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): Shoots, leaves, stems and inflorescences. *LWT* **43(5)**, 814–818.

Bhat, S., Kaushal, P., Kaur, M., Sharma, H. K. (2014) Coriander (*Coriandrum sativum* L.): Processing, nutritional and functional aspects. *Afr. J. Plant Sci.* **8(1)**, 25-33.

Castejón, N., Luna, P., Señoráns, F. J. (2018) Alternative oil extraction methods from *Echium plantagineum* L. seeds using advanced techniques and green solvents. *Food Chem.* **244**, 75-82.

Cha, K. H., Lee, H. J., Koo, S. Y., Song, D.-G., Lee, D.-U., Pan, C.-H. (2010) Optimization of Pressurized Liquid Extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 793–797.

Charvet, A. S., Comeau, L. C., Gaydou, E. M. (1991) New preparation of pure petroselinic acid from fennel oil (*Foeniculum vulgare*). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68(8)**, 604-607.

Chen, B., McClements, D. J., Decker, E. A. (2011) Minor components in food oils: a critical review of their roles on lipid oxidation chemistry in bulk oils and emulsions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51(10)**, 901-916.

Chernomorsky, S., Segelman, A., Poretz, R. D. (1999) Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. *Teratog., Carcinog., Mutagen.* **19(5)**, 313-322.

Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F. (2009) The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: the role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chem.* **112(3)**, 587-594.

Coşge, B., Kiralan, M., Gürbüz, B. (2008) Characteristics of fatty acids and essential oil from sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *dulce*) and bitter fennel fruits (*F. vulgare* Mill. var. *vulgare*) growing in Turkey. *Nat. Prod. Res.* **22(12)**, 1011-1016.

Cu, J. Q., Perineau, F., Goepfert, G. (1990) GC/MS analysis of star anise oil. *J. Essent. Oil Res.* **2(2)**, 91-92.

Dabović-Rac, O., Hrastar-Kostešić, V., Mandalinić, L., Koprivnjak, O. (2005) Maslinovo ulje i utjecaj na zdravlje. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo* **1(3)**, 1-2.

Dashwood, R. (1997) Chlorophylls as anticarcinogens. *Int. J. Oncol.* **10(4)**, 721-727.

De Araújo Cavalcante, W., Leitão, R. C., Gehring, T. A., Angenent, L. T., Santaella, S. T. (2017) Anaerobic fermentation for *n*-caproic acid production: A review. *Process Biochem.* **54**, 106-119.

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

Delbeke, E. I., Everaert, J., Uitterhaegen, E., Verweire, S., Verlee, A., Talou, T., Soetaert, W., Van Bogaert I. N. A., Stevens, C. V. (2016) Petroselinic acid purification and its use for the fermentation of new sophorolipids. *AMB Express* **6(1)**, 28.

Dinesha, R., Thammannagowda, S. S., Prabhu, M. S. L., Madhu, C. S., Srinivas, L. (2014) The antioxidant and DNA protectant activities of Star Anise (*Illicium verum*) aqueous extracts. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2(5)**, 98-103.

Divya, P., Puthusseri, B., Neelwarne, B. (2012) Carotenoid content, its stability during drying and the antioxidant activity of commercial coriander (*Coriandrum sativum* L.) varieties. *Food Res. Int.* **45(1)**, 342-350.

Dunford, N. T., Zhang, M. (2003) Pressurized solvent extraction of wheat germ oil. *Food Res. Int.* **36(9-10)**, 905-909.

Đurović, S., Pavlić, B., Šorgić, S., Popov, S., Savić, S., Petronijević, M., Radojković, M., Cvetanović, A., Zeković, Z. (2017) Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. *J. Funct. Foods.* **32**, 18-26.

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.

Fernandes, P., Cabral, J. M. S. (2007) Phytosterols: applications and recovery methods. *Bioresour. Technol.* **98(12)**, 2335-2350.

Ferruzzi, M. G., Böhm, V., Courtney, P. D., Schwartz, S. J. (2002) Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J. Food Sci.* **67(7)**, 2589-2595.

George, C. K. (2012) Star anise. U: Handbook of herbs and spices, Vol. 2 (Peter, K. V., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 487-503.

Giergielewicz-Możajska, H., Dąbrowski, Ł., Namieśnik, J. (2001) Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples-some aspects of theory and practice. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **31(3)**, 149-165.

Goyal, M., Gupta, V. K., Singh, N. (2018) Carum Carvi-An Updated Review. *Indian J. Pharm. Biol. Res.* **6(4)**, 14-24.

Grand View Research (2018) Seasoning And Spices Market Size, Share & Trends Report Seasoning And Spices Market Size, Share & Trends Analysis Report By Products (Herbs, Salt & Salt Substitutes, Spices), By Application (Meat & Poultry, Soups & Dressings), And Segment Forecasts. U: Market Analysis Report. <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/seasonings-spices-market>> Pristupljeno 9. srpnja 2020.

Gross, J. (1991) *Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids*, Springer Science & Business Media, New York, str. 3-6.

Hartmann, M. A. (1998) Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci.* **3(5)**, 170-175.

Heemken, O. P., Theobald, N., Wenclawiak, B. W. (1997) Comparison of ASE and SFE with soxhlet, sonication, and methanolic saponification extractions for the determination of organic micropollutants in marine particulate matter. *Anal. Chem.* **69(11)**, 2171-2180.

Heim, S., Seibt, S., Stier, H., Moré, M. I. (2018) Uromedic® pumpkin seed derived Δ^7 -sterols, extract and oil inhibit 5α -reductases and bind to androgen receptor in vitro. *Pharmacol. Pharm.* **9(6)**, 193.

