

Utjecaj parametara ubrzanе ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku na izolaciju bioaktivnih spojeva iz ploda pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L.)

Staroveški, Ines

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:670217>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2021.

Ines Staroveški

1237/PI

**UTJECAJ PARAMETARA
UBRZANE EKSTRAKCIJE
OTAPALIMA PRI POVIŠENOM
TLAKU NA IZOLACIJU
BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ
PLODA PASJEG TRNA (*Hippophae
rhamnoides* L.)**

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



Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta „**Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi**“ (PlantBioMolecules, KK.01.1.1.04.0093) financiranog sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj- Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014. -2020.



Europska unija
Zajedno do fondova EU



Ministarstvo
znanosti i obrazovanja



Ministarstvo
regionalnoga razvoja i
fondova Europske unije



EUROPSKI STRUKTURNI
I INVESTICIJSKI FONDOVI



Operativni program
KONKURENTNOST
I KOHEZIJA

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojoj dragoj mentorici doc.dr.sc. Maji Repajić na uloženom vremenu, strpljenju, trudu, predanosti i vodstvu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala doktorantici Eni Cegledi i kolegici Pauli Pufek na pomoći, savjetima i ugodnoj atmosferi tijekom rada u laboratoriju.

Veliko hvala mojoj obitelji i svim mojim prijateljicama koji su mi olakšali razdoblje studiranja i pružili mi podršku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ PARAMETARA UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU NA IZOLACIJU BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ PLODA PASJEG TRNA (*Hippophae rhamnoides* L.)

Ines Staroveški, 1237/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je odrediti optimalne procesne parametre ubrzane ekstrakcije otapalima (ASE) pri povišenom tlaku pri kojima se postiže maksimalni prinos bioaktivnih spojeva izoliranih iz ploda pasjeg trna. Tijekom optimiranja uvjeta ASE varirani su parametri ekstrakcije: temperatura (80, 100 i 120 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min) te broj ciklusa (1, 2 i 3 ciklusa), a kao ekstrakcijsko otapalo korištena je 70 %-tna vodena otopina etanola. U dobivenim ekstraktima provedena je spektrofotometrijska analiza te je određen udio ukupnih fenola, klorofila *a* i *b*, ukupnih klorofila te antioksidacijski kapacitet FRAP metodom. Maseni udio ukupnih fenola u plodu pasjeg trna određen je u rasponu vrijednosti od 220,27 do 688,27 mg GAE 100 g⁻¹ s.t., ukupnih klorofila od 18,35 do 99,59 mg 100 g⁻¹ s.t, klorofila *a* od 5,33 do 28,24 mg 100 g⁻¹ s.t, klorofila *b* od 13,02 do 71,35 mg 100 g⁻¹ s.t, a antioksidacijski kapacitet kretao se od 1,07 do 3,24 mmol TE 100 g⁻¹ s.t.. Statistička analiza pokazala je da su svi ispitivani parametri ekstrakcije imali statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) na masene udjele analiziranih spojeva i antioksidacijski kapacitet pri čemu je najviša učinkovitost ASE postignuta pri sljedećim uvjetima: temperatura 120 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 15 min i 3 ciklusa.

Ključne riječi: pasji trn, ASE, ukupni fenoli, biljni pigmenti, antioksidacijski kapacitet

Rad sadrži: 41 stranica, 11 slika, 2 tablice, 54 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc.dr.sc. Maja Repajić

Pomoć pri izradi: Ena Cegledi, mag.ing.techn.aliment.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac (predsjednik)
2. doc.dr.sc. Maja Repajić (mentor)
3. doc.dr.sc. Ivona Elez Garofulić (član)
4. prof.dr.sc. Sandra Balbino (zamjena)

Datum obrane: 16. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Engineering

Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables

Scientific area: Biotechnical

Sciences Scientific field: Food Technology

INFLUENCE OF ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION PARAMETERS ON ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM SEA BUCKTHORN (*Hippophae rhamnoides* L.)

Ines Staroveški, 1237/PI

Abstract: This study aimed to determine the optimum process parameters of the accelerated solvent extraction (ASE) for the maximum yield of bioactive compounds isolated from sea buckthorn. During the optimization of ASE conditions, the extraction parameters were varied: temperature (80, 100 and 120 °C), static extraction time (5, 10 and 15 min) and number of cycles (1, 2 and 3 cycles), while 70% aqueous solution of ethanol was used as an extraction solvent. In obtained extracts spectrophotometric analysis was performed and content of total phenols, chlorophyll *a* and *b*, total chlorophylls as well as antioxidant capacity by FRAP method were determined. The mass fraction of total phenols in the sea buckthorn was determined in the range of 220.27 - 688.27 mg GAE 100 g⁻¹ DM., total chlorophylls 18.35 - 99.59 mg 100 g⁻¹ DM., chlorophyll *a* 5.33 - 28.24 mg 100 g⁻¹ DM., chlorophyll *b* 13.02 - 71.35 mg 100 g⁻¹ DM and antioxidant capacity ranged from 1.07 to 3.24 mmol TE 100 g⁻¹ DM. Statistical analysis showed that all examined extraction parameters significantly affected ($p < 0.01$) the mass fractions of the analyzed compounds and antioxidant capacity, where the highest efficiency of ASE was achieved under the following conditions: temperature 120 °C, static extraction time 15 min and 3 cycles.

Keywords: sea buckthorn, ASE, total phenols, plant pigments, antioxidant capacity

Thesis contains: 41 pages, 11 figures, 2 tables, 54 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Maja Repajić, Assistant professor

Technical support and assistance: Ena Cegledi, mag.ing.techn.aliment.

Reviewers:

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

Thesis defended: July 16th 2021

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. PASJI TRN	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV PLODA PASJEG TRNA	3
2.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI PLODA PASJEG TRNA.....	4
2.3.1. Fenolni spojevi.....	4
2.3.2. Pigmenti	5
2.3.3. Ostali bioaktivni spojevi	7
2.4. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA.....	8
2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJAL	13
3.1.1. Plod pasjeg trna.....	13
3.1.2. Kemikalije i standardi	14
3.1.3. Aparatura i pribor.....	15
3.2. METODE.....	16
3.2.1. ASE	16
3.2.2. Određivanje suhe tvari	18
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.....	18
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila	20
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	21
3.2.6. Statistička analiza.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	23
4.1. UTJECAJ PARAMETARA ASE NA UDIO UKUPNIH FENOLA U PLODU PASJEG TRNA	24
4.2. UTJECAJ PARAMETARA ASE NA UDIO KLOROFILA U PLODU PASJEG TRNA	28
4.3. UTJECAJ PARAMETARA ASE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET EKSTRAKATA PLODA PASJEG TRNA	32
5. ZAKLJUČCI	35
6. LITERATURA	36

1. UVOD

Pasji trn (*Hippophae rhamnoides* L.) jedna od najvrjednijih biljaka i dobiva sve veću pozornost u svijetu s obzirom da predstavlja nutricionistički, medicinski i farmaceutski potencijal. Plod pasjeg trna posjeduje velike količine bioaktivnih tvari poput fenolnih spojeva, tokoferola, klorofila, karotenoida, esencijalnih masnih kiselina i veliki udio polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), a također i neke esencijalne aminokiseline. Više od 60 flavonoida i 10 fenolnih kiselina pronađeno je u plodu pasjeg trna te preko 98 % flavonoida čine flavonoli. Dominantni su derivati izorhamnetina i derivati kvercetina, a plod sadrži i miricetin i kemferol. Upravo zbog takvog sastava pasji trn ima sposobnost zaštite stanica od oksidativnih oštećenja i genetskih mutacija. Također, zbog takve visoke hranjive vrijednosti, interes za plod pasjeg trna sve je veći u Europi i Sjevernoj Americi.

Već godine 1929. zabilježena su prva istraživanja na ekstraktu ploda pasjeg trna i od tada su se nastavila provoditi mnoga istraživanja na ekstraktima pasjeg trna primjenom raznih tehnika analize. Za izolaciju bioaktivnih spojeva koriste se različite tehnike ekstrakcije; konvencionalne i naprednije metode. Konvencionalne tehnike ekstrakcije imaju podosta nedostataka budući da se kod njihovih primjena koriste velike količine otapala, dugotrajne su i u konačnici ne rezultiraju ekstraktima odgovarajuće kvalitete i prinosa, pa se stoga trenutno prioritet daje zelenim tehnikama ekstrakcije koje omogućuju brz i ekološki prihvatljiv učinak s većim prinosom i manjom potrošnjom energije i otapala. Među tim tehnikama je i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE) koja je vrlo učinkovita i cijenjena zbog jednostavne uporabe i u potpunosti automatiziranog postupka. Ova metoda je pogodna za ekstrakciju bioaktivnih spojeva osjetljivih na kisik i toplinu.

Cilj ovog diplomskog rada bio je optimirati uvjete ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku za izolaciju bioaktivnih spojeva (fenolni spojevi i klorofili) iz ploda pasjeg trna. U tu svrhu varirani su temperatura (80, 100 i 120 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min) i broj ciklusa ekstrakcije (1, 2 i 3 ciklusa) uz primjenu 70 %-tnog etanola. U dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su određeni maseni udjeli ukupnih fenola, ukupnih klorofila, klorofila *a* i *b* te je određen antioksidacijski kapacitet FRAP metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PASJI TRN

Pasji trn (*Hippophae rhamnoides* L.) (slika 1) je listopadni grm ili niže stablo visine do 6 m sa snažno razvijenim korijenom porodice zlolesina (*Elaeagnaceae*) (Franjić, 2016). Neka od narodnih imena su mu vučji trn, vukodržica, sibirski ananas, pastrn i zlolesina (Anonymous 1, 2020). Prve reference na njegove terapijske učinke pojavljuju se u 4. stoljeću prije Krista. Prema povijesnim izvorima, primijećeno je da su i pacijenti i ozlijeđeni konji liječeni lišćem i plodovima ove biljke. Reference na njegovu upotrebu također se nalaze i u tibetanskoj tradiciji i u kineskoj medicini. Godine 1929. dogodila se prva biokemijska analiza plodova pasjeg trna i od tada se znanje o njihovim zdravstvenim svojstvima povećava (Zakynthinos i Varzakas, 2015).



Slika 1. Pasji trn (Anonymous 1, 2020)

Pasji trn rasprostranjen je u sjevernoj i srednjoj Europi te na zapadnoj i srednjoj Aziji, u brežuljkastom i rjeđe pretplaninskom pojasu. U prirodi se rasprostranjuje vegetativno ukorjenjivanjem izbojaka donesenih riječnim bujicama, a i sjemenkama koje raznose ptice (endoornitohorno). Raste na toplim, sunčanim mjestima, u svijetlim šumama, na sjenovitim obroncima te na pješčanim i šljunkovitim mjestima (Franjić, 2016). Na stabljici ima stršeće, gole i crvenosmeđe grane čiji se postrani ogranci razvijaju u trnove i te jednogodišnje grane prekrivene su srebrnastosivim dlakama. Listovi su linearni, suličasti, cjelovitog ruba, prekriveni

zvjezdastim dlakama, dugački 5-7 cm i dolaze izmjenično na oko 5 mm dugoj peteljci. Na licu su sivozelene boje, a na naličju srebernastosive. Cvjetovi su dvodomni, sitni i razvijaju se na prošlogodišnjim ograncima. Cvatu u rano proljeće, od ožujka do travnja, prije listanja ili u isto vrijeme. Muški cvjetovi su žuti, jajasti do okruglasti, sastavljeni su u 4 prašnika i skupljeni u guste cvatove, dok su ženski cvjetovi žutozelenkasti, pojedinačni i gusto raspoređeni uzduž izboja. Nakon oprašivanja ženske biljke kukcima, stvaraju se plodovi, velike narančastocrvene bobice koje sadrže jednu tamnosmeđu sjemenku. Pasji trn dozrijeva u kolovozu i rujnu, a plodovi ostaju na grmu i nakon opadanja lišća na golim granama. Plodovi su ukusne sočne bobice koje su ljekovite i hranjive, a osim u narodnoj medicini korišten je u ishrani životinja, posebno konja odakle i naziv grč. hippophaë što znači konjski sjaj (Horvat, 2017).

2.2. KEMIJSKI SASTAV PLODA PASJEG TRNA

Kemijski sastav ploda pasjeg trna varira ovisno o podrijetlu, klimi i načinu ekstrakcije. Prehrambena vrijednost pasjeg trna često se temelji na hranjivoj vrijednosti njegovog ploda. Plod pasjeg trna spada među najhranjivije voće, jer je bogat ugljikohidratima, proteinima i vitaminima (Thomas i Schroeder, 1996), a sadrži i voćne kiseline, askorbinsku kiselinu, flavonoide, karotenoide, masne kiseline i šećerne alkohole (Khan, 2010). Organske kiseline poput jabučne, limunske i kininske kiseline prisutne su u soku pasjeg trna. Upravo zbog prisutnosti organskih kiselina okus ploda pasjeg trna obično se opisuje kao kiselkasti i trpki (Tiitinen i sur., 2005). Od minerala najviše u pasjem trnu ima kalija, bakra, kadmija, željeza, magnezija i cinka (Khan, 2010). U istraživanju Thomas i Schroeder (1996) autori su zaključili da zrelost plodova utječe na količinu minerala, pH, vlagu, glukozu, fruktozu i sadržaj askorbinske kiseline. Pasji trn pruža izvrstan izvor esencijalnih masnih kiselina koje čine 70 % njegovog sastava (Khan, 2010). Sadržaj ulja kreće se od 1,5 do 3,5 % u pulpi voćke i oko 9,9 do 19,5 % u sjemenu. Ulje ploda sadrži vitamin E i karoten (Sabir i sur., 2005), a sam plod je također bogat vlaknima (Qin i sur., 2020).

