

Bioaktivni spojevi i antioksidacijski kapacitet ulja i pogače ploda pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L.)

Sušilović, Danijela

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:598789>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

**BIOAKTIVNI SPOJEVI I
ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET
ULJA I POGAČE PLODA PASJEG
TRNA (*Hippophae rhamnoides* L.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenja stabilnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnoškog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Sandre Pedisić te uz pomoć Patricije Čulina, mag. ing. techn. aliment.



Ovo istraživanje financirano je sredstvima projekta „Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“ – KK.01.1.1.04.0093, koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj- Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014. – 2020. Voditeljica projekta je prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac.

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Sandri Pedisić na stručnom vođenju, razumijevanju, savjetima, ogromnoj količini strpljenja i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Posebnu zahvalu upućujem i mag. ing. techn. aliment. Patriciji Čulina na uloženom trudu, vremenu, davanju smjernica te pomoći kod provođenja eksperimenata i pristupačnosti tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem i ostalim djelatnicima Laboratorija za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva.

Zahvaljujem se svojoj obitelji koja me je uvijek podržavala a posebno se zahvaljujem svojim roditeljima koji su uvijek bili tu uz mene od Australije do Afrike.

Najveća zahvala upućena je dragom Bogu koji me čuvao i bio uz mene u najljepšim, ali i najtežim trenucima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese sušenja i praćenja stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

BIOAKTIVNI SPOJEVI I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ULJA I POGAČE PLODA PASJEG TRNA (*Hippophae rhamnoides* L.)

Danijela Sušilović, univ. bacc. ing. techn. aliment.
011315063

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je odrediti sadržaj karotenoida i tokoferola u ulju ploda dvije sorte pasjeg trna (PT) te ispitati utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (EPUzv) na izolaciju fenolnih spojeva (FS) i vitamina C iz pogače PT primjenom različitih vodenih otopina etanola (30 i 70 %, v/v) i vremena ekstrakcije (20, 30, 40 min). Veći antioksidacijski kapacitet (AOK) i viši maseni udjeli α -tokoferola i karotenoida određeni su u ulju sorte *Leikora*, a najzastupljeniji karotenoida bili su lutein i zeaksantin te njihovi derivati. Najveće vrijednosti vitamina C i ukupnih FS određene su u 70 %-tnim etanolnim ekstraktima pogače sorte *Ascola* (66,02 mg/100 g) nakon 20 odnosno 40 min ekstrakcije te AOK u pogači sorte *Leikora* nakon 40 min ekstrakcije. Najzastupljeniji FS u pogači PT su hidroksicimetne kiseline (36,32 mg/100 g s. tv.) te je bolja učinkovitost EPUzv postignuta primjenom 70 %-tne vodene otopine etanola i dužeg vremena ekstrakcije.

Ključne riječi: *fenolni spojevi, karotenoidi, ORAC antioksidacijski kapacitet, pogača, ulje pasjeg trna*

Rad sadrži: 56 stranice, 16 slika, 14 tablica, 89 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. Sandra Pedisić

Pomoć pri izradi: Patricija Čulina, mag. ing. techn. aliment.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Maja Repajić (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Sandra Pedisić (mentor)
3. prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (zamjenski član)

Datum obrane: 03.svibnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Engineering

Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Graduate university study programme: Nutrition

BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF OIL AND POMACE OF SEA BUCKTHORN FRUIT (*Hippophae rhamnoides* L.)

Danijela Sušilović univ. bacc. ing. techn. aliment

011315063

Abstract: The aim of the study was to determine the carotenoid and tocopherol content in two fruit oil varieties of sea buckthorn (SBO) and to evaluate the effect of ultrasound-assisted extraction (UAE) on the isolation of phenolic compounds (PC) and vitamin C from pomace (SBP) using different ethanol solutions (30 and 70%, v/v) and extraction times (20, 30, 40 min). Higher mass fractions of α -tocopherol and carotenoids and higher antioxidant capacity (AOC) were found in *Leikora* SBO. The most abundant carotenoids were lutein and zeaxanthin and their derivatives. The highest vitamin C and total PC content was determined in 70% ethanol extracts of *Ascola* SBP and extraction times of 40 and 20 min, while the highest AOC was determined in *Leikora* SBP after 40 min. Hydroxycinnamates (36.32 mg/100 g dm) were the most abundant PC and better UAE efficiency was obtained using 70% ethanol solution and longer extraction time.