Hojnik, M., Škerget, M., Knez, Ž. (2007) Isolation of chlorophylls from stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Sep. Purif. Technol.* **57**, 37-46.

Howitt, C. A., Pogson, B. J. (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ.* **29(3)**, 435-445.

HRN EN ISO 12228-1:2004, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje količine pojedinačnih i ukupnih sterola-Metoda plinske kromatografije.

HRN EN ISO 12966-2:2017 Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters.

HRN EN ISO 12966-4:2015, Životinjske i biljne masti i ulja - Određivanje metilnih estera masnih kiselina, 4. dio: Metoda plinske kromatografije na kapilarnim kolonama.

HRN EN ISO 665:2004, Uljarice - Određivanje količine vode i hlapljivih tvari.

Hsu, C. Y., Chao, P. Y., Hu, S. P., Yang, C. M. (2013) The antioxidant and free radical scavenging activities of chlorophylls and pheophytins. *Food Nutr. Sci.* **4**, 1-8.

Isbell, T. A., Green, L. A., DeKeyser, S. S., Manthey, L. K., Kenar, J. A., Cermak, S. C. (2006) Improvement in the gas chromatographic resolution of petroselinic acid from oleic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **83(5)**, 429-434.

Islam, M. A., Jeong, B. G., Jung, J., Shin, E. C., Choi, S. G., Chun, J. (2017) Phytosterol determination and method validation for selected nuts and seeds. *Food Anal. Methods.* **10(10)**, 3225-3234.

Itoh, T., Tamura, T., Matsumoto, T. (1973) Sterol composition of 19 vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **50(4)**, 122-125.

Ivanov, S. A., Aitzetmüller, K. (1995) Untersuchungen über die Tocopherol- und Tocotrienolzusammensetzung der Samenöle einiger Vertreter der Familie *Apiaceae*. *Fett Wissenschaft Technologie/Fat Science Technology* **97(1)**, 24-29.

Jiang, K., Gachumi, G., Poudel, A., Shurmer, B., Bashi, Z., El-Aneel, A. (2019) The establishment of tandem mass spectrometric fingerprints of phytosterols and tocopherols and the development of targeted profiling strategies in vegetable oils. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **30(9)**, 1700-1712.

Johri, R. K. (2011) *Cuminum cyminum* and *Carum carvi*: An update. *Pharmacogn. Rev.* **5(9)**, 63-72.

Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. Å. (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31(7)**, 671-701.

Karolyi, D. (2007) Polinezasićene masne kiseline u prehrani i zdravlju ljudi. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* **9(3)**: 151-158.

Khattab, R. Y., Zeitoun, M. A. (2013) Quality evaluation of flaxseed oil obtained by different extraction techniques. *LWT* **53(1)**, 338-345.

Kodad, O., Fernandez-Cuesta, A., Karima, B., Velasco, L., Ercişli, S., RAFEL SOCIAS i COMPANY (2015) Natural variability in phytosterols in almond (*Prunus amygdalus*) trees growing under a southern Mediterranean climate. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **90(5)**, 543-549.

Kozłowska, M., Gruczyńska, E., Ścibisz, I., Rudzińska, M. (2016) Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds. *Food Chem.* **213**, 450-456.

Krulj, J., Brlek, T., Pezo, L., Brkljača, J., Popović, S., Zeković, Z., Bodroža Solarov, M. (2016) Extraction methods of *Amaranthus* sp. grain oil isolation. *J. Sci. Food Agric.* **96(10)**, 3552-3558.

Lanfer-Marquez, U. M., Barros, R. M., Sinnecker, P. (2005) Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Res. Int.* **38(8-9)**, 885-891.

Laribi, B., Bettaieb, I., Kouki, K., Sahli, A., Mougou, A., Marzouk, B. (2009) Water deficit effects on caraway (*Carum carvi* L.) growth, essential oil and fatty acid composition. *Ind. Crops Prod.* **30(3)**, 372-379.

Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat, F. (2016) Enhancing extraction processes in the food industry. CRC Press, Talyor & Francis, Boca Raton.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. U: *Methods in enzymology* (Parker L., Douce, R., ured.), Academic Press, Orlando, str. 350-382.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2005) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. U: *Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components* (Wrolstad, R.E., Acree, T.E., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D., Sporns, P., ured.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken/New Jersey, str. 171-178.

Lieberman, S., Enig, M. G., Preuss, H. G. (2006) A review of monolaurin and lauric acid: natural virucidal and bactericidal agents. *Altern. Complement. Ther.* **12(6)**, 310-314.

Li-juan, Z. H. A. O. (2012) Analysis of Fatty Acids in Chinese Star Anise (*Illicium verum* Hook. f.) by GC-MS. *Food Science* **12**.