Fruktoza i glukoza su poznati kao glavni šećeri u plodu pasjeg trna. Tri izomerna oblika fruktoze (α - i β -D-furanoza te β -D-piranoza) i dvije glukoze (α - i β -D-piranoza) pokazali su se kao dominantni šećeri pri analizi pomoću plinske kromatografije (Tiitinen i sur., 2006).

Arif i sur. (2010) u svom istraživanju sugeriraju da je sredina kolovoza najbolji period za berbu, jer je tada u plodovima određen maksimalan udio vitamina C, dok je udio minerala i ulja bio

viši tijekom potpunog dozrijevanja, kada su plodovi ubrani tijekom rujna. Niske temperature i smrzavanje mogu uzrokovati stvaranje kristala i fizikalne promjene koje mogu povećati mogućnost oksidacije. Na pojavu oksidacije utječu različiti čimbenici kao što su svjetlost, zrak, aktivnost vode, prooksidansi i razni enzimi (Pavlović i sur., 2016).

Dokazano je raznim *in vivo* i *in vitro* studijima da plod pasjeg trna ima antioksidativno djelovanje, a uzrok tome je upravo to što posjeduje raznovrsne biološki aktivne spojeve. Također se pokazalo da plodovi pasjeg trna inhibiraju oksidativni stres izazvan nikotinom (Khan, 2010) i imaju protuupalni, antibakterijski, antineoplastični, imunomodulatorni i hepatoprotektivni učinak (Zakynthinos i Varzakas, 2015).

2.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI PLODA PASJEG TRNA

2.3.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi u biljkama su mnogobrojni i pripadaju sekundarnim spojevima u biljnom metabolizmu. S obzirom na njihovu strukturu i funkciju, poznato je nešto više od 8 000 različitih fenolnih spojeva zbog čega se dijele u dvije velike grupe: flavonoide (flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli te antocijani) i neflavonoide (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline te stilbeni). Generička flavonoidna struktura sastoji se od dva aromatska prstena koji su povezani mostom od tri ugljika, koji često postaje dio šesteročlanog heterocikličkog prstena (Fatima i sur., 2015).

Iako su fenolni spojevi prisutni u gotovo svim dijelovima biljke, kemijski sastav i sastav bioaktivnih spojeva ipak se značajno razlikuje u ovisnosti o dijelu biljke (Ren i sur., 2020). Flavonoidi su prisutni u svim dijelovima pasjeg trna te ih svježi plod sadrži 853 mg 100 g⁻¹, dok suho lišće čak 3888 mg 100 g⁻¹ (Khan, 2010).

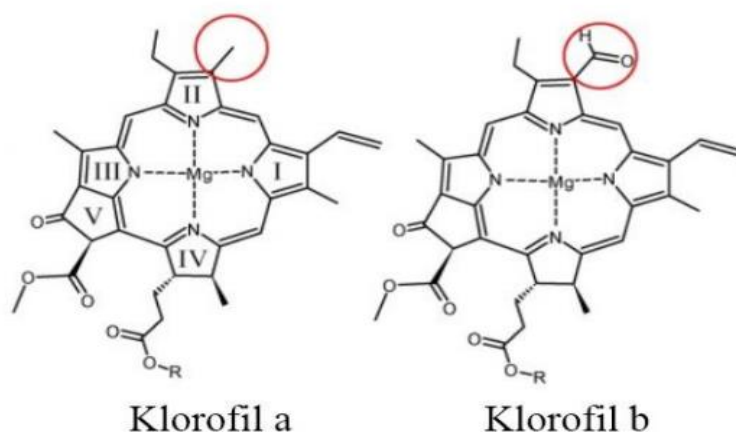
Antioksidacijski kapacitet ploda pasjeg trna uglavnom se pripisuje prisutnim fenolnim spojevima, koji se nalaze u najvećoj količini i imaju najveći inhibicijski učinak. Antioksidanti su spojevi koji inhibiraju slobodne radikale i druge reaktivne vrste kisika. Mnogi bioaktivni spojevi su antioksidanti. Više od 60 flavonoida i 10 fenolnih kiselina pronađeno je u plodu pasjeg trna te preko 98 % flavonoida čine flavonoli. Dominantni su derivati izorhamnetina (od 66 do 72 % ukupnih flavonola) i derivati kvercetina (od 25 do 32 % ukupnih flavonola) (Ren i sur., 2020), a plod sadrži i miricetin i kemferol (Khan, 2010). Varijacije sadržaja flavonoida

pronađene su među različitim podvrstama, mjestima rasta i metodama uzgoja ploda pasjeg trna (Ren i sur., 2020).

Guo i sur. (2016) u svom radu proučavali su neke podvrste pasjeg trna (*Sinensis*, *Yunnanensis*, *Mongolica* i *Turkestanica*) i došli su do zaključka da je podvrsta *Sinensis* imala najraznovrsniji fitokemijski sastav sa značajnom aktivnošću mobilizacije slobodnih radikala kisika, dok je *Yunnanensis* bio vodeći u staničnom antioksidativnom djelovanju i antiproliferativnom djelovanju protiv stanice HepG2 ljudskog karcinoma. Izvanstanična antioksidativna aktivnost bila je usko povezan s prisutnošću ukupnih fenola i flavonoida unutar ekstrakata, dok je stanična antioksidativna aktivnost i antiproliferacija prema HepG2 bila u značajnoj korelaciji s ukupnim fenolnim kiselinama i flavonoidnim aglikonima. Štoviše, fenolne kiseline, kvercetin, kemferol, izorhamnetin i njihovi derivati monoglikozida bili su više učinkoviti u inhibiciji proliferacije HepG2 stanica iako se radilo o niskim koncentracijama. To je potvrdilo da se antiproliferativni učinci ekstrakata pripisuju svojstvenoj kombinaciji i složenoj interakciji fitokemijskih komponenti umjesto jednog ili dva obilna sastojka. Ovi rezultati pružaju temelj za cjelovitu primjenu pasjeg trna u proizvodnji dodataka prehrani protiv raka u prehrambenoj industriji (Guo i sur., 2016).

2.3.2. Pigmenti

Pasji trn se dobro prilagođava sunčanim područjima rasta, pa mu se prema podrijetlu i mijenja omjer prisutnih klorofila *a* i klorofila *b*. Klorofili su fotosintetski pigmenti prisutni u tilakoidu membrane i pridonose zelenoj boji biljaka. Dvije različite vrste klorofila se nalaze u višim biljkama: klorofili *a* i *b* (slika 2). Klorofil se sastoji od tetrapirrolne prstenaste strukture s atomom magnezija u sredina i repa fitola. U radu Anderssona (2009) na plodu pasjeg trna identificiran je spoj klorofila feofitin *a* u koncentracijama u rasponu od 264,2 $\mu\text{g g}^{-1}$. Količina klorofila tijekom zrenja u mnogim plodovima opada (Andersson, 2009). Klorofil *a* brže se razgrađuje pod utjecajem visoke temperature jer je manje stabilan pri višim temperaturama u odnosu na klorofil *b*. Klorofil prelazi u feofitin, pirofeofitin i feoforbid prilikom procesiranja hrane, a nastali derivati pokazuju antimutagena i antikancerogena svojstva (Holdt i Kraan, 2011).



Slika 2. Prikaz kemijske strukture klorofila *a* i klorofila *b* (Saito i sur., 2018)

Istraživanje Sabira i sur. (2005) prikazuje da količina antocijanina u plodu pasjeg trna varira u rasponu od 0,5 do 25 mg L⁻¹. Antocijanini imaju antioksidativna i antikancerogena svojstva te predstavljaju značajan potencijal u prehrambenoj industriji kao sigurno i učinkovito bojilo za hranu. Pokazalo se da crvene bobice pasjeg trna (25 mg L⁻¹) sadrže više antocijanina nego žute (5 mg L⁻¹), narančaste (10 mg L⁻¹) i svijetlo žute (samo 0,5 mg L⁻¹) bobice. Također je utvrđeno da je udio antocijanina u plodu pasjeg trna manji u odnosu na ostalo voće kao što su jabuke, borovnice, kupine, crni ribiz, trešnje, brusnice i jagode budući da boja ploda pasjeg trna uglavnom potječe od karotenoida (Sabir i sur., 2005).

U plodovima pasjeg trna identificirano je ukupno 27 karotenoida, uključujući ksantofile, karotene i esterificirane karotenoide. β-karoten i zeaksantin di-palmitat bili su prevladavajući karotenoidi, njihove koncentracije su 1,9–7,5 mg 100 g⁻¹, odnosno 6,4–18,3 mg 100 g⁻¹ osušenog ploda pasjeg trna (Ren i sur., 2020). β-karoten čini 15-55 % svih spojeva ove skupine, a u nižim koncentracijama su i α-, γ- i dihidroksi-β-karoten, likopen i kantaksantin. Karotenoidi se uglavnom nalaze u mekanim dijelovima ploda, dajući im karakterističnu narančasto-žutu boju (Teleszko i sur., 2015).

2.3.3. Ostali bioaktivni spojevi

Koncentracija vitamina C u plodu pasjeg trna kreće se u rasponu od 28 do 2500 mg100 g⁻¹ bobica raznih vrsta. Razni čimbenici utječu na koncentraciju vitamina C, uključujući temperaturu, vrijeme berbe, podrijetlo i način obrade. Plodovi pasjeg trna sadrže i vitamine A, B1, B2, K i P. Sjemenke i plodovi pasjeg trna bogati su α -tokoferolom (vitamin E). Koncentracija tokoferola i tokotrienola kreće se 100-300 mg 100 g⁻¹. Vitamin C u plodu pasjeg trna, zajedno s tokoferolima i tokotrienolima, ima snažno antioksidativno djelovanje (Khan, 2010).

Što se tiče fitosterola, koji imaju sposobnost snižavanja kolesterola u krvnoj plazmi, β -sitosterol je glavni fitosterol u pasjem trnu, a najviša ukupna razina sterola dobivena je superkritičnom ekstrakcijom ugljičnim dioksidom u usporedbi s ekstrakcijom heksanom i hladnim prešanjem (Ren i sur., 2020). Rezultati analize plinskom kromatografijom su pokazali da se u ispitivanim ekstraktima nalazi 14 različitih spojeva koji pripadaju trima podrazrednim biljnim sterolima, a to su 4-desmetil steroli (derivati kolestanola, uključujući β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol i Δ^5 -avenasterol), 4-amonometil steroli i 4,4-dimetil steroli. Plod pasjeg trna možemo smatrati i dragocjenim izvorom skvalena. Ovisno o sorti, u jednom istraživanju izolirana lipidna frakcija iz pulpe ploda sadržavala je između 885,71 i 2714,37 μg 100 ml⁻¹ skvalena (Tiitinen i sur., 2006).

Glavne masne kiseline u silaznom redoslijedu prema istraživanju Yang i sur. (2001) u sjemenskom ulju bile su linolna, R-linolenska, oleinska, palmitinska, stearinska i vakcenska kiselina. Celulozno ulje ima visok udio palmitoleinske kiseline (do 43 %) i budući da je ova masna kiselina glavni sastojak masnoće na koži, ulje pulpe pasjeg trna koristi se u kozmetičke i ljekovite svrhe (Fatima i sur., 2012). Prema rezultatima analize plinskom kromatografijom Cakir i sur. (2004), u svim ekstraktima pasjeg trna količine nezasićenih masne kiseline bile su veće od zasićenih, što je još jedan dokaz da konzumacija pasjeg trna pozitivno utječe na zdravlje.

2.4. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA

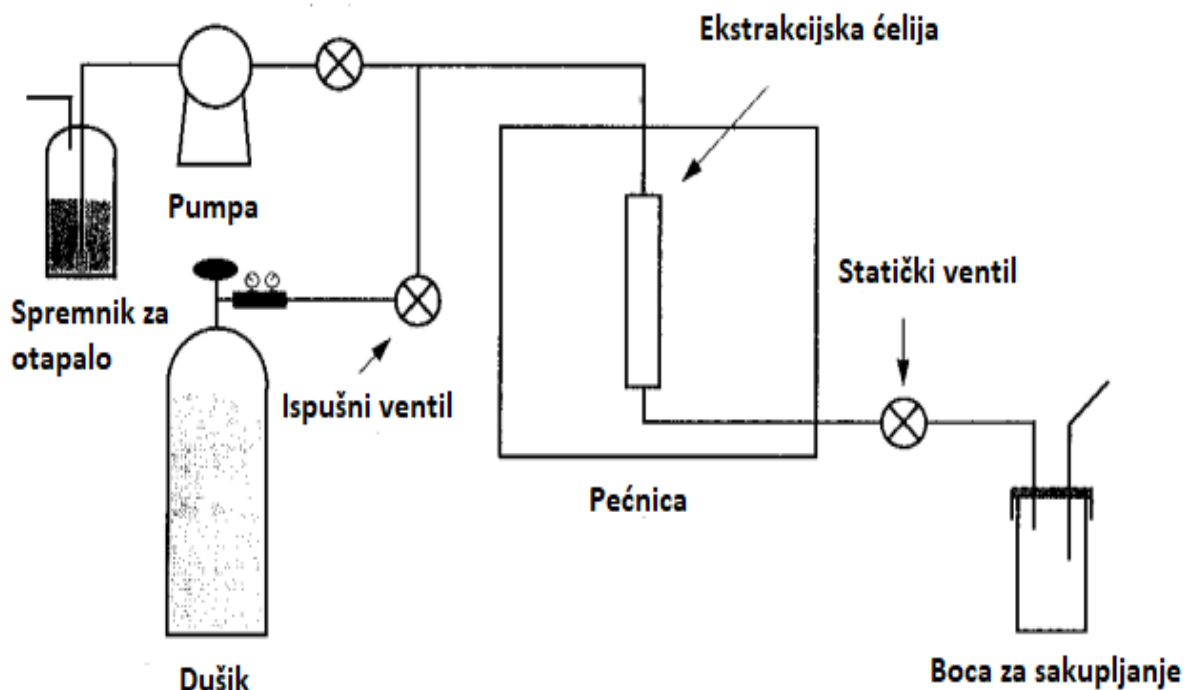
Ekstrakcija se definira kao proces izdvajanja neke tvari iz čvrste ili tekuće smjese prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka smjese. Princip ekstrakcije temelji se na pojavi molekulske difuzije, koju karakterizira izjednačavanje koncentracija otopljenih tvari u sustavima koji dođu u međusobni dodir (Lovrić, 2003).