Keywords: *phenolic compounds, carotenoids, ORAC antioxidant capacity, pomace, sea buckthorn oil*

Thesis contains: 56 pages, 16 figures, 14 tables, 89 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD, Sandra Pedisić, Assistant professor

Technical support and assistance: Patricija Čulina, PhD Research Assistant

Reviewers:

1. PhD. Maja Repajić, Assistant Professor (president)
2. PhD. Sandra Pedisić, Assistant Professor (mentor)
3. PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full Professor (member)
4. PhD. Sandra Balbino, Full Professor (substitute)

Thesis defended: 3th May 2022

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. PASJI TRN (<i>Hippophae rhamnoides</i> L.).....	2
2.1.1. Osnovne karakteristike i kemijski sastav biljke	2
2.2. KEMIJSKI SASTAV PASJEG TRNA	4
2.2.1. Karotenoidi	5
2.2.2. Tokoferoli	7
2.2.3. Fenolni spojevi	8
2.3. PROIZVODNJA ULJA PASJEG TRNA.....	12
2.3.1. Pogača kao nusproizvod proizvodnje ulja pasjeg trna	13
2.4. METODE EKSTRKACIJE	13
2.5. ODREĐIVANJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA KROMATOGRFSKIM METODAMA	15
2.5.1. Detekcija	16
2.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ORAC (engl. <i>Oxygen radical apsorbance capacity</i>) METODOM.....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Uzorak ploda pasjeg trna	18
3.1.2. Kemikalije za ekstrakciju pigmenata	18
3.1.3. Aparatura i pribor	20
3.2. METODE RADA.....	21
3.2.1. Soxhlet ekstrakcija ulja pasjeg trna	21
3.2.2. Određivanje ukupne suhe tvari u pogači pasjeg trna	21
3.2.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva i vitamina C iz pogače pasjeg trna	22
3.2.4. Određivanje karotenoidinih pigmenata u ulju pasjeg trna HPLC metodom uz PDA detektor.....	23
3.2.5. Određivanje tokoferola HPLC metodom uz FLD detektor	24
3.2.6. Određivanje fenolnih spojeva i vitamina C primjenom UPLC-MS/MS metode.....	25
3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom.....	29
3.2.7.1. <i>Određivanje antioksidacijskog kapaciteta hidrofilnih spojeva ORAC metodom</i>	29
3.2.7.2. <i>Određivanje antioksidacijskog kapaciteta lipofilnom ORAC metodom</i>	30
3.2.8. Obrada rezultata	31
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	32
4.1. SADRŽAJ TOKOFEROLA i KAROTENOIDA U ULJIMA DVIJE SORTE PASJEG TRNA EKSTRAHIRANIM SOXHLET EKSTRAKCIJOM.....	33
4.1.1. Rezultati određivanja sadržaja tokoferola u uljima HPLC metodom uz FLD detektor	33
4.1.2. Rezultati određivanja sadržaja karotenoida u uljima HPLC metodom uz PDA detektor	34
4.1.3. Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta lipofilnom ORAC metodom.....	35
4.2. IZOLACIJA FENOLNIH SPOJEVA I VITAMINA C POGAČE PLODOVA PASJEG TRNA PRIMJENOM EKSTRAKCIJE POTPOMOĞNUTE ULTRAZVUKOM.....	36
4.2.1. Rezultati određivanja fenolnih spojeva u ekstraktima pogače dvije sorte pasjeg trna određene UPLC MS/MS metodom.....	36

4.2.2. Rezultati određivanja askorbinske kiseline (vitamin C)	43
4.2.3. Rezultati određivanja antioksidativnog kapaciteta ORAC metodom	44
5. ZAKLJUČCI	46
6. POPIS LITERATURE	47