- Linder, C. R. (2000) Adaptive evolution of seed oils in plants: accounting for the biogeographic distribution of saturated and unsaturated fatty acids in seed oils. *Am. Nat.* **156(4)**, 442–458.
- Lohani, U. C., Fallahi, P., Muthukumarappan, K. (2015) Comparison of ethyl acetate with hexane for oil extraction from various oilseeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **92(5)**, 743-754.
- López-Bascón, M. A., Luque de Castro, M. D. (2020) Soxhlet Extraction. U: *Liquid-Phase Extraction* (Poole, C. F., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 327–354.
- Losic, D., Mitchell, J. G., Voelcker, N. H. (2009) Diatomaceous lessons in nanotechnology and advanced materials. *Adv. Mater.* **21(29)**, 2947-2958.
- Luque De Castro, M., Priego-Capote, F. (2010) Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J. Chromatogr. A.* **1217(16)**, 2383-2389.
- Madhu, C. S., Manukumar, H. M., Thribhuvan, K. R., Bhimangouda, R. P. (2014) Phytochemical, nutritional and mineral constituents of *Illicium verum* Hook (star anise). *World J. Pharm. Res.* **3**, 2888-2896.
- Majdoub, N., El-Guendouz, S., Rezgui, M., Carlier, J., Costa, C., Kaab, L. B. B., Miguel, M. G. (2017) Growth, photosynthetic pigments, phenolic content and biological activities of *Foeniculum vulgare* Mill., *Anethum graveolens* L. and *Pimpinella anisum* L. (*Apiaceae*) in response to zinc. *Ind. Crops Prod.* **109**, 627-636.
- Malhotra, S. K. (2012) Fennel and fennel seed. U: *Handbook of Herbs and Spices*, 2. izd. (Peter K. V., ured.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 275 – 302.
- 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.
- Moreau, R. A., Powell, M. J., Singh, V. (2003) Pressurized liquid extraction of polar and nonpolar lipids in corn and oats with hexane, methylene chloride, isopropanol, and ethanol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80(11)**, 1063-1067.
- Mottaleb, M. A., Sarker, S. D. (2012) Accelerated solvent extraction for natural products isolation. U: *Natural products isolation* (Sarker, S. D., Latif, Z., Gray, A. I., ured.), Humana Press, New Jersey, str. 75-87.
- Msaada, K., Hosni, K., Taarit, M. B., Chahed, T., Hammami, M., Marzouk, B. (2009a) Changes in fatty acid composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit during maturation. *Ind. Crops Prod.* **29(2-3)**, 269-274.

- Msaada, K., Taarit, M. B., Hosni, K., Hammami, M., Marzouk, B. (2009b) Regional and maturational effects on essential oils yields and composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits. *Sci. Hortic.* **122(1)**, 116-124.
- Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Acta* **703(1)**, 8-18.
- Negishi, T., Rai, H., Hayatsu, H. (1997) Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutat. Res. Fund. Mol. M.* **376(1-2)**, 97-100.
- Ngo-Duy, C. C., Destailats, F., Keskitalo, M., Arul, J., Angers, P. (2009) Triacylglycerols of *Apiaceae* seed oils: Composition and regiodistribution of fatty acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **111(2)**, 164-169.
- Niamah, A. K., Alali, H. A. (2016) Antibacterial and antioxidant activities of essential oils extracted from Iraqi coriander (*Coriandrum sativum* L.) seeds. *J. Sci. Eng. Res.* **7(2)**, 1511-1515.
- Onemli, F. (2012) Impact of climate changes and correlations on oil fatty acids in sunflower. *Pak. J. Agric. Sci.* **49(4)**, 455–458.
- Padmashree, A., Roopa, N., Semwal, A. D., Sharma, G. K., Agathian, G., Bawa, A. S. (2007) Star-anise (*Illicium verum*) and black caraway (*Carum nigrum*) as natural antioxidants. *Food Chem.* **104(1)**, 59-66.
- Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Codina C. (2004a) Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C18 column. *Anal. Chim. Acta* **512**, 271 - 280.
- Parejo, I., Jauregui, O., Sánchez-Rabaneda, F., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. (2004b). Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography– negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* **52(12)**, 3679-3687.
- Pérez, M., Teixeira da Silva, J. A., Lao, M. T. (2006) Light management in ornamental crops. U: *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues Vol IV* (Teixeira da Silva J.A., ured.), Global Science Books, UK, str. 683-695.
- Petraitytė, N., Dastikaitė, A. (2007) Agrobiological assessment of wild *Carum carvi* L. cenopopulation biodiversity ex situ. *Biologija* **53(4)**, 74-79.

- Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toivo, J., Lampi, A. M. (2000) Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **80(7)**, 939-966.
- Placek, L. L. (1963) A review on petroselinic acid and its derivatives. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **40(8)**, 319-329.
- Rafiq, M., Lv, Y. Z., Zhou, Y., Ma, K. B., Wang, W., Li, C. R., Wang, Q. (2015) Use of vegetable oils as transformer oils—a review. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **52**, 308-324.
- Rainer, L., Heiss, C. J. (2004) Conjugated linoleic acid: health implications and effects on body composition. *J. Am. Diet. Assoc.* **104(6)**, 963-968.
- Ramadan, M., Mörsel, J. T. (2002a) Oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit-seeds. *Eur. Food Res. Technol.* **215(3)**, 204-209.
- Ramadan, M., Mörsel, J.-T. (2002b) Direct isocratic normal-phase HPLC assay of fat-soluble vitamins and β -carotene in oilseeds. *Eur. Food Res. Technol.* **214(6)**, 521–527.
- Rapić, V. (1994) *Postupci priprave i izolacije organskih spojeva*, Školska knjiga, Zagreb, str. 52–60.
- Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A., Qurishi, M. A. (2016) *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian J. Chem.* **9**, 1574-1583.
- Rathore, S. S., Saxena, S. N., Singh, B. (2013) Potential health benefits of major seed spices. *Int. J. Seed Spices* **3(2)**, 1-12.
- Raut, P., Bhosle, D., Janghel, A., Deo, S., Verma, C., Kumar, S. S., Agrawal, M., Amit, N., Sharma, M., Giri, T., Tripathi, D. K., Alexander, A. (2015) Emerging Pressurized Liquid Extraction (PLE) techniques as an innovative green technologies for the effective extraction of the active phytopharmaceuticals. *Res. J. Pharm. Technol.* **8(6)**, 800-810.
- Reiter, B., Lechner, M., Lorbeer, E. (1998) The fatty acid profiles—including petroselinic and cis-vaccenic acid—of different *Umbelliferae* seed oils. *Lipid/Fett* **100(11)**, 498-502.
- Repajić, M., Cegledi, E., Kruk, V., Pedisić, S., Çınar, F., Bursać Kovačević, D., Žutić, I., Dragović-Uzelac, V. (2020) Accelerated Solvent Extraction as a Green Tool for the Recovery of Polyphenols and Pigments from Wild Nettle Leaves. *Processes* **8(7)**, 803.
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., Pohl, C. (1996)

Accelerated solvent extraction: A technology for sample preparation. *Anal. Chem.* **68**,1033–1039.