Učinkovitost postupka ekstrakcije ovisi o vrsti i polarnosti otapala, vremenu i temperaturi ekstrakcije, omjeru količine uzorka i otapala te o kemijskim i fizikalnim svojstvima uzorka (Dai i Mumper, 2010). Ne postoji niti jedna standardna metoda ekstrakcije za izolaciju bioaktivnih spojeva iz prirodnih izvora, a najčešće se zbog visoke učinkovitosti i jednostavnosti koristi klasična ekstrakcija otapalima (Soxhlet ekstrakcija, evakolacija, maceracija, perkolacija, refluks). Konvencionalni procesi ekstrakcije u industrijskom mjerilu imaju velike nedostatke kao što su nepotpuno iskorištenje ekstrakta, uporaba iznimno velike količine organskih otapala te visoka potrošnja energije zbog izrazito dugog vremena ekstrakcije i intenzivnog zagrijavanja i/ili miješanja tijekom ekstrakcije. Stoga se u posljednje vrijeme sve više ispituju mogućnosti primjene naprednijih metoda koje uključuju ekstrakciju uz upotrebu superkritičnih tekućina (SFE), ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE), ekstrakcija superpregrijanom vodom (SWE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija potpomognuta hladnom atmosferskom plazmom (HVED), ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (HPAE), mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME), ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem (PEF), enzimima potpomognuta ekstrakcija (EAE) i ubrzana ekstrakcija otapalima uz povišeni tlak (ASE/PLE). Navedene metode se koriste kao alternativa uobičajenim postupcima s brojnim prednostima kao što su kraće vrijeme ekstrakcije, smanjena potrošnja energije i organskih otapala, smanjeno onečišćenje okoliša te veći prinos (Wang i Weller, 2006). Takve novije tehnike omogućavaju provedbu ekstrakcije bioaktivnih tvari bez primjene organskih otapala pri čemu se kao otapalo može koristiti neka tzv. "zelena otapala" npr. voda, etanol, superkritički fluidi, D-limonen, eutektička otapala i dr. Najčešće korišteno otapalo iz prirodnog izvora je etanol, koji se dobiva fermentacijom materijala bogatih šećerom kao što su šećerna repa i žitarice. Iako je zapaljiv i potencijalno eksplozivan, etanol se koristi u velikoj mjeri jer je lako dostupan, ima nisku cijenu i potpuno je biorazgradiv. Za odabir otapala bitna je velika selektivnost tj. da dobro otapa ključne komponente, a da ne otapa druge sastojke, zatim nemiješljivost primarnog i sekundarnog otapala, jednostavna regeneracija, velika razlika gustoća, siguran rad i nereaktivnost s biljnim

sastavnicama. Također, ono ne smije nagrizati materijal strojeva, treba biti neškodljiv za ljudsko zdravlje, dostupan i jeftin (Škevin, 2018). Etanol i voda kao otapala u odnosu na aceton, metanol i druga organska otapala smatraju se sigurnijim i pogodnijim za primjenu u prehrambenoj industriji (Oktay i sur., 2003).

2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *accelerated solvent extraction*, ASE) je potpuno automatizirana tehnika brze ekstrakcije, uvedena 1995. godine od strane američke tvrtke Dionex (Gan i sur., 1999). U ASE sustavu postupak se provodi pri temperaturama višim od točke vrelišta otapala (50-200 °C) što podrazumijeva da se tlak unutar ekstrakcijske ćelije mora držati visoko (10-15 MPa) kako bi se otapalo održalo u tekućem stanju. Uređaj se sastoji od spremnika za otapalo, pumpe, pećnice koja sadrži ekstrakcijsku ćeliju, različitih ventila i restriktora te boca za sakupljanje (slika 3). S obzirom da se koriste visoka temperatura i tlak, materijal mora biti otporan na koroziju (Alvarez-Rivera i sur., 2020), a svaki korak ovisi o mnogim čimbenicima koji se mogu mijenjati promjenom temperature i tlaka (Giergielewicz-Možajska, 2001).



Slika 3. Shema ASE aparature (Richter i sur., 1996)

Temperatura koja se koristi tijekom postupka utječe na svojstva otapala i jedan je od najvažnijih parametara za ovu vrstu ekstrakcije. Viša temperatura znači ujedno i veći prinos, ali to treba pažljivo ispitati, jer je općepoznato da su neki bioaktivni spojevi termolabilni i visoke temperature mogu negativno utjecati na njihovu bioaktivnost. Isto tako, određene kemijske reakcije mogu se dogoditi kod viših temperatura i reakcije mogu stvoriti otrovne ili neželjene spojeve (Alvarez i Rivera, 2020). Visoka temperatura uzrokuje povećanje topljivosti analita (npr. u rasponu temperatura od 50 do 150 °C, topljivost antracena u idealnoj otopini procjenjuje se da se povećava za faktor 13), povećanje brzine difuzije (npr. u rasponu temperatura od 25 do 150 °C procjenjuje se da će se brzina difuzije povećati 2 do 10 puta), slabljenje i narušavanje jakih interakcija između analita i komponenata matrice, odnosno van der Waalsovih sila (dipol-dipol, dipolom inducirani dipol i disperzivne) i vodikovih veza, smanjenje viskoznosti i površinske napetosti otapala, što ujedno i dopušta bolji prodor u pore i između čestice matrice i poboljšava prijenos mase (Giergielewicz-Možajska, 2001).

Uz temperaturu ekstrakcije, važan faktor je izbor ekstrakcijskog otapala. Većina ASE sustava u literaturi koristi organska otapala koja se obično koriste u konvencionalnim tehnikama, npr. metanol, u kojem su mnogi organski spojevi vrlo topljivi (Shams, 2015), a mogu se koristiti čak i ona otapala koja nisu učinkovita u uobičajenim metodama, osim onih koji su samozapaljivi pri temperaturama od 40 do 200 °C (npr. ugljični disulfid, dietil eter i 1,4-dioksan). Općenito, jake baze i kiseline treba izbjegavati kao otapala jer su korozivne. Iako ASE omogućuje upotrebu otapala koja se ne koriste u konvencionalnim tehnikama, to može rezultirati otapanjem komponenata matriksa, koje bi inače ostale netopljive u uvjetima konvencionalne ekstrakcije, zbog čega je selektivnost često teško postići kada se analiziraju uzorci iz okoliša. Složeniji je zadatak ekstrakcija krutih uzoraka iz okoliša, koji se sastoje od složenih smjesa različite vrste u različitim koncentracijama. Pri povišenoj temperaturi i tlaku postupak ekstrakcije odvija se brže, ali se smanjuje selektivnost te se složenost ovog analitičkog postupka povećava s povećanjem broja organskih spojeva prisutnih u uzorku (Giergielewicz-Možajska, 2001). Smjesa hidroetanol (EtOH > 50 %), zakiseljena ili ne, poželjno je otapalo za ekstrakciju polifenola ovom metodom (Alvarez-Rivera i sur., 2020).

Važni parametri za ekstrakciju su i statičko vrijeme ekstrakcije te broj ciklusa ekstrakcije. Određeni uzorci mogu zadržati analite unutar pora pa povećavanje statičkog vremena pri povišenoj temperaturi može dopustiti tim spojevima da difundiraju u ekstrakcijsko otapalo. Svrha statičkog ciklusa je uvođenje svježeg otapala tijekom postupka ekstrakcije što pomaže u održavanju povoljne ravnoteže ekstrakcije. Statičko vrijeme može se prilagoditi kako bi se

smanjilo ukupno vrijeme ekstrakcije. Na primjer, mogu se koristiti tri statička ciklusa od 3 min umjesto jednog statičnog ciklusa od 10 min (Mottaleb i Sarker, 2012).

Veliku ulogu u ekstrakciji ima i veličina čestica. Općenito, učinkovitost ekstrakcije raste sa smanjenjem veličine čestica (Li i sur., 2006). Uglavnom je potrebno da veličina čestica bude manja od 1 mm (Mottaleb i Sarker, 2012) i zbog toga se uzorak obično prvo suši, homogenizira i prosijava. Ako uzorak nije dovoljno suh ili ako se koristi nepolarano otapalo, onda uzorak treba pomiješati sa sredstvom za sušenje (npr. bezvodnim natrijevim sulfatom ili dijatomejskom zemljom). Ako su čestice uzorka okružene tankim slojem vode onda analiti vezani za matriks nemaju mogućnost doći u kontakt s otapalom. Drugi razlozi za dodatak sredstva za sušenje je smanjenje volumena ćelije (Giergielewicz-Možajska, 2001) i kako ne bi došlo do začepljenja ćelije uzorkom (Mottaleb i Sarker, 2012). U slučaju ekstrakcije vlažnih ili sedimentiranih uzorka, kako bi se uklonio negativni učinak koji je prethodno opisan, preporučljivo je koristiti mješavinu polarnog i nepolarnog otapala (npr. aceton s heksanom ili heptanom ili diklormetanom). Ponekad se u ćelije uz uzorak dodaje i bakar u svrhu uklanjanja sumpora (Giergielewicz-Možajska, 2001).

Postoji nekoliko vrsta ekstrakcijskih ćelija s različitim volumenima (11, 22 ili 33 ml) koje se mogu koristiti u sustavu ASE i one mogu raditi u režimu predgrijavanja ili predpunjenja. Način predpunjenja omogućuje uklanjanje intersticijalnog zraka i sprječava razgradnju lako oksidirajućih spojeva. Iz istog razloga preporučuje se otplinjavanje otapala prije ekstrakcije (Giergielewicz-Možajska, 2001).

Postupak ekstrakcije može se provesti na statički ili dinamički način. Kod dinamičkog načina, otapalo kontinuirano teče kroz uzorak, dok se kod statičkog načina rada, uzorak i otapalo održavaju određeno vrijeme pri konstantnoj temperaturi i tlaku (Alvarez i Rivera, 2020). Iako dinamička varijacija ekstrakcije poboljšava prijenos mase, ova vrsta ekstrakcije se rijetko koristi, uglavnom zbog veće potrošnje otapala u usporedbi sa statičkim postupkom (Giergielewicz-Možajska, 2001).

Na kraju ekstrakcije uzorak se obično ispire dijelovima svježeg otapala. Zatim se čitav sustav pročišćuje dušikom. Ova dva koraka imaju za cilj uklanjanje ostataka uzorka iz ASE sustava radi poboljšanja prinosa analita i za pripremu sustava za sljedeći postupak ekstrakcije.

Prednosti ASE sustava su te što je jednostavan za uporabu, sama ekstrakcija kratko traje (obično oko 15 min), mala je potrošnja otapala u koraku ekstrakcije (oko 15-25 mL), moguće je upotrijebiti gotovo bilo koju vrstu otapala, osim jakih kiselina i baza ili otapala s temperaturom

vrelišta od 40 do 200 °C, mogu se koristiti pojedinačna otapala ili smjesa otapala i otapala općenito nije potrebno odzračivati (iznimka je ako analit od interesa ima lako oksidirajuća svojstva). Nadalje, priprema uzorka je brza i jednostavna, omogućeno je ekstrahiranje 24 uzorka u jednom ciklusu i potpuno automatizirani sustav kontrolira postupak te to rezultira velikom ponovljivošću parametra ekstrakcije (temperatura, tlak, statičko vrijeme, volumen ispiranja).

Negativne strane ovog sustava su vrlo visoka cijena opreme (aparata i rezervnih dijelova), ekstrakcijske ćelije sastoje se od 11 komada, što postupak pranja čini vrlo složenim i uzrokuje značajno povećanje potrošnje otapala, zatim pročišćavanje ekstrakta je obično potrebno prije konačne analize jer se osjetljivost i razlučivost kromatografske analize brzo pogoršava kada se ekstrakti ne pročiste prije analize, općenito ekstrakcija nije selektivna i ponekad jedan ciklus postupka ekstrakcije daje različite količine ekstrakta (to je vjerojatno posljedica poremećaja rada statičkog ventila) (Giergielewicz-Możajska, 2001).

Bursać-Kovačević i sur. (2018) optimirali su različite parametre ASE, kao što su vrijeme ekstrakcije, temperatura i broj ciklusa ekstrakcije za ekstrakciju terpenoidnih spojeva, poput steviol glikozida i karotenoida, i drugih bioaktivnih spojeva iz *Stevia rebaudiana* Bertoni. Optimalni uvjeti za ekstrakciju terpenoida bili su 160 °C i 30 min uz ciklus od 10 min, što pokazuje da ASE može biti učinkovito korištena za ekstrakciju termički labilnih i nepolarnih do polarnih komponenata u lišću stevije.

U radu Montera i sur. (2018) ASE je korišten za ekstrakciju karotenoida i klorofila iz mikroalgi *Chlamydomonas* sp. U ovom slučaju glavni karotenoid identificiran u ekstraktu koristeći najselektivnije uvjete (100 %-tni etanol, 40 °C tijekom 20 min) bio je lutein, iako je ovaj ekstrakt također bio bogat klorofilom feofitinom.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom istraživanju provedeno je optimiranje ekstrakcijskih uvjeta ASE (temperatura, statičko vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa ekstrakcije) za izolaciju fenolnih spojeva i klorofila iz liofiliziranog ploda pasjeg trna. U dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su određeni ukupni fenoli, klorofili i antioksidacijski kapacitet.