1. UVOD

Zbog ubrzanog gospodarskog razvoja te proizvodnje sve šire palete proizvoda, raste interes za ljekovite vrste biljaka i identificiranje novih bioaktivnih molekula koji su predmet mnogih istraživanja u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Pasji trn (*Hippophae rhamnoides*) je biljka koja se već stoljećima koristi u tradicionalnoj medicini zbog bogatog sadržaja bioaktivnih molekula te se više od tisućljeća u Aziji smatra ljekovitom biljkom (Yang i Kallio, 2002). Ime mu dolazi iz latinske izvedenice grčkog naziva biljke „*hippophaes*“ koja dolazi od *Hippos* - konj i *phaos* – sjajni zbog sjaja dlake konja koji su se hranili pasjim trnom (Franjić i sur., 2016). Pripada obitelji Elaeagnaceae, prirodno mu je stanište Azija i istočna Europa, a u Hrvatskoj je najviše rasprostranjen u Međimurju i Podravini (Franjić i sur., 2016; Fu i sur., 2014). Gotovo svi dijelovi biljke pokazuju ljekovita svojstva zbog prisutnosti fenolnih spojeva, tokoferola, karotenoida, vitamina, polinezasićenih masnih kiselina, aminokiselina, minerala, međutim, plod pasjeg trna smatra se najvrjednijim izvorom bioaktivnih molekula zbog širokog spektra bioloških aktivnosti poput antioksidativnog, protuupalnog, kardioprotektivnog, antimikrobnog, citoprotektivnog, imunomodulatornog, neuroprotektivnog, hepaprotektivnog, antihipertenzivnog, antitumorskog i antidijabetičkog djelovanja (Bal i sur., 2011; Kumar i sur., 2011; Ballabh i Chaurasia, 2007; Basu i sur., 2007).

Ekstrakcija je separacijski proces koji se koristi u proizvodnji ulja te u izolaciji bioaktivnih molekula iz bilja. Efikasnost ekstrakcije ovisi o primijenjenoj metodi ekstrakcije i procesnim parametrima kao što su: izbor otapala, vrijeme i temperatura ekstrakcije, veličina čestica, omjer volumena otapala i uzorka, itd. (Ignat i sur., 2011). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom se pokazala kao jednostavna, učinkovita i ekonomična metoda ekstrakcije jer omogućuje velike prinose uz značajno skraćeno trajanje postupka ekstrakcije u odnosu na konvencionalne metode, primjenu nižih temperatura i manju potrošnju otapala (Dzah i sur., 2020).

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti sadržaj karotenoida i tokoferola u ulju ploda dvije sorte pasjeg trna dobivenog Soxhlet ekstrakcijom te ispitati utjecaj vodenih otopina etanola (30 i 70 %, v/v) i vremena trajanja ekstrakcije (20, 30 i 45 min) primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na izolaciju fenolnih spojeva i vitamina C iz pogače pasjeg trna kao nusproizvoda proizvodnje ulja. Također, u pripremljenim ekstraktima ulja i pogače određen je lipofilni i hidrofilni antioksidacijski kapacitet.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PASJI TRN (*Hippophae rhamnoides* L.)

2.1.1. Osnovne karakteristike i kemijski sastav biljke

Pasji trn ili vučji trn (*Hippophae rhamnoides*) je listopadni grm iz roda *Hippophae*, obitelji *Elaeagnaceae* (Tablica 1) koji se povijesno koristio u ljekovite svrhe širom svijeta, posebno u srednjoj i jugoistočnoj Aziji (Suryakumar i Gupta, 2011). Grm je otporan na sušu i mraz (Fu i sur., 2014), a uobičajeno cvjetanje pasjeg trna je obično krajem travnja i početkom svibnja. Biljka ima dugačko kopljasto lišće koje je prekriveno srebrnastim dlačicama (Bartish i sur., 2002) te veliki broj malih, zelenih i smeđih cvjetova koji rastu zajedno u grozdovima (Korekar i sur., 2013). Nakon cvatnje, cvijetovi postaju ukusne i hranjive okrugle bobice, obično žute, narančaste ili crvene boje ovisno o sorti, koje sazrijevaju u rujnu (Li, 