Roche, H. M. (1999) Unsaturated fatty acids. *Proc. Nutr. Soc.* **58(02)**, 397–401.

Rustan, A. C., Drevon, C. A. (2005) Fatty Acids: Structures and Properties. U: *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley and Sons Ltd., Chichester, str. 1-7.

Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T. P., Maguire, A. R., O'Brien, N. M. (2007) Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. *Plant Foods Hum. Nutr.* **62(3)**, 85-91.

Saha, S., Walia, S., Kundu, A., Sharma, K., Paul, R. K. (2015) Optimal extraction and fingerprinting of carotenoids by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **177**, 369–375.

Saini, R. K., Nile, S. H., Park, S. W. (2015) Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Res. Int.* **76**, 735 - 750.

Sayed-Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., Cerny, M., Kanaan, H., Chokr, A., Merah, O. (2018) Fennel oil and by-products seed characterization and their potential applications. *Ind. Crops Prod.* **111**, 92-98.

Sayed-Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., Merah, O. (2017) The *Apiaceae*: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Ind. Crops Prod.* **109**, 661-671.

Sedlakova, J., Kocourkova, B., Kuban, V. (2001) Determination of essential oils content and composition in caraway (*Carum carvi* L.). *Czech J. Food Sci.* **19(1)**, 31-36.

Segura, R., Javierre, C., Lizarraga, M. A., Ros, E. (2006) Other relevant components of nuts: phytosterols, folate and minerals. *Br. J. Nutr.* **96(S2)**, 36-44.

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

Sen, C. K., Khanna, S., Roy, S. (2006) Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sci.* **78(18)**, 2088-2098.

Shen, J., Shao, X. (2005) A comparison of accelerated solvent extraction, Soxhlet extraction, and ultrasonic-assisted extraction for analysis of terpenoids and sterols in tobacco. *Anal. Bioanal. Chem.* **383(6)**, 1003-1008.

- Srinivasan, K. (2005) Role of spices beyond food flavoring: Nutraceuticals with multiple health effects. *Food Rev. Int.* **21(2)**, 167-188.
- Sriti, J., Wannas, W. A., Talou, T., Mhamdi, B., Cerny, M., Marzouk, B. (2010) Lipid profiles of Tunisian coriander (*Coriandrum sativum*) seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **87(4)**, 395-400.
- Sumanta, N., Haque, C.I., Nishika, J., Suprakash, R. (2014) Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res. J. Chem. Sci.* **4**, 63-69.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmiya, A. (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* **54(4)**, 733-749.
- Tang, M., Xia, L., Wei, D., Yan, S., Zhang, M., Yang, Z., Wang, H., Du, C, Cui, H.-L. (2020) Rapid and label-free metamaterial-based biosensor for fatty acid detection with terahertz time-domain spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **228**, 117736.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2011) Dionex ASE 350 Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual, United States, <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/75689-Man-ASE-ASE350-Operators-Dec2011-DOC065220-04.pdf>> Pristupljeno 17. lipnja 2020.
- Timberlake, C. F., Henry, B. S. (1986) Plant pigments as natural food colours. *Endeavour* **10(1)**, 31-36.
- Uitterhaegen, E., Sampaio, K. A., Delbeke, E. I. P., De Greyt, W., Cerny, M., Evon, P., Merah, O., Talou, T. Stevens, C. V. (2016) Characterization of French coriander oil as source of petroselinic acid. *Molecules* **21(9)**, 1202.
- Wang, G. W., Hu, W. T., Huang, B. K., Qin, L. P. (2011) *Illicium verum*: a review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* **136(1)**, 10-20.
- Yamaya, A., Endo, Y., Fujimoto, K., Kitamura, K. (2007) Effects of genetic variability and planting location on the phytosterol content and composition in soybean seeds. *Food Chem.* **102(4)**, 1071-1075.
- Yang, J. F., Yang, C. H., Chang, H. W., Yang, C. S., Wang, S. M., Hsieh, M. C., Chuang, L. Y. (2010) Chemical composition and antibacterial activities of *Illicium verum* against antibiotic-resistant pathogens. *J. Med. Food* **13(5)**, 1254-1262.
- Yetim, H., Sagdic, O., Ozturk, I. (2008) Fatty acid compositions of cold press oils of seven edible plant seeds grown in Turkey. *Chem. Nat. Compd.* **44(5)**, 634-636.

Yunbo, L. (2011) Carotenoids. U: Antioxidants in biology and medicine: Essentials, advances, and clinical applications, Nova Science Publishers Inc., New York.

Yusuf, A. K. (2018) A review of methods used for seed oil extraction. *Int. J. Sci. Res.* **7(12)**, 233-223.

Zhang, X., Cambrai, A., Miesch, M., Roussi, S., Raul, F., Aoude-Werner, D., Marchioni, E. (2006) Separation of Δ 5-and Δ 7-phytosterols by adsorption chromatography and semipreparative reversed phase high-performance liquid chromatography for quantitative analysis of phytosterols in foods. *J. Agric. Food. Chem.* **54(4)**, 1196-1202.