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Plod pasjeg trna

Za izolaciju biološki aktivnih spojeva iz ploda pasjeg trna korišten je uzorak ploda pasjeg trna uzgojen u kontinentalnoj Hrvatskoj (Hrvatsko zagorje) tijekom 2020. godine. Nakon branja, uzorci ploda dopremljeni su u laboratorij te pohranjeni pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prije liofilizacije, uzorci ploda su pohranjeni pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 24 h, nakon čega se provela liofilizacija pri $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ u vremenu 5 dana. Liofilizirani plodovi su zapakirani u polipropilenske vrećice, hermetički zatvoreni te pohranjeni pri sobnoj temperaturi do provođenja ekstrakcije. Neposredno prije ekstrakcije, liofilizirani uzorci ploda usitnjeni su pomoću štapnog miksera (slika 4).



Slika 4. Osušeni i usitnjeni plod pasjeg trna (vlastita fotografija)

3.1.2. Kemikalije i standardi

- Dijatomejska zemlja, 6/60 mesh, 26033 (Restek Corporation, Bellefonte, SAD)
- Etanol, 96 %-tni (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Etanol, 70 %-tni, odzračeni

Priprema: kako bi se dobilo 2000 mL 70 %-tnog etanola, 1458 mL 96 %-tnog etanola stavi se u odmjernu tikvicu i ista se do oznake nadopuni sa vodom, dio se prebaci u staklenu bocu i odzračuje 45 min.

- Destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev karbonat, anhidrid (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata, 20 %-tna otopina

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

- Galna kiselina (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 5 mg mL⁻¹

Priprema: odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom.

- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 2 mM

Priprema: odvaži se 0,0501 g Troloxa i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom.

- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba)
- Klorovodična kiselina, 40 mM

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

- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM

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

- Željezo (III)-klorid heksahidrat (FeCl₃ x 6H₂O) (Gram-Mol)
- Željezo (III)-klorid heksahidrat (FeCl₃ x 6H₂O), 20 mM otopina

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

- Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna (Carlo Erba)
- Natrij-acetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$) (Kemika)
- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3.6

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

- FRAP reagens

Priprema: u staklenoj čaši volumena 50 mL pomiješa se 20 mL acetatnog pufera (0,3 M), 2 mL TPTZ reagensa i 2 mL željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Liofilizator Alpha 1-4 LSCPlus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka)
- Analizator vlage (Ohaus MB25, Parsippany, New Jersey)
- Štapni mikser (Philips, Promix 650W, Amsterdam, Nizozemska)
- ASE ekstraktor, ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, SAD)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex Digitec DT 514, Bandelin electronic GmbH & Co., Berlin, Njemačka)
- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, Radnor, SAD)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)

Pribor:

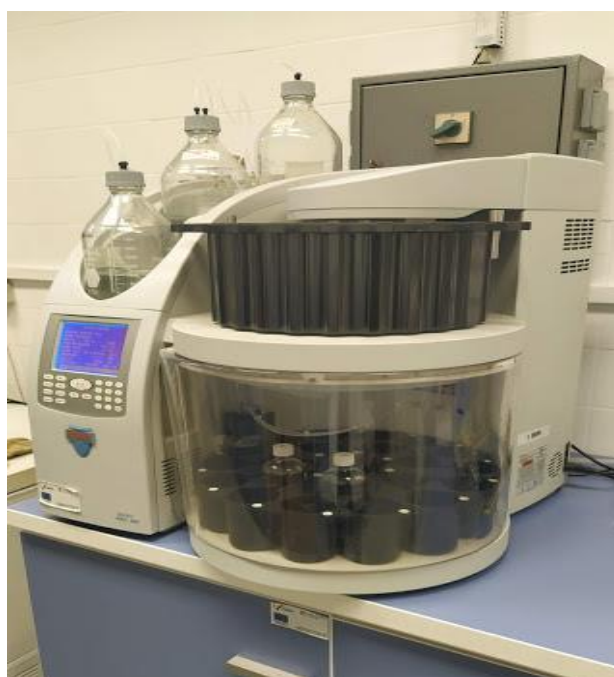
- Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (Thermo Scientific, 34 mL)
- Celulozni filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Odmjerne tikvice (5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL, 1000 mL)
- Plastična lađica za vaganje

- Plastične epruvete (Falcon) (50 mL)
- Stakleni lijevci
- Staklene boce za ekstrakciju (Thermo Scientific) (250 mL)
- Staklene kivete
- Mikropipete Eppendorf (100 μ L, 1000 μ L, 5 mL)
- Staklene epruvete,
- Stalak za epruvete
- Staklene kivete
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL, 250mL)
- Spatula
- Menzura (50 mL, 150 mL)

3.2. METODE

3.2.1. ASE

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz ploda pasjeg trna provedena je primjenom ASE uz upotrebu 70 %-tne vodene otopine etanola (odzračeni) kao ekstrakcijskog otapala. ASE je provedena na uređaju ASE 350TM (slika 5). U svrhu definiranja ekstrakcijskih uvjeta pri kojima se postižu najviši prinosi fenolnih spojeva i pigmenta varirani su temperatura (80, 100 i 120 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min) i broj ciklusa ekstrakcije (1, 2 i 3) (tablica 1).



Slika 5. ASE 350TM ekstraktor (vlastita fotografija)

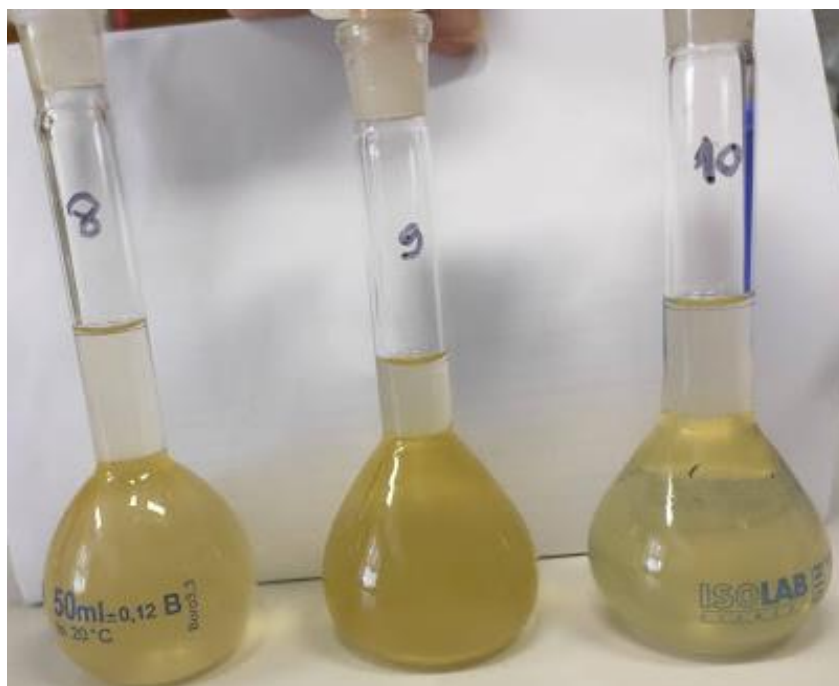
Tablica 1. Eksperimentalni dizajn

UZORAK	TEMPERATURA (°C)	STATIČKO VRIJEME (min)	BROJ CIKLUSA
1	80	5	1
2	80	5	2
3	80	5	3
4	80	10	1
5	80	10	2
6	80	10	3
7	80	15	1
8	80	15	2
9	80	15	3
10	100	5	1
11	100	5	2
12	100	5	3
13	100	10	1
14	100	10	2
15	100	10	3
16	100	15	1
17	100	15	2
18	100	15	3
19	120	5	1
20	120	5	2
21	120	5	3
22	120	10	1
23	120	10	2
24	120	10	3
25	120	15	1
26	120	15	2
27	120	15	3

Postupak:

Na analitičkoj vagi odvaže se u plastičnoj čašici približno $1 \pm 0,001$ g uzorka liofiliziranog i usitnjenog ploda pasjeg trna te se promiješa s jednom mjericom dijatomejske zemlje i prebaci u ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika veličine 34 mL na čije su dno prethodno postavljena 2 celulozna filtera. U ćelije se zatim dodatno dodaje dijatomejska zemlja do ispunjenja gotovo cijelog volumena ćelije. Ćelija se potom očisti od ostataka dijatomejske zemlje i ručno zatvara. Zatvorena ćelija postavlja se na predviđeno mjesto u ASE ekstraktor i ekstrakcije se provode variranjem uvjeta temperature, statičkog vremena ekstrakcije i broja ciklusa ekstrakcije pri čemu su fiksni uvjeti: tlak 10,34 MPa, volumen ispiranja 30 %, a vrijeme propuhivanja dušikom 30 s. Dobiveni ekstrakti sakupljaju se u staklene boce koje se nalaze u donjem dijelu uređaja i

prenose u odmjernu tikvicu od 50 mL (slika 6) koja se nadopuni do oznake ekstrakcijskim otapalom. Pripremljeni ekstrakti prebace se u plastične epruvete i skladište pri +4 °C do daljnje analize.



Slika 6. Ekstrakti ploda pasjeg trna (vlastita fotografija)

3.2.2. Određivanje suhe tvari

Suha tvar ploda pasjeg trna određena je pomoću analizatora vlage. Kako bi vrijeme sušenja bilo kratko potrebno je odabrati malu količinu uzorka, ali dovoljnu da bi se održala potrebna točnost mjerenja. Uzorci moraju uvijek biti jednoliko raspoređeni (tj. treba se izbjegavati nagomilavanje) kako bi se dobili točni i ponovljivi rezultati. Prethodno liofiliziran i usitnjen plod pasjeg trna mase 2,9995g sušio se otprilike 30 min te određena suha tvar iznosi 90,98 %.

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

Određivanje koncentracije ukupnih fenola provodi se u ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode. Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji između Folin-

Ciocalteu reagensa i reducirajućeg reagensa, polifenola. Nastali plavo obojeni kompleks intenzivniji je što je veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Nastali intenzitet obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja:

U staklenu epruvetu redom se otpipetira 100 μL ekstrakta, 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Zasićena otopina natrijeva karbonata (1 mL) dodaje se nakon 3 minute. Nakon toga slijedi miješanje (pomoću Vortexa) i termostatiranje pripremljenih uzoraka 25 minuta pri 50 °C. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima ekstrakcijsko otapalo (70 %-tni etanol).

Izrada baždarnog pravca i izračun:

Od pripremljene otopine galne kiseline (5 mg mL⁻¹) rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom nadopuni do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg L⁻¹. Iz svake tikvice otpipetira se 100 μL otopine standarda u staklene epruvete te se redom dodaje 200 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute dodaje se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa (pomoću Vortexa), a uzorci se potom termostatiraju 25 minuta pri 50 °C. Za slijepu probu uzima se 100 μL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca [1]:

$$Y = 0,0035 \times X \quad (R^2=0,9998) \quad [1]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm

X – koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹)

R² – koeficijent determinacije

Koncentracije ukupnih fenola izražene su u mg GAE 100 g⁻¹ suhe tvari (mg GAE 100 g⁻¹ s.t.) kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila

Princip određivanja:

Određivanje biljnih pigmenata (klorofila *a* i klorofila *b*) bazira se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama. Spektrofotometrijsko mjerenje provodi se u ekstraktu pri valnim duljinama 648,6 i 664,1 nm (u skladu s korištenim ekstrakcijskim otapalom) (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

Postupak određivanja:

Kvantitativno određivanje biljnih pigmenata provodi se spektrofotometrijski pri valnim duljinama 648,6 i 664,1 za klorofil *a* i *b* (u skladu s korištenim ekstrakcijskim otapalom, etanolom). Kao slijepa proba koristi se otapalo koje je korišteno za ekstrakciju (70 %-tni etanol). Apsorbanciju slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka, a tako dobivena vrijednost koristi se za izračunavanje konačnog rezultata.

Izračun:

Udjeli klorofila *a* i *b* računaju se prema sljedećim jednadžbama (Lichtenthaler i Buschmann, 2001) [2-3]:

Etanol:

$$c_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13,36 A_{664,1} - 5,19 A_{648,6} \quad [2]$$

$$c_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27,43 A_{648,6} - 8,12 A_{664,1} \quad [3]$$

gdje je:

A = apsorbancija

c_a = klorofil *a*

c_b = klorofil *b*

Koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih klorofila ($c_a + c_b$) izražene su u mg 100 g⁻¹ s.t. kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

Princip određivanja:

FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u kiselom mediju pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridil-triazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996). FRAP vrijednosti najčešće se izražavaju preko FeSO₄, askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta (Benzie i Strain, 1996).

Postupak određivanja:

U staklene epruvete redom se otpipetira 240 µL destilirane vode, 80 µL uzorka i 2080 µL FRAP reagensa, dobro se promiješa (pomoću Vortexa) te termostatira 5 min pri 37 °C. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, gdje se umjesto uzorka dodaje ekstrakcijsko otapalo (70 %-tni etanol).