9. SAŽETAK

Ana Marija Medved, Petra Tonković

Kemijski sastav nehlapljivih ulja začinskih sjemenki: utjecaj vrste sjemenki i metode ekstrakcije

Nehlapljiva ulja začinskih sjemenki pokazuju veliki potencijal za primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj, kemijskoj i farmaceutskoj industriji. Bogata su raznim kemijskim spojevima, među kojima su masne kiseline, steroli i pigmenti. Ekstrakcija ulja, ali i samih komponenti ulja uvelike ovisi o primijenjenoj metodi ekstrakcije kao i uvjetima ekstrakcije. Stoga su ciljevi ovoga rada bili ispitati utjecaj vrste začinskih sjemenki [gorki komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.), kim (*Carum carvi* L.), korijander (*Coriandrum sativum* L.) i zvjezdasti anis (*Illicium verum* Hook. f.)] na udio ulja te njegov kemijski sastav, kao i ispitati učinkovitost ekstrakcije ulja primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE) pri 25 i 100 °C, ekstrakcije po Soxhlet-u i ekstrakcije na tresilici pri sobnoj temperaturi. Na ovaj način dobiveno je 16 uzoraka ulja, a određeni su udio ulja te sastav i udio masnih kiselina, sterola i pigmenata. Statistička analiza pokazala je da su vrsta sjemenki i primijenjena metoda ekstrakcije imale statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$) na većinu ispitivanih parametara. Najviši prosječni udjeli ulja ekstrahirani su iz sjemenki zvjezdastog anisa i korijandera. Ulje zvjezdastog anisa sadržavalo je više zasićenih masnih kiselina, dok su ulja komorača, kima i korijandera bila bogatija nezasićenim masnim kiselinama od čega su najzastupljenije bile petroselinska i oleinska kiselina. Najzastupljenija zasićena masna kiselina u svim ispitivanim uljima bila je laurinska kiselina. Od sterola u najvišem su udjelu određeni β -sitosterol i stigmasterol, a klorofili su bili najzastupljeniji pigmenti. Metode ekstrakcije su pokazale različitu učinkovitost za ekstrakciju pojedinih spojeva, gdje je ASE kao napredna tehnika ekstrakcije pokazala potencijal za ekstrakciju ulja iz začinskih sjemenki kao alternativa dugotrajnim konvencionalnim metodama. Međutim, potrebno je provesti daljnje optimiranje ekstrakcijskih parametara ASE i ispitati upotrebu drugih otapala kako bi se povećala učinkovitost i dobili zadovoljavajući prinosi ciljanih spojeva.

Ključne riječi: začinske sjemenke, masne kiseline, steroli, pigmenti, ASE

10. SUMMARY

Ana Marija Medved, Petra Tonković

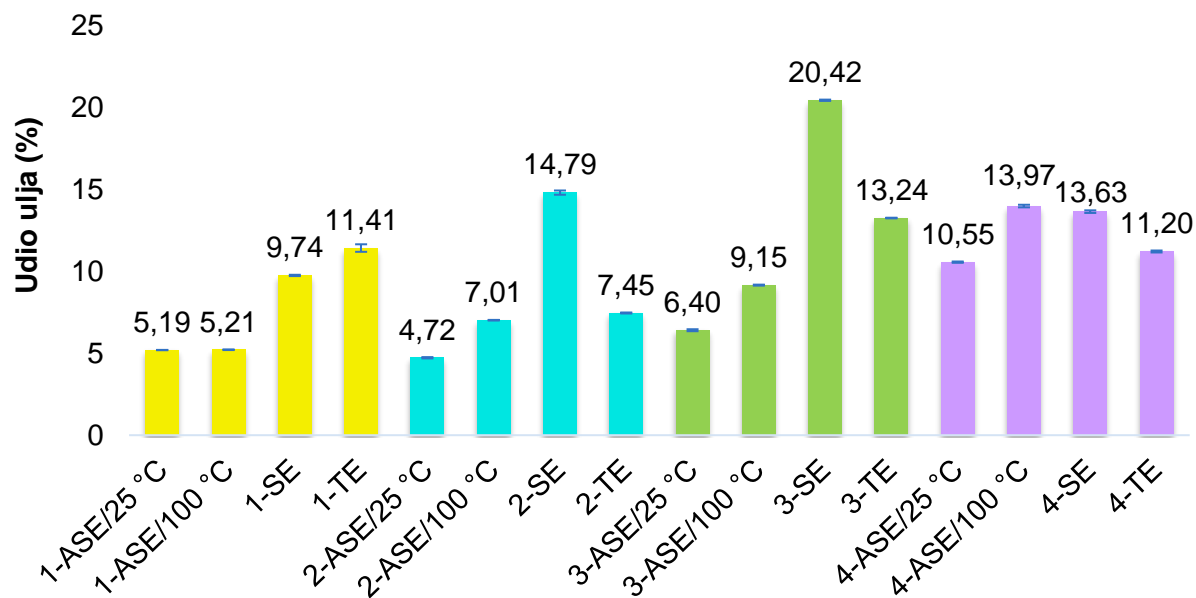
Chemical composition of non-volatile spice seed oils: the influence of seed type and extraction method

Non-volatile spice seed oils show great potential for application in food, cosmetic, chemical and pharmaceutical industry. They are abundant with various chemical compounds among which fatty acids, sterols and pigments are present. Extraction of the oil and oil components considerably depends on the applied extraction method as well as the extraction conditions. Therefore, the aims of this study were to examine the impact of spice seed type [bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), caraway (*Carum carvi* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and star anis (*Illicium verum* Hook. f.)] on the oil yield and its chemical composition as well as to examine the oil extraction's efficiency by accelerated solvent extraction (ASE) at 25 and 100 °C, Soxhlet extraction and agitation-assisted extraction at room temperature. Sixteen oil samples were obtained, in which the oil yield as well as the composition and content of fatty acids, sterols and pigments were determined. Statistical analysis showed that seed type and applied extraction method had a significant influence ($p \leq 0.05$) on the majority of examined parameters. The highest average oil yields were extracted from star anise and coriander seeds. Star anise oil contained more saturated fatty acids, while fennel, cumin and coriander oils were richer in unsaturated fatty acids, of which petroselinic and oleic acids were the most prevalent. The predominant saturated fatty acid in all analyzed oils was lauric acid. β -sitosterol and stigmasterol were sterols determined in the highest concentrations, while chlorophylls were the most abundant pigments. Extraction methods showed diverse efficiency for the isolation of individual compounds, where ASE as an advanced extraction technique showed the potential for spice seeds' oil extraction as an alternative to long-term conventional methods. However, it is necessary to conduct further optimization of the ASE parameters and to examine the use of other solvents in order to increase the efficiency and to obtain the satisfactory yields of target compounds.

Key words: spice seeds, fatty acids, sterols, pigments, ASE

11. PRILOZI

11.1. UDIO ULJA



1=komorač, 2=kim, 3=korijander, 4=zvezdasti anis, ASE=ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, SE=ekstrakcija po Soxhletu, TE=ekstrakcija na tresilici pri sobnoj temperaturi
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.

Slika 20. Udio ulja (%) u odabranim začinskim sjemenkama ekstrahiran različitim metodama ekstrakcije

11.2. SASTAV I UDIO MASNIH KISELINA

Tablica 8. Sastav i udio (%) zasićenih masnih kiselina u uljima odabranih začinskih sjemenki ekstrahiranim različitim metodama ekstrakcije

Uzorak	C6:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C17:0	C18:0	C20:0	C22:0	C23:0	C24:0	Ukupno
1-ASE/ 25 °C	0,16±0,00	1,29±0,01	33,34±0,14	0,04±0,00	2,71±0,00	0,05±0,00	0,97±0,00	0,16±0,00	0,05±0,00	ni	0,05±0,01	38,81±0,14
1-ASE/ 100 °C	0,11±0,00	1,15±0,00	28,38±0,07	0,05±0,00	3,07±0,02	0,04±0,00	1,11±0,00	0,18±0,00	ni	ni	0,04±0,06	34,14±0,03
1-SE	0,04±0,00	0,02±0,00	18,38±0,07	0,05±0,00	3,45±0,00	0,05±0,00	1,23±0,00	0,17±0,00	0,07±0,01	0,02±0,03	0,08±0,04	23,56±0,05
1-TE	0,12±0,00	0,80±0,00	18,43±0,02	0,04±0,00	3,34±0,00	0,05±0,01	1,19±0,00	0,16±0,00	0,08±0,01	ni	0,05±0,01	24,26±0,01
2-ASE/ 25 °C	8,81±0,17	0,08±0,00	27,65±0,48	ni	2,48±0,02	0,04±0,00	0,77±0,01	0,12±0,00	0,78±0,02	0,11±0,00	ni	40,85±0,70
2-ASE/ 100 °C	7,39±0,01	0,01±0,00	25,66±0,03	0,02±0,00	2,77±0,00	0,05±0,01	0,87±0,00	0,16±0,00	0,07±0,00	0,14±0,00	0,04±0,00	37,18±0,04
2-SE	2,49±0,11	0,04±0,01	13,36±0,01	0,01±0,02	0,15±0,02	0,04±0,01	1,13±0,04	0,16±0,01	0,08±0,01	0,16±0,01	0,02±0,03	17,66±0,28
2-TE	6,11±0,00	0,02±0,00	19,96±0,00	0,02±0,00	3,18±0,00	0,05±0,00	1,02±0,00	0,14±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	30,62±0,00
3-ASE/ 25 °C	0,04±0,04	0,28±0,03	0,02±0,00	0,02±0,00	3,37±0,05	0,02±0,02	0,74±0,01	0,09±0,00	0,03±0,01	0,03±0,03	0,03±0,01	4,68±0,02
3-ASE/ 100 °C	0,08±0,00	0,22±0,00	0,13±0,00	0,01±0,02	3,35±0,06	0,03±0,00	0,72±0,00	0,09±0,00	0,03±0,04	ni	0,02±0,03	4,69±0,13
3-SE	0,56±0,00	0,09±0,00	0,42±0,00	0,02±0,00	3,31±0,00	0,03±0,00	0,67±0,00	0,08±0,00	0,04±0,00	ni	0,03±0,00	5,26±0,00
3-TE	0,10±0,00	0,14±0,00	0,30±0,00	0,03±0,00	3,36±0,00	0,03±0,00	0,71±0,00	0,09±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	ni	4,82±0,00
4-ASE/ 25 °C	0,14±0,00	0,04±0,00	64,41±0,08	0,06±0,00	7,11±0,00	0,06±0,00	1,62±0,02	0,18±0,00	0,11±0,00	ni	0,18±0,00	73,90±0,08
4-ASE/ 100 °C	0,22±0,00	0,04±0,00	63,59±0,00	0,05±0,00	7,86±0,06	0,08±0,02	1,56±0,01	0,17±0,00	0,12±0,01	ni	0,17±0,00	73,86±0,01
4-SE	0,06±0,00	0,03±0,00	59,24±0,04	0,06±0,00	8,62±0,05	0,06±0,00	1,68±0,01	0,19±0,00	0,13±0,00	ni	0,02±0,00	70,09±0,08
4-TE	0,14±0,00	0,04±0,00	60,25±0,07	0,06±0,00	8,80±0,01	0,06±0,00	1,70±0,00	0,19±0,00	0,12±0,00	ni	0,02±0,00	71,38±0,05

1=komorač, 2=kim, 3=korijander, 4=zvezdasti anis, ASE=ubrzanu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku, SE=ekstrakcija po Soxhletu, TE=ekstrakcija na tresilici pri sobnoj temperaturi
ni=nije identificirano

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.