Izrada baždarnog pravca i izračun:

Za izradu baždarnog pravca pripremi se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline) tako da se odvaži 0,0501 g Troloxa i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom. Od pripremljene otopine Troloxa rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 10 mL tako da se redom otpipetira 0,125, 0,5, 0,625, 1,25, 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa u svaku tikvicu. Odmjerne tikvice potom se nadopune do oznake 96 %-tnim etanolom. Koncentracije Troloxa u tim tikvicama iznose: 25, 100, 125, 250, 500 i 1000 µmol L⁻¹. Nakon toga, u staklene epruvete redom se otpipetira 240 µL destilirane vode, 80 µL otopine standarda iz prethodno pripremljenih razrjeđenja i 2080 µL FRAP reagensa. Potom slijedi miješanje (pomoću Vortexa)

i termostatiranje pri 37 °C. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, gdje se umjesto uzorka dodaje 70 %-tni etanol. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisu nanose koncentracije Troloxa ($\mu\text{mol L}^{-1}$), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 593 nm. Antioksidacijski kapacitet uzorka određen FRAP metodom izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca [4]:

$$Y = 0,0013 \times X \quad (R^2=0,9995) \quad [4]$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

X – ekvivalent Troloxa (TE) ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

R^2 – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražen je u mmol TE 100 g⁻¹ s.t. kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

3.2.6. Statistička analiza

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Eksperiment je dizajniran kao puni faktorijski dizajn. Za statističku analizu primijenjena je multifaktorska analiza varijance (MANOVA) uz Tukey HSD test, pri čemu je statistički značajna razlika razmatrana na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti).

4. REZULTATI I RASPRAVA

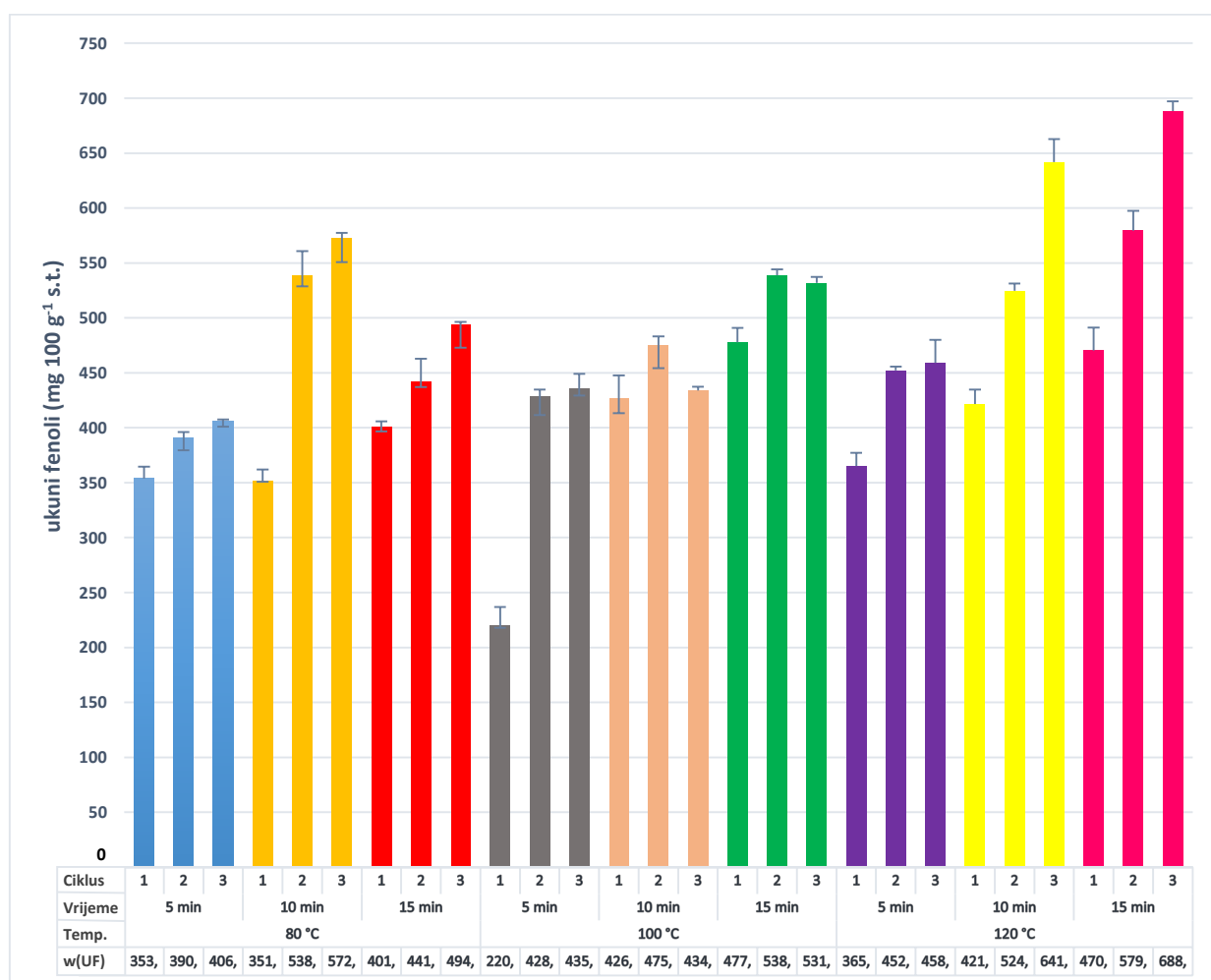
U ovom istraživanju provedeno je optimiranje uvjeta ASE za izolaciju bioaktivnih spojeva (fenolni spojevi i klorofili) iz osušenog ploda pasjeg trna. Kao ekstrakcijsko otapalo korišten je 70 %-tni odzračeni etanol.

Tijekom optimiranja uvjeta ASE, varirani su parametri ekstrakcije: temperatura (80, 100 i 120 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min) te broj ciklusa (1, 2 i 3 ciklusa). U dobivenim ekstraktima provedena je spektrofotometrijska analiza te je određen udio ukupnih fenola, klorofila *a* i *b*, ukupnih klorofila i antioksidacijski kapacitet.

Dobiveni rezultati obrađeni su primjenom MS Excel programa te grafički prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja $\pm$ standardna devijacija (slike 7, 8, 9, 10 i 11). Također, dobiveni rezultati statistički su obrađeni, a rezultati statističke analize prikazani su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (tablica 2).

4.1. UTJECAJ PARAMETARA ASE NA UDIO UKUPNIH FENOLA U PLODU PASJEG TRNA

Maseni udio ukupnih fenola u plodu pasjeg trna nakon provedene ASE određen je u rasponu vrijednosti od 220,27 mg GAE 100g⁻¹ s.t. do 688,27 mg GAE 100 g⁻¹ s.t. (slika 7) s prosječnom vrijednošću 463,77 mg GAE 100 g⁻¹ s.t. (tablica 2). Najniži maseni udio ukupnih fenola određen je u uzorku 10 koji je dobiven pri temperaturi 100 °C, statičkom vremenu 5 min uz 1 ciklus ekstrakcije, a najviši maseni udio ukupnih fenola određen je u uzorku 27 koji je dobiven pri temperaturi 120 °C, statičkom vremenu 15 min uz 3 ciklusa ekstrakcije (slika 7).



Slika 7. Maseni udio ukupnih fenola izoliranih iz ploda pasjeg trna primjenom ASE

Tablica 2. Utjecaj parametara ASE na udio ukupnih fenola, klorofila i antioksidacijski kapacitet ploda pasjeg trna

Parametri ekstrakcije	Ukupni fenoli (mg GAE 100 g ⁻¹ s.t.)	Ukupni klorofili (mg 100 g ⁻¹ s.t.)	Antioksidacijski kapacitet (mmol TE 100 g ⁻¹ s.t.)
Temperatura (°C)	p < 0,01*	p < 0,01*	p < 0,01*
80	439,00±3,07 ^a	33,85±0,06 ^a	1,75±0,02 ^a
100	440,94±3,07 ^a	46,01±0,06 ^b	1,76±0,02 ^a
120	511,37±3,07 ^b	74,16±0,06 ^c	2,35±0,02 ^b
Statičko vrijeme (min)	p < 0,01*	p < 0,01*	p < 0,01*
5	390,12±3,07 ^a	42,98±0,06 ^a	1,63±0,02 ^a
10	487,51±3,07 ^b	54,43±0,06 ^b	1,99±0,02 ^b
15	513,68±3,07 ^c	56,61±0,06 ^c	2,23±0,02 ^c
Broj ciklusa	p < 0,01*	p < 0,01*	p < 0,01*
1	387,57±3,07 ^a	39,27±0,06 ^a	1,58±0,02 ^a
2	485,49±3,07 ^b	53,75±0,06 ^b	2,03±0,02 ^b
3	518,25±3,07 ^c	61,01±0,06 ^c	2,25±0,02 ^c
Prosječna vrijednost	463,77	51,34	1,95

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

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

Périno-Issartier i sur. (2010) koristeći mikrovalnu ekstrakciju bez korištenja otapala i konvencionalnu ekstrakciju metanolom dobili su prosječnu vrijednost ukupnih fenola u ekstraktu ploda pasjeg trna 1147±11,9 mg GAE 100 g⁻¹ s.t., odnosno 741,9±7,6 mg GAE 100 g⁻¹ s.t. Objema metodama dobiven je viši maseni udio ukupnih fenola u odnosu na rezultate ovog rada, čemu razlog može biti različito geografsko porijeklo uzorka (pasji trn u njihovom istraživanju uzgojen je u Francuskoj) ili pak izbor ekstrakcijskog otapala. Međutim, Wani i sur. (2016) u ekstraktu ploda pasjeg trna odredili su ukupne fenole izolirane maceracijom u vrijednosti od 28,35 mg GAE 100 g⁻¹ s.t, primjenom Soxhleeta u rasponu od 43,77 do 77,85 mg GAE 100 g⁻¹ s.t, a ekstrakcijom vodom u subkritičnom stanju u rasponu od 60,22 do 86,70 mg GAE 100 g⁻¹ s.t. Usporedbom tih rezultata s rezultatima ovog rada može se pretpostaviti kako je ASE učinkovitija metoda ekstrakcije. U svom istraživanju Dragović-Uzelac i sur. (2016) došli su do zaključka da je najviša koncentracija ukupnih fenola u sorti grožđa Merlot postignuta

upravo primjenom ASE kao ekstrakcijske tehnike u odnosu na druge primijenjene inovativne tehnike. Michel i sur. (2012) također su upotrijebili ASE na plodu pasjeg trna pri temperaturi od 60 °C, 5 min statičkog vremena, pod tlakom od 100 bara i brojem ciklusa 5. Dobiveni prosječni udio ukupnih fenola u ekstraktu plodu pasjeg trna koristeći etanol kao ekstrakcijsko otapalo iznosio je 120 ± 14 mg GAE 100 g^{-1} s.t., što je niže u odnosu na vrijednosti dobivene u ovom istraživanju. Ipak treba naglasiti da je u ihovom istraživanju ASE provedena pri nižoj temperaturi.

U uzorcima ploda pasjeg trna ovog rada 1-9 primijenjena je temperatura ekstrakcije 80 °C te je prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih fenola iznosila $439,00 \pm 3,07$ mg GAE 100 g^{-1} s.t. Nadalje, u uzorcima 10-18 primijenjena je temperatura ekstrakcije od 100 °C te je prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih fenola $440,94 \pm 3,07$ mg GAE 100 g^{-1} s.t., a uz primijenjenu temperaturu ekstrakcije od 120 °C prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih fenola bila je $511,37 \pm 3,07$ mg GAE 100 g^{-1} s.t. Prema rezultatima statističke analize, temperatura kao parametar ekstrakcije ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) na maseni udio ukupnih fenola u plodu pasjeg trna. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako ne postoji statistički značajna razlika u udjelu ukupnih fenola dobivenih pri 80 i 100 °C, dok je prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola dobivena pri 120 °C signifikantno viša u odnosu na vrijednosti dobivenih pri nižim temperaturama (tablica 2) te je prinos ukupnih fenola viši za 14 % u odnosu na prinose dobivene pri nižim temperaturama, budući da se kinetika prijenosa mase pri višim temperaturama značajno poboljšava (Lou i sur., 1997). To se može potkrijepiti i rezultatima rada Repajić i sur. (2020a) u kojem je maseni udio ukupnih fenola u ekstraktu sjemenki komorača nakon provedene ASE bio gotovo 45 % veći u ekstrakciji pri 110 °C u usporedbi s ekstrakcijom provedenom pri 80 °C.

Isto tako vidljivo je kako se maseni udjeli ukupnih fenola statistički značajno razlikuju ($p < 0,01$) i ovise o primijenjenom statičkom vremenu ekstrakcije (5, 10 i 15 min). U uzorcima 1-3 (80 °C), 10-12 (100 °C) i 19-21 (120 °C) primijenjeno je statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 5 min, gdje je prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih fenola bila $390,12 \pm 3,07$ mg GAE 100 g^{-1} s.t. U uzorcima 4-6 (80 °C), 13-15 (110 °C) i 22-24 (120 °C) je primijenjeno statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 10 min s prosječnom vrijednošću masenog udjela ukupnih fenola od $487,51 \pm 3,07$ mg GAE 100 g^{-1} s.t. Zatim u uzorcima 7-9 (80 °C), 16-18 (100 °C) i 25-27 (120 °C) primijenjeno je statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 15 min s prosječnom vrijednošću masenog udjela ukupnih fenola od $513,68 \pm 3,07$ mg GAE 100 g^{-1} s.t. (tablica 2). Može se zaključiti kako su najviši prinosi ukupnih fenola postignuti pri statičkom

vremenu od 15 min, jer povećanje statičkog vrijeme ekstrakcije na povišenim temperaturama također potiče difuzija analita u ekstrakcijsko otapalo (Mottaleb i Sarker, 2012).