Tablica 9. Sastav i udio (%) nezasićenih masnih kiselina u uljima odabranih začinskih sjemenki ekstrahiranim različitim metodama ekstrakcije

Uzorak	C14:1	C16:1	C17:1	C18:1**	C18:2n6	C18:3n6	C18:3n3	C20:1n9	Ukupno
1-ASE/ 25 °C	0,67±0,00	0,09±0,06	0,03±0,00	52,57±0,07	7,53±0,01	0,03±0,00	0,25±0,00	0,02±0,00	61,19±0,14
1-ASE/ 100 °C	0,81±0,00	0,10±0,08	0,04±0,00	56,08±0,06	8,39±0,01	0,03±0,00	0,32±0,00	0,09±0,03	65,86±0,03
1-SE	0,46±0,00	0,13±0,04	0,03±0,00	66,24±0,00	9,17±0,01	0,05±0,00	0,31±0,01	0,04±0,00	76,44±0,05
1-TE	0,45±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	65,92±0,01	8,97±0,00	0,04±0,00	0,26±0,00	0,03±0,00	75,74±0,01
2-ASE/ 25 °C	0,04±0,00	0,09±0,00	0,04±0,00	37,65±1,07	20,68±0,35	0,28±0,01	0,28±0,01	0,10±0,00	59,15±0,70
2-ASE/ 100 °C	0,05±0,00	0,10±0,00	0,04±0,00	39,36±0,01	22,91±0,02	0,01±0,00	0,32±0,00	0,04±0,00	62,82±0,04
2-SE	0,01±0,02	0,08±0,06	0,03±0,02	53,31±1,32	28,38±1,09	0,10±0,00	0,37±0,01	0,06±0,00	82,34±0,28
2-TE	0,03±0,00	0,12±0,00	0,02±0,00	44,15±0,00	24,62±0,00	0,01±0,00	0,39±0,00	0,05±0,00	69,38±0,00
3-ASE/ 25 °C	ni	0,22±0,01	0,03±0,03	81,09±0,17	13,85±0,03	0,03±0,00	0,07±0,08	0,03±0,03	95,32±0,02
3-ASE/ 100 °C	ni	0,21±0,00	0,04±0,00	81,10±0,13	13,74±0,02	0,04±0,00	0,13±0,00	0,05±0,01	95,31±0,13
3-SE	ni	0,21±0,00	0,05±0,00	80,90±0,00	13,38±0,00	0,03±0,00	0,13±0,00	0,04±0,00	94,74±0,00
3-TE	ni	0,22±0,00	0,04±0,00	81,18±0,01	13,53±0,00	0,04±0,00	0,13±0,00	0,05±0,00	95,18±0,00
4-ASE/ 25 °C	0,02±0,00	0,13±0,00	0,06±0,01	12,87±0,02	12,75±0,08	0,07±0,00	0,13±0,00	0,06±0,00	26,10±0,08
4-ASE/ 100 °C	1,24±0,00	0,12±0,03	0,09±0,05	12,20±0,02	12,20±0,09	0,07±0,00	0,16±0,00	0,05±0,00	26,14±0,01
4-SE	1,22±0,00	1,32±0,01	0,11±0,02	13,03±0,02	13,88±0,07	0,09±0,00	0,21±0,00	0,07±0,00	29,91±0,08
4-TE	0,91±0,00	0,09±0,00	0,08±0,00	13,15±0,03	14,15±0,02	0,03±0,00	0,15±0,00	0,05±0,00	28,62±0,05

1=komorač, 2=kim, 3=korijander, 4=zvezdasti anis, ASE=ubrzanja ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, SE=ekstrakcija po Soxhletu, TE=ekstrakcija na tresilici pri sobnoj temperaturi
ni=nije identificirano

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.

**Vrijednost predstavlja zbroj udjela C18:1n12 i C18:1n9 masnih kiselina.

11.3. SASTAV I UDIO STEROLA

Tablica 10. Sastav i udio (mg/100 g) sterola u uljima odabranih začinskih sjemenki ekstrahiranim različitim metodama ekstrakcije