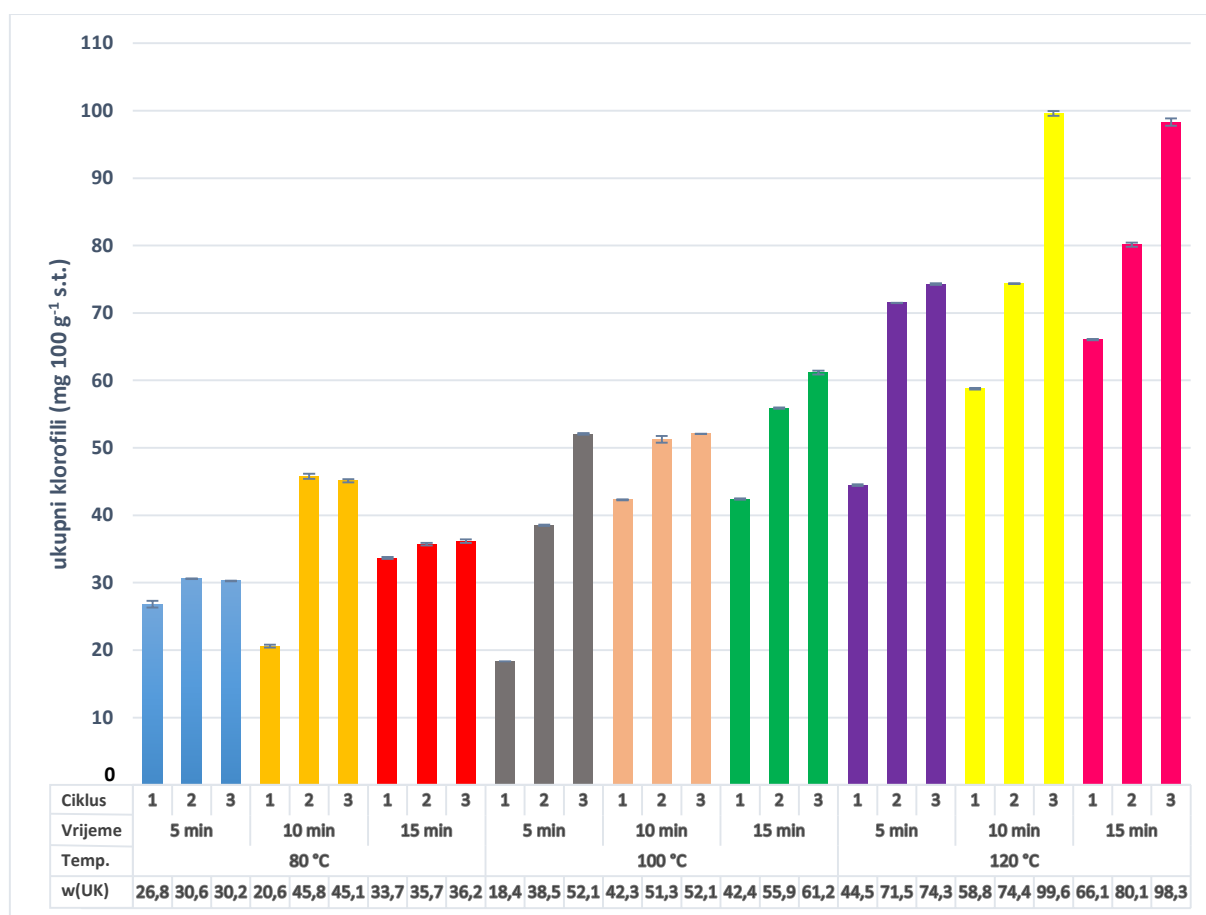
Statističkom analizom dokazano je kako broj ciklusa također statistički značajno utječe ($p < 0,01$) na maseni udio ukupnih fenola te je najviši maseni udio ukupnih fenola u ovom istraživanju zabilježen upravo pri najvećem broju ciklusa. Prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih fenola pri 3 ekstrakcijska ciklusa iznosi $518,25 \pm 3,07$ mg GAE 100 g^{-1} s.t., dok su prosječne vrijednosti masenog udjela ukupnih fenola dobivene pri manjem broju ciklusa niže (1 ciklus $387,57 \pm 3,07$ mg GAE 100 g^{-1} s.t., 2 ciklusa $485,49 \pm 3,07$ mg GAE 100 g^{-1} s.t.) što je niže za 25 odnosno 6 % u odnosu na 3 ciklusa (tablica 2). Isti trend primjetili su Repajić i sur. (2020b) pri primjeni ASE na listu koprive gdje je najveći prinos ukupnih fenola postignut pri najvećem broju ciklusa (4 ciklusa). Svrha povećanja broja ciklusa ekstrakcije je uvođenje svježeg otapala tijekom ekstrakcije s ciljem održavanja povoljne ekstrakcijske ravnoteže (Mottaleb i Sarker, 2012).

U radu Barros i sur. (2013) ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku korištena je za ekstrakciju fenolnih spojeva iz zrna sirka pri temperaturama 60, 120 i 150 °C. Pri temperaturi od 120 i 150 °C koristeći 50 i 70 %-tno otapalo etanol/voda (v/v) došlo je do gotovo jednake ekstrakcije fenolnih spojeva i do 12 % više antioksidanasa u uspoređi s tradicionalnim metodama gdje se kao otapalo koristi aceton i metanol (Barros i sur., 2013). Rajha i sur. (2014) također su određivali fenolne spojeve primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku i to u komini grožđa te su dobili najviši prinos fenola koristeći najvišu temperaturu istraživanja (140 °C) i 70 %-tnu vodenu otopinu etanola.

Iz svega navedenog može se zaključiti da sva tri ekstrakcijska parametra značajno utječu na masene udjele ukupnih fenola u ekstraktima liofiliziranih plodova pasjeg trna, pri čemu se bolje iskorištenje procesa ostvaruje pri višoj temperaturi, dužem statičkom vremenu te većem broju ciklusa ekstrakcije odnosno pri 120 °C, 15 min i 3 ciklusa.

4.2. UTJECAJ PARAMETARA ASE NA UDIO KLOROFILA U PLODU PASJEG TRNA

Maseni udio ukupnih klorofila (klorofil *a* + klorofil *b*) u plodu pasjeg trna nakon provedene ASE određen je u rasponu vrijednosti od 18,35 mg 100 g⁻¹ s.t. do 99,59 mg 100 g⁻¹ s.t. (slika 8) s prosječnom vrijednošću 51,34 mg 100 g⁻¹ s.t. (tablica 2). Najniži maseni udio ukupnih klorofila u plodu pasjeg trna određen je u uzorku 10 pri temperaturi 100 °C, statičkom vremenu 5 min uz 1 ciklus ekstrakcije, dok je najviši maseni udio ukupnih klorofila određen u uzorku 24 pri temperaturi 120 °C, statičkom vremenu 10 min uz 3 ciklusa ekstrakcije.



Slika 8. Maseni udio ukupnih klorofila izoliranih iz ploda pasjeg trna primjenom ASE

Rezultati statističke analize (tablica 2) su pokazali da temperatura kao parametar ekstrakcije ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) na maseni udio ukupnih klorofila u plodu pasjeg trna. U uzorcima 1-9 primijenjena je temperatura ekstrakcije 80 °C te je prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih klorofila iznosila $33,85 \pm 0,06$ mg 100 g⁻¹ s.t., nadalje u uzorcima 10-

18 primijenjena je temperatura ekstrakcije od 100 °C te je prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih klorofila $46,01 \pm 0,06$ mg 100 g⁻¹ s.t., a uz primijenjenu temperaturu ekstrakcije od 120 °C prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih klorofila bila je $74,16 \pm 0,06$ mg 100 g⁻¹ s.t.

Visoka temperatura može dovesti do izomerizacije i razgradnje termolabilnih spojeva kao što su pigmenti pa je zbog toga je važno precizno definirati najvišu temperaturu ekstrakcije koja omogućava brzu ekstrakciju s visokim prinosima, ali bez narušavanja termolabilnih pigmenata (Pasquet i sur. 2011). U istraživanju Cha i sur. (2010) na mikroalgi *Chlorella vulgaris* došlo je do značajnijeg povećanja učinkovitosti procesa ekstrakcije klorofila pri višim temperaturama, u odnosu na kemijske reakcije degradacije. Maksimalni prinosi ekstrakcije klorofila *a* i klorofila *b* ostvareni su pri najvišim temperaturama od 150 do 160 °C. Cha i sur. (2010) navode da se akumuliranje velike količine klorofila odvija u kloroplastima koji su okruženi debelom staničnom stjenkom što može otežati njihovu ekstrakciju. Velika energija pri visokim temperaturama ASE smanjuje tu zaštitnu barijeru te povećava učinkovitost procesa. Također u radu Cha i sur. (2010) 90 %-tni etanol pokazao se kao najučinkovitije otapalo za ekstrakciju klorofila od četiri testiranih.

Nadalje, vidljivo je kako se maseni udjeli ukupnih klorofila statistički značajno razlikuju ($p < 0,01$) ovisno i o primijenjenom statičkom vremenu ekstrakcije (5, 10 i 15 min). U uzorcima 1-3 (80 °C), 10-12 (100 °C) i 19-21 (120 °C) primijenjeno je statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 5 min, gdje je prosječna vrijednost masenog udjela ukupnih klorofila bila $42,98 \pm 0,06$ mg 100 g⁻¹ s.t. U uzorcima 4-6 (80 °C), 13-15 (110 °C) i 22-24 (120 °C) je primijenjeno statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 10 min s prosječnom vrijednošću masenog udjela ukupnih klorofila od $54,43 \pm 0,06$ mg 100 g⁻¹ s.t. Zatim u uzorcima 7-9 (80 °C), 16-18 (100 °C) i 25-27 (120 °C) primijenjeno je statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 15 min s prosječnom vrijednošću masenog udjela ukupnih klorofila od $56,61 \pm 0,06$ mg 100 g⁻¹ s.t.

Statističkom analizom dokazano je kako i broj ciklusa statistički značajno ($p < 0,01$) utječe na maseni udio ukupnih klorofila. Pri većem broju ciklusa maseni udio ukupnih klorofila bio je viši. Tako je prosječno pri 3 ciklusa izolirano $61,01 \pm 0,06$ mg 100 g⁻¹ s.t. ukupnih klorofila, što je više za čak 36 % u odnosu na 1 ciklus ($39,27 \pm 0,06$ mg 100 g⁻¹ s.t.) odnosno za 12 % u odnosu na 2 ciklusa ($53,75 \pm 0,06$ mg 100 g⁻¹ s.t.).

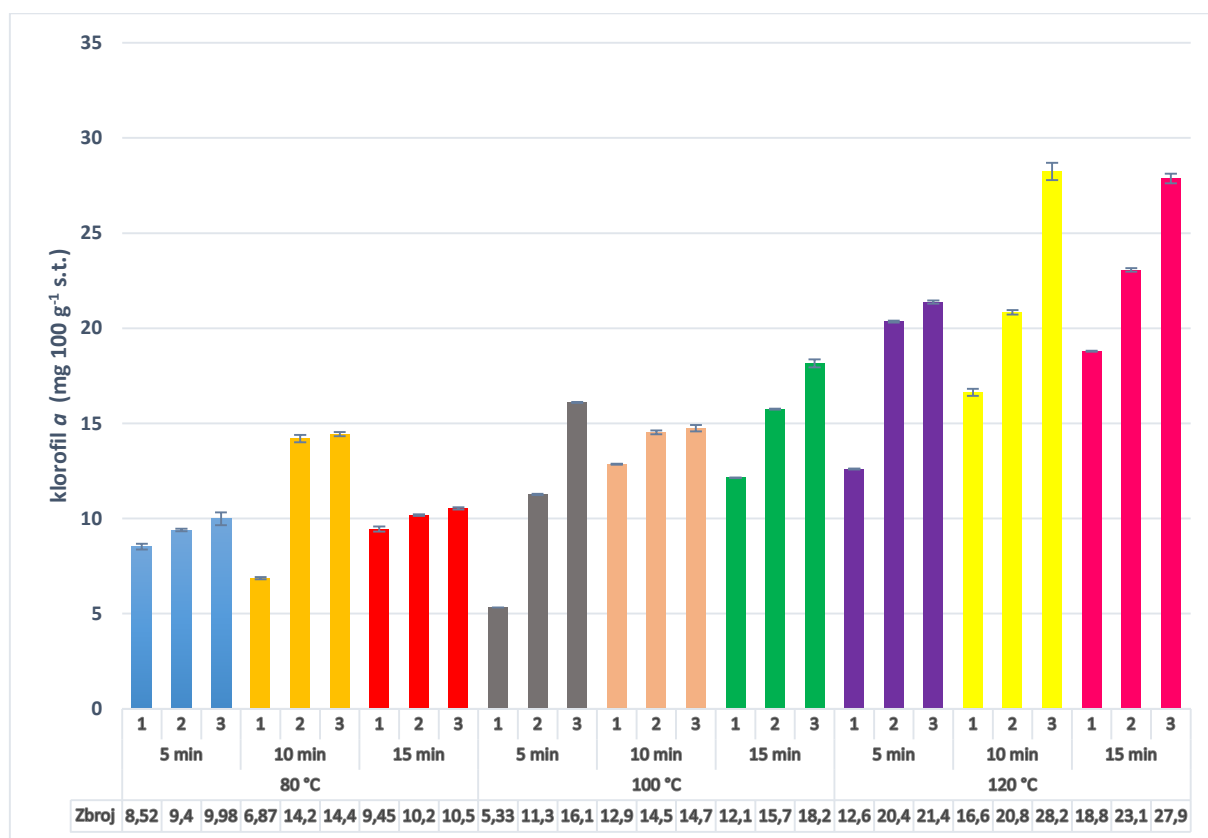
Prema tome vidljivo je da sva tri ekstrakcijska parametra značajno utječu na masene udjele ukupnih klorofila u ekstraktima liofiliziranih plodova pasjeg trna, pri čemu se bolje iskorištenje procesa ostvaruje pri višoj temperaturi, dužem statičkom vremenu te većem broju ciklusa

ekstrakcije odnosno pri 120 °C, 10 min i 3 ciklusa pri čemu je prinos za samo 1 % veći u odnosu na najviše uvjete istraživanja (120 °C, 15 min i 3 ciklusa).

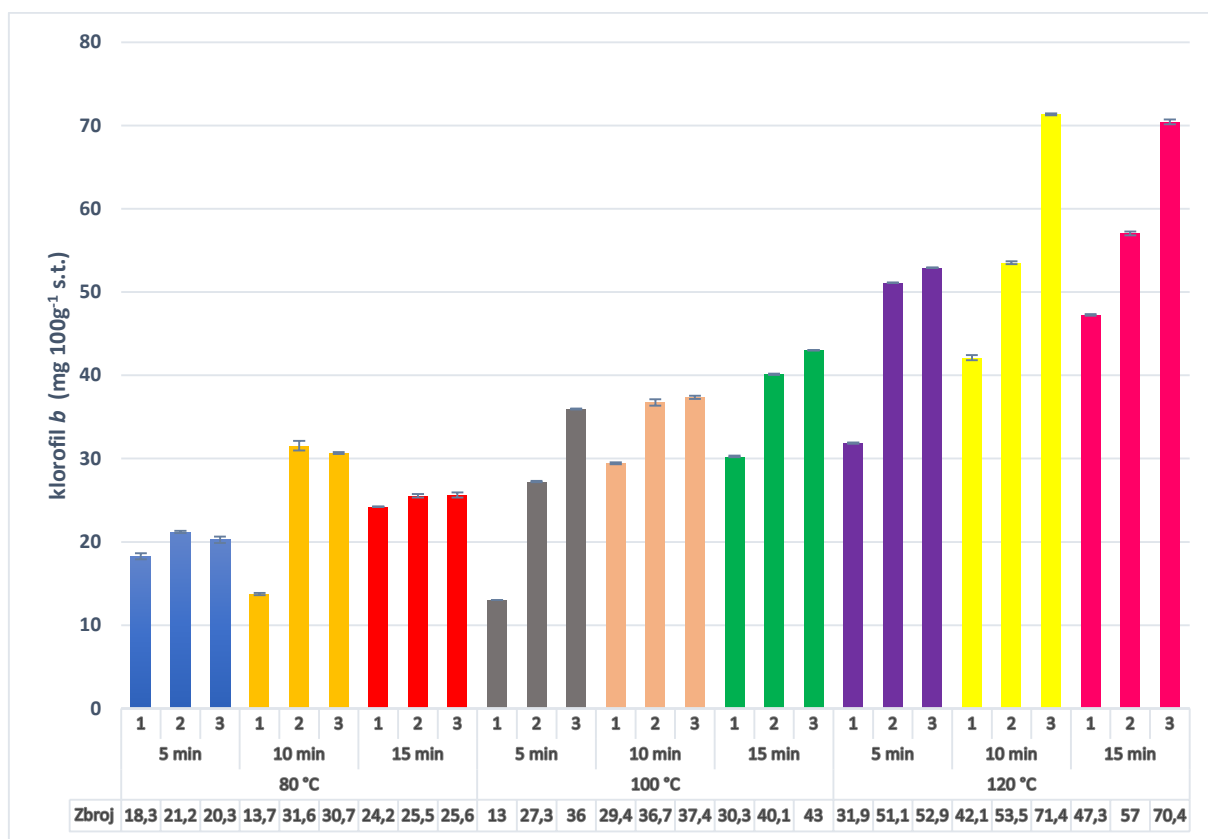
Iz grafičkog prikaza (slike 9 i 10) vidljivo je kako plod pasjeg trna korišten u ovom istraživanju sadrži viši maseni udio klorofila *b* (prosječna vrijednost 36,37 mg 100 g⁻¹ s.t.) u odnosu na maseni udio klorofila *a* (prosječna vrijednost 14,97 mg 100 g⁻¹ s.t.).

Maseni udio klorofila *a* u plodu pasjeg trna određen je u rasponu vrijednosti od 5,33 mg 100 g⁻¹s.t. do 28,24 mg 100 g⁻¹s.t., dok se maseni udio klorofila *b* kretao od 13,02 do 71,35 mg 100 g⁻¹s.t. Najniži maseni udio klorofila *a* i *b* određen je u uzorku 10 pri temperaturi 100 °C, statičkom vremenu 5 min uz 1 ciklus ekstrakcije. Najviši maseni udio klorofila *a* i *b* određen je u uzorku 24 pri temperaturi 120 °C, statičkom vremenu 10 min uz 3 ciklusa ekstrakcije.

Uglavnom se maseni udio klorofila *a* i *b* povećava s porastom temperature, statičkog vremena i broja ciklusa ekstrakcije, izuzetak su uzorci 4 i 10 gdje je došlo do smanjenja udjela klorofila *a* i klorofila *b*, što je moguće zbog kratkog vremena ekstrakcije koje nije bilo dovoljno za toplinsku razgradnju klorofila.



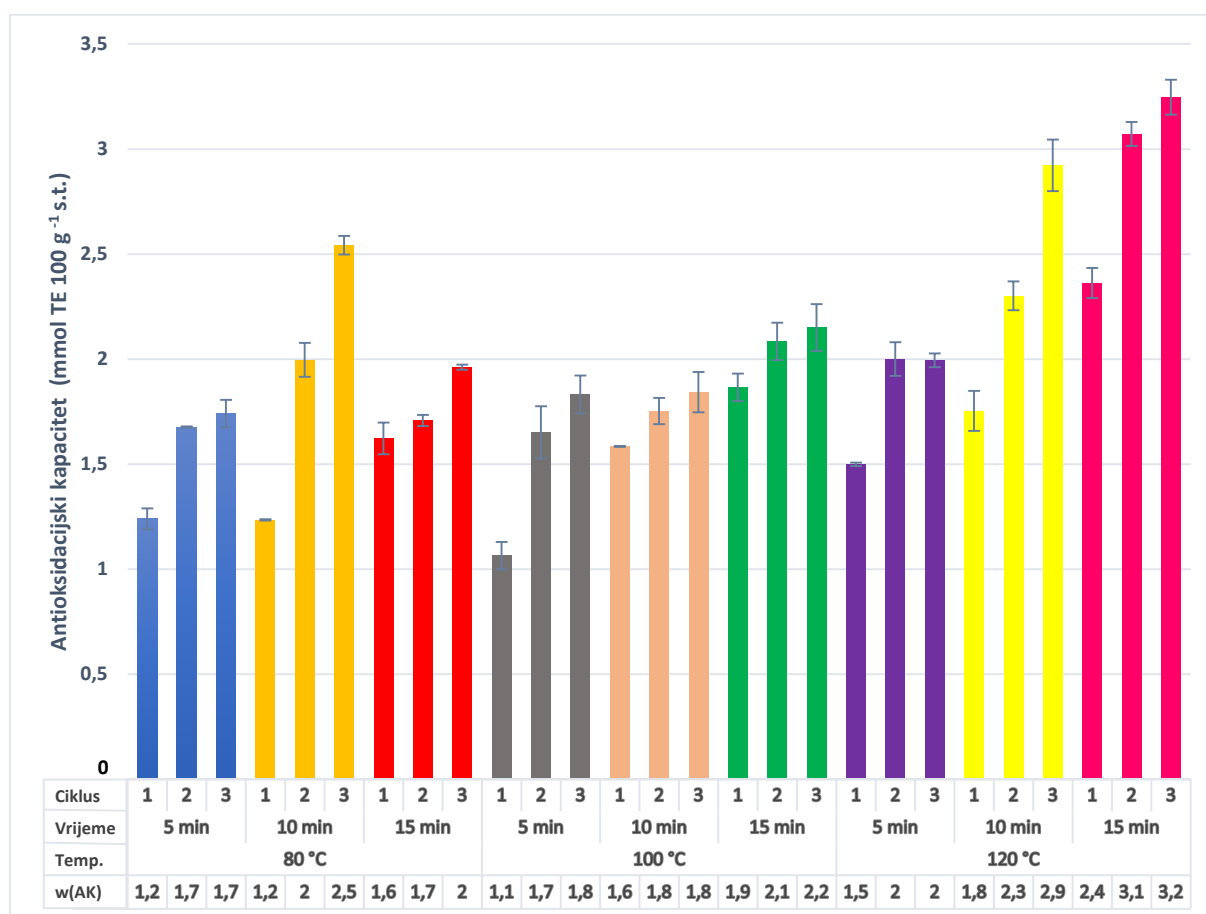
Slika 9. Maseni udio klorofila *a* izoliranog iz ploda pasjeg trna primjenom ASE



Slika 10. Maseni udio klorofila *b* izoliranog iz ploda pasjeg trna primjenom ASE

4.3. UTJECAJ PARAMETARA ASE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET EKSTRAKATA PLODA PASJEG TRNA

Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima ploda pasjeg trna nakon provedene ASE određen je u rasponu vrijednosti 1,07 do 3,24 mmol TE 100 g⁻¹ s.t. (slika 11) s prosječnom vrijednošću 1,95 mmol TE 100 g⁻¹ s.t (tablica 2). Najniža vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određena je u uzorku 10 koji je dobiven pri temperaturi 100 °C, statičkom vremenu 5 min uz 1 ciklus ekstrakcije, a najviša u uzorku 27 koji je dobiven pri temperaturi 120 °C, statičkom vremenu 15 min uz 3 ciklusa ekstrakcije.



Slika 11. Antioksidacijski kapacitet ekstrakata ploda pasjeg trna dobivenih primjenom ASE

Rezultati statističke analize pokazali su da temperatura ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) na antioksidacijski kapacitet ekstrakata ploda pasjeg trna dobivenih primjenom ASE. Ekstrakti dobiveni pri temperaturama 80 i 100 °C međusobno se nisu statistički razlikovali

obzirom na prosječnu vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ($1,75 \pm 0,02$ i $1,76 \pm 0,02$ mmol TE 100 g^{-1} s.t.), dok je u odnosu na njih u ekstraktu dobivenom pri 120°C određena signifikantno viša prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ($2,35 \pm 0,02$ mmol TE 100 g^{-1} s.t.) (tablica 2).

Nadalje, statistička analiza pokazala je da statističko vrijeme kao parametar ekstrakcije ima statistički značajan ($p < 0,01$) utjecaj na antioksidacijski kapacitet ekstrakata ploda pasjeg trna. U uzorcima 1-3 (80°C), 10-12 (100°C) i 19-21 (120°C) primijenjeno je statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 5 min, gdje je prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta bila $1,63 \pm 0,02$ mmol TE 100 g^{-1} s.t. U uzorcima 4-6 (80°C), 13-15 (110°C) i 22-24 (120°C) je primijenjeno statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 10 min s prosječnom vrijednošću antioksidacijskog kapaciteta od $1,99 \pm 0,02$ mmol TE 100 g^{-1} s.t. Zatim, u uzorcima 7-9 (80°C), 16-18 (100°C) i 25-27 (120°C) primijenjeno je statičko vrijeme ekstrakcije u trajanju od 15 min s prosječnom vrijednošću antioksidacijskog kapaciteta od $2,23 \pm 0,02$ mmol TE 100 g^{-1} s.t. (tablica 2).

Također, dokazano je kako i broj ciklusa statistički značajno utječe ($p < 0,01$) na antioksidacijski kapacitet (tablica 2). Kod primjene 1 ciklusa ekstrakcije prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta iznosila je $1,58 \pm 0,02$ mmol TE 100 g^{-1} s.t., kod primjene 2 ciklusa bio je $2,03 \pm 0,02$ mmol TE 100 g^{-1} s.t., a kod 3 ciklusa $2,25 \pm 0,02$ mmol TE 100 g^{-1} s.t.

Sukladno svemu navedenom, vidljivo je da se antioksidacijski kapacitet ekstrakata ploda pasjeg trna povećava s porastom temperature, statičkog vremena i broja ciklusa ekstrakcije, gdje se najviša vrijednost postiže pri 120°C , 15 min uz 3 ciklusa ekstrakcije. Izuzetak je uzorak 10 u kojem je došlo do smanjenja antioksidacijskog kapaciteta. U radu Jaime i sur. (2005) na mikroalgi *Spirulina platensis* također se došlo do zaključka da pri višoj temperaturi ASE i dužim vremenom ekstrakcije dobiva se ekstrakt višeg antioksidacijskog kapaciteta. Korekar i sur. (2011) pronašli su značajnu korelaciju između antioksidativnog djelovanja i sadržaja fenola, što ukazuje da bi fenolni spojevi mogli biti glavni doprinosi antioksidacijskoj aktivnosti. Ujedno su i Thaipong i sur. (2006) u svom radu koristeći FRAP metodu odredili najveću korelaciju između askorbinske kiseline i ukupnih fenola u plodu guave u odnosu na druge tehnike te su stoga zaključili da je FRAP odgovarajuća tehnika za ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta, a između ostalog pokazala je visoku ponovljivost, bila je jednostavna i brzo izvedena.

U radu Dienaite i sur. (2020) dokazalo se da je plod pasjeg trna dobar izvor bioaktivnih spojeva s antioksidacijskim kapacitetom. Primjenom ekstrakcije superkritičnim CO₂ došlo se do rezultata kako vodeni ekstrakt pasjeg trna ima viši antioksidacijski kapacitet u odnosu na primjenu etanola kao ekstrakcijskog otapala. To se može objasniti višom koncentracijom nekih polarnih hidrofilnih antioksidansa koji su odgovorni za antioksidativna svojstva različitog voća i povrća (Dienaite i sur. 2020). Nadalje, u istraživanju Herrero i sur. (2005) na mikroalgi *Spirulina platensis* primjenom ASE kao metode ekstrakcije došlo se do zaključka da ekstrakti etanola imaju samo nešto malo niži antioksidacijski kapacitet u odnosu na upotrebu heksana i naftnog etera kao ekstrakcijskog otapala, što je dodatna prednost za etanol budući da on ima GRAS status i može se koristiti kao sigurno otapalo za prehrambenu industriju.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Prema dobivenim rezultatima maseni udio ukupnih fenola u liofiliziranom plodu pasjeg trna određen je u rasponu vrijednosti od 220,27 do 688,27 mg GAE 100 g⁻¹ s.t., ukupnih klorofila od 18,35 do 99,59 mg 100 g⁻¹ s.t, klorofila *a* od 5,33 do 28,24 mg 100 g⁻¹ s.t, klorofila *b* od 13,02 do 71,35 mg 100 g⁻¹ s.t, dok se antioksidacijski kapacitet kretao od 1,07 do 3,24 mmol TE 100 g⁻¹ s.t..
2. Rezultati pokazuju kako plod pasjeg trna korišten u ovom istraživanju sadrži viši maseni udio klorofila *b* (prosječna vrijednost 36,37 mg 100 g⁻¹ s.t.) u odnosu na maseni udio klorofila *a* (prosječna vrijednost 14,97 mg 100 g⁻¹ s.t.).
3. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE) uz 70 %-tni etanol kao otapalo pokazala se kao učinkovita metoda za uspješnu ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz liofiliziranog ploda pasjeg trna. Učinkovitost ekstrakcijskog procesa i prinosi tih spojeva značajno ovise o temperaturi statičkom, vremenu ekstrakcije i broju ciklusa ekstrakcije, a ta tri ispitana parametra ekstrakcije imali su statistički značajan utjecaj ($p < 0,01$) na udio ukupnih fenola, ukupnih klorofila i antioksidacijski kapacitet u ekstraktima ploda pasjeg trna dobivenim primjenom ASE.
4. Sukladno rezultatima statističke analize, parametri pri kojima je ASE pokazala najvišu učinkovitost u izolaciji svih analiziranih bioaktivnih spojeva te je dobivena najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta su 120 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 15 min i 3 ciklusa ekstrakcije.

6. LITERATURA

Andersson, S. C. (2009) Carotenoids, Tocochromanols and Chlorophylls in Sea Buckthorn Berries (*Hippophae rhamnoides*) and Rose Hips (*Rosa* sp.). Doctoral Thesis, str.20.

Anonymous 1 (2020) <<https://smileherbschool.com/sea-buckthorn-the-tree-that-makes-the-horse-shine>> Pristupljeno 28. prosinca 2020

Alvarez-Rivera, G., Bueno, M., Ballesteros-Vivas, D., Mendiola, J. A., Ibanez, E. (2020) Pressurized Liquid Extraction. U: Liquid-Phase Extraction, (Poole, C. F., ured.), Elsevier Inc.,

Amsterdam/Oxford/Cambridge, str. 375-394. doi:10.1016/B978-0-12-816911-7.00013-X

Arif S., Ahmed S.D., Shah A.H., Hamid A., Batool F.(2010) Determination of optimum harvesting time for Vitamin C, oil and mineral elements in berries sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). *Pak J Bot.* **42(5)**, 3561–3568.

Barros, F., Dykes, L., Awika, J.M., Rooney, L.W. (2013) Accelerated extraction of phenolic compounds from sorghum brans. *J. Cereal Sci.* **58(2)**, 305-312.

Bursać Kovačević, D., Maras, M., Barba, F. J., Granato, D., Roohinejad, S., Mallikarjunan, K., Montesano, D., Lorenzo, J. M., Putnik, P. (2018) Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: A review. *Food Chem.* **268**, 513-521. doi:10.1016/j.foodchem.2018.06.091

Cakir, A. (2004). Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides* L. (Sea Buckthorn) and *Myrtus communis* L. from Turkey. *Biochem. Syst. Ecol.* **32(9)**, 809–816. doi:10.1016/j.bse.2003.11.010

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. Agr. Food Chem.* **58**, 793-797.

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

Dienaitė, L., Pukalskas, A., Pukalskiene, M., Pereira, C., Matias, A., Venskutonis, P.R.(2020) Phytochemical Composition, Antioxidant and Antiproliferative Activities of

Defatted Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) Berry Pomace Fractions Consecutively Recovered by Pressurized Ethanol and Water. *Antioxid.* 2020, **9(4)**, 274

Dragović-Uzelac, V. (2016) Primjena inovativnih tehnologija u izolaciji bioaktivnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina [online] <http://bioactive-winewaste.com/wp-content/uploads/2016/02/Primjena_inovativnih_tehnologija-CD-brosura.pdf>. Pristupljeno 2. srpnja 2021

Fatima, T., Kesari, V., Watt, I., Wishart, D., Todd, J. F., Schroeder, W. R., Krishna, P. (2015). Metabolite profiling and expression analysis of flavonoid, vitamin C and tocopherol biosynthesis genes in the antioxidant-rich sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Phytochem.* 118, 181–191. doi:10.1016/j.phytochem.2015.08.008

Fatima, T., Snyder, C. L., Schroeder, W. R., Cram, D., Datla, R., Wishart, D., ... Krishna, P. (2012). Fatty Acid Composition of Developing Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berry and the Transcriptome of the Mature Seed. *PLoS ONE* **7(4)**, doi:10.1371/journal.pone.0034099

Franjić, J., Horvat, G., & Krstonošić, D. (2016). Novo nalazište i sintaksonomske značajke pasjega trna (*Hippophaë rhamnoides* L., Elaeagnaceae) u Hrvatskoj. *Šumarski List* **140(3-4)**, 111–115. doi:10.31298/sl.140.3-4.1

Gan, J., Papiernik, S.K., Koskinen W.C., Yates S.R. (1999) Evaluation of Accelerated Solvent Extraction (ASE) for Analysis of Pesticide Residues in Soil. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 3249-3253.

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.

Guo, R., Guo, X., Li, T., Fu, X., & Liu, R. H. (2017) Comparative assessment of phytochemical profiles, antioxidant and antiproliferative activities of Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries. *Food Chem.* **221**, 997–1003. doi:10.1016/j.foodchem.2016.11.063

Herrero, M., Martín-Álvarez, P. J., Señoráns, F. J., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2005) Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chem.* **93(3)**, 417–423. doi:10.1016/j.foodchem.2004.09.037

- Holdt, S.L., Kraan, S. (2011) Bioactive compounds in seaweed: Functional food application and legislation. *J. Appl Phycol.* **23**, 543-597
- Horvat, G. (2017) Pasji trn (*Hippophaë rhamnoides* L., *Elaeagnaceae*) u Podravini, *Podravski zbornik*, str. 207-209.
- Jaime, L., Mendiola, J. A., Herrero, M., Soler-Rivas, C., Santoyo, S., Señorans, F. J., ... Ibáñez, E. (2005). Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *J. Sep. Sci.* **28(16)**, 2111–2119. doi:10.1002/jssc.200500185
- Khan, B. A., Akhtar, N., & Mahmood, T. (2010) *A Comprehensive Review of a Magic Plant, Hippophae rhamnoides*. *Phcog. J.* **2(16)**, 65–68. doi:10.1016/s0975-3575(10)80053-7
- Korekar, G., Stobdan, T., Singh, H., Chaurasia, O., & Singh, S. (2011). Phenolic content and antioxidant capacity of various solvent extracts from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit pulp, seeds, leaves and stem bark. *Acta Aliment.* **40(4)**, 449–458. doi:10.1556/aalim.40.2011.4.4
- Li, P., Li, S. P., Lao, S. C., Fu, C. M., Kan, K. K. W., Wang, Y. T. (2006) Optimization of pressurized liquid extraction for Z-ligustilide, Z-butylidenephthalide and ferulic acid in *Angelica sinensis*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**, 1073-1079. doi:10.1016/j.jpba.2005.08.035
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **1**, F4.3.1–F4.3.8. doi:10.1002/0471142913.faf0403s01
- Lovrić, T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Hinus, str. 262-264.
- Lou, X., Janssen, H.-G., & Cramers, C. A. (1997) Parameters Affecting the Accelerated Solvent Extraction of Polymeric Samples. *Anal. Chem.* **69(8)**, 1598–1603. doi
- Michel, T., Destandau, E., Le Floch, G., Lucchesi, M. E., & Elfakir, C. (2012). Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chem.* **131(3)**, 754–760. doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.029
- Montero, L., Sedghi, M., García, Y., Almeida, C., Safi, C., Engelen-Smit, N., ... Ibáñez, E. (2018) Pressurized Liquid Extraction of Pigments from *Chlamydomonas* sp. and Chemical

Characterization by HPLC–MS/MS. *J. Analys. Test.* doi:10.1007/s41664-018-0062-8:10.1021/ac960766a

Mottaleb M.A., Sarker S.D. (2012) Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation. In: Sarker, S.D., Nahar, L. (Eds.), *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology*, 3rd ed., Springer, New York, NY, USA, pp. 75-88. DOI: 10.1007/978-1-61779-624-1_4

Oktay, M., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003) Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT - Food Sci. Technol.* **36**, 263-271. doi:10.1016/s0023-6438(02)00226-8

Pasquet, V., Chérourviera, J. R., Farhata, F., Thiérya, V., Piota, J. M., Bérardb, J. B., Kaasb, R., Seriveb, B., Patricec, T., Cadoretb, J. P., Picota, L. (2011) Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochem.* **46**, 59-67.

Pavlović, N., Valek Lendić, K., Miškulin, M., Moslavac, T., Jokić S. (2016) Supercritical CO₂ extraction of sea buckthorn, *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* **5 (2)**, 55-61.

Périno-Issartier, S., Zill-e-Huma, Abert-Vian, M., & Chemat, F. (2010) Solvent Free Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Food By-Products. *Food Bioprocess Technol.* **4(6)**, 1020–1028. doi:10.1007/s11947-010-0438-x

Qin, X., Zhang, T., Cao, Y., Deng, B., Zhang, J., & Zhao, J. (2020) Effects of dietary sea buckthorn pomace supplementation on skeletal muscle mass and meat quality in lambs. *Meat Sci.* **166**, 108141. doi:10.1016/j.meatsci.2020.108141

Rajha, H.N., Ziegler, W., Louka, N., Hobaike, Z., Vorobiev, E., Boechzelt, H.G., Maroun, R.G. (2014) Effect of the Drying Process on the Intensification of Phenolic Compounds Recovery from Grape Pomace Using Accelerated Solvent Extraction. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 18640-18658.

Reo, R., Li, N., Su, C., Wang, Y., Zhao, W., Yang L., Li, Y., Zhang, B., Chen, J., Ma, X. (2020) The bioactive components as well as the nutritional and health effects of sea buckthorn. *RSC Adv.* **10**, 44654-44671.

- Repajić, M., Ekić, S., Kruk, V., Dragović-Uzelac, V. (2020a) Effect of accelerated solvent extraction conditions on the isolation of bioactive compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **15 (3-4)**, 102-105.
- Repajić, M., Cegledi, E., Kruk, V., Pedisić, S., Çınar, F., Bursać Kovačević, D., Dragović-Uzelac, V. (2020b) Accelerated Solvent Extraction as a Green Tool for the Recovery of Polyphenols and Pigments from Wild Nettle Leaves. *Processes* **8(7)**, 803 doi:10.3390/pr8070803
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., & Pohl, C. (1996). Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Anal. Chem.* **68(6)**, 1033–1039. doi:10.1021/ac9508199
- Sabir, S. M., Maqsood, H., Hayat, I., Khan, M. Q., & Khaliq, A. (2005) Elemental and Nutritional Analysis of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *turkestanica*) Berries of Pakistani Origin. *J. Med. Food* **8(4)**, 518–522. doi:10.1089/jmf.2005.8.518
- Saito, K., Suzuki, T., Ishikita, H. (2018) Absorption-energy calculations of chlorophyll a and b with an explicit solvent model. *J. Photochem. Photobiol.* **358**, 422-431
- Shams, K., Abdel-Azim, N., Saleh, I. A., Hegazy, M. E. F. (2015) Green technology: Economically and environmentally innovative methods for extraction of medicinal & aromatic plants (MAP) in Egypt. *J. Chem. Pharm. Res.* **7**, 1054-1057.
- Shortle, E., O’Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834. doi:10.1016/j.meatsci.2014.07.001
- Škevin D. (2018) Kemija i tehnologija ulja i masti, Nastavni materijal, str. 69.
- Teleszko, M., Wojdyło, A., Rudzińska, M., Oszmiański, J., & Golis, T. (2015) Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Bioactive Compounds Content in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) Berries. *J. Agr. Food Chem.* **63**, 4120–4129.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant

activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* **19(6-7)**, 669–675. doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003

Thomas S.C.L., Schroeder W.R., (1996) Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A Multipurpose Plant. *HortTechnol.* **6(4)**, 370-380.

Tiitinen, K. M., Yang, B., Haraldsson, G. G., Jonsdottir, S., Kallio, H. P. (2006) Fast Analysis of Sugars, Fruit Acids, and Vitamin C in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) Varieties. *J. Agr. Food Chem.* **54(7)**, 2508–2513.

Tiitinen, K. M., Hakala, M. A., & Kallio, H. P. (2005). Quality Components of Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) Varieties. *J. Agr. Food Chem.* **53(5)**, 1692–1699. doi:10.1021/jf0484125

Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 300-312.

Wani, T. A., Wani, S. M., Ahmad, M., Ahmad, M., Gani, A., & Masoodi, F. A. (2016) Bioactive profile, health benefits and safety evaluation of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A review. *Cogent Food & Agriculture* **2(1)**. doi:10.1080/23311932.2015.1128519

Yang, B., & Kallio, H. P. (2001). Fatty Acid Composition of Lipids in Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*L.) Berries of Different Origins. *J. Agr. Food Chem.* **49(4)**, 1939–1947. doi:10.1021/jf001059s

Zakynthinos, G. i Varzakas, T. (2015) *Hippophae rhamnoides*: safety and nutrition, *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* **3 (2)**, doi : <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.3.2.01>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ines Staroveški