Uzorak	Kampestrol	Kampestanol	Stigmastrol	Klerostrol	β -sitosterol	Sitostanol	Δ 5-avenastrol	Δ 5, 24-stigmastadienol	Δ 7-stigmastrol	Cikloartenol	Δ 7-avenastrol	Ukupno
1-ASE/ 25 °C	15,76±0,19	14,06±1,16	138,45±2,71	ni	105,22±2,15	11,98±0,20	11,99±0,18	6,31±1,02	50,91±2,12	ni	18,87±1,99	373,53±5,44
1-ASE/ 100 °C	26,28±0,65	30,97±0,64	156,31±0,40	ni	161,06±4,76	21,20±1,13	23,43±0,26	148,49±26,19	48,52±0,76	ni	53,32±2,50	669,59±26,70
1-SE	23,66±0,10	ni	169,02±0,02	ni	128,28±0,90	4,61±6,51	20,12±0,60	53,29±0,36	52,13±3,49	ni	21,01±0,77	472,13±10,29
1-TE	29,37±6,01	21,18±3,57	160,87±8,01	ni	145,95±4,78	18,25±1,46	24,56±0,65	85,73±1,49	74,11±18,50	ni	32,61±5,66	592,64±22,77
2-ASE/ 25 °C	27,05±0,03	73,58±0,81	135,78±2,54	1,69±0,17	222,10±0,56	8,48±0,04	5,48±0,06	11,86±0,18	9,65±0,38	37,05±0,29	20,11±0,39	552,83±4,41
2-ASE/ 100 °C	27,28±1,42	16,08±3,28	147,31±2,72	21,49±1,77	295,44±0,09	29,99±0,96	36,44±0,64	71,16±0,01	33,50±0,33	24,30±0,09	59,69±1,37	762,68±9,74
2-SE	34,24±0,09	6,43±0,07	136,39±0,60	7,59±0,94	226,84±0,73	13,74±1,99	6,50±0,87	76,01±1,39	8,01±0,45	53,98±0,46	38,08±0,13	607,80±3,57
2-TE	30,51±0,24	6,71±0,44	156,18±2,96	4,42±0,88	219,74±0,89	18,99±0,17	6,16±0,25	54,72±0,53	17,20±0,26	63,17±0,20	43,98±0,27	621,78±3,05
3-ASE/ 25 °C	48,33±4,93	2,41±1,05	111,46±6,77	5,42±1,82	203,62±8,54	ni	17,81±4,49	6,83±1,19	81,13±2,52	ni	9,39±1,33	486,40±14,07
3-ASE/ 100 °C	60,52±0,07	16,43±1,08	111,45±4,35	4,60±2,40	267,56±2,58	ni	16,19±0,76	83,57±1,91	78,20±1,28	ni	48,80±0,35	687,34±3,07
3-SE	41,38±1,39	3,65±2,18	106,40±7,74	2,74±0,23	127,89±1,67	ni	16,24±0,17	15,86±0,04	63,16±4,86	ni	16,27±0,92	393,60±19,11
3-TE	40,63±0,16	12,78±0,42	107,64±1,63	13,85±1,83	112,21±0,34	ni	19,16±0,23	30,41±2,81	59,10±1,87	ni	22,95±1,58	418,73±1,59
4-ASE/ 25 °C	39,68±0,09	8,04±0,01	10,69±0,00	ni	191,39±0,80	ni	ni	4,49±0,04	ni	ni	ni	254,28±0,92
4-ASE/ 100 °C	58,29±1,32	4,24±0,64	15,99±1,52	ni	285,37±16,74	ni	0,34±0,48	5,37±0,09	ni	ni	ni	369,60±16,29
4-SE	35,98±1,22	ni	18,37±0,11	ni	287,72±3,91	ni	0,69±0,03	5,91±0,60	1,17±0,29	ni	0,83±0,02	350,67±5,96
4-TE	54,45±0,42	4,04±0,24	16,98±0,51	ni	263,24±3,53	ni	2,07±0,43	6,19±0,16	9,34±0,76	ni	3,59±0,12	359,89±4,66

1=komorač, 2=kim, 3=korijander, 4=zvezdasti anis, ASE=ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, SE=ekstrakcija po Soxhletu, TE=ekstrakcija na tresilici pri sobnoj temperaturi
ni=nije identificirano

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.

11.4. SASTAV I UDIO PIGMENATA

Tablica 11. Sastav i udio (mg/100 g) pigmenata u uljima odabranih začinskih sjemenki ekstrahiranim različitim metodama ekstrakcije

Uzorak	Klorofil a	Klorofil b	Ukupni klorofili	Ukupni karotenoidi	Ukupno
1-ASE/ 25 °C	16,48±0,48	9,98±0,16	26,46±0,64	11,86±0,02	38,33±0,62
1-ASE/ 100 °C	25,35±0,14	8,22±0,15	33,56±0,29	9,59±0,08	43,15±0,21
1-SE	30,98±0,51	7,80±0,60	38,78±0,08	14,83±0,11	53,61±0,02
1-TE	21,60±0,51	9,33±0,29	30,94±0,80	12,95±0,01	43,89±0,79
2-ASE/ 25 °C	2,51±0,21	2,94±0,20	5,45±0,41	4,51±0,04	9,96±0,44
2-ASE/ 100 °C	3,49±0,18	3,88±0,07	7,37±0,25	5,40±0,04	12,77±0,29
2-SE	2,17±0,11	1,27±0,03	3,44±0,14	4,52±0,04	7,97±0,18
2-TE	2,67±0,14	2,49±0,08	5,16±0,23	4,85±0,01	10,01±0,23
3-ASE/ 25 °C	2,48±0,05	1,14±0,09	3,62±0,04	1,24±0,06	4,86±0,02
3-ASE/ 100 °C	1,62±0,10	2,69±0,17	4,31±0,26	0,57±0,05	4,88±0,31
3-SE	0,58±0,03	0,89±0,06	1,47±0,09	0,37±0,00	1,84±0,09
3-TE	2,23±0,05	3,92±0,16	6,14±0,10	0,46±0,08	6,60±0,02
4-ASE/ 25 °C	6,76±0,17	2,66±0,14	9,42±0,31	0,66±0,04	10,08±0,35
4-ASE/ 100 °C	9,22±0,09	4,00±0,24	13,22±0,33	0,82±0,02	14,04±0,31
4-SE	15,95±0,22	5,42±0,29	21,38±0,07	0,69±0,05	22,06±0,02
4-TE	11,83±0,56	6,90±0,41	18,73±0,15	2,62±0,04	21,35±0,19

1=komorač, 2=kim, 3=korijander, 4=zvjezdasti anis, ASE=ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, SE=ekstrakcija po Soxhletu, TE=ekstrakcija na tresilici pri sobnoj temperaturi
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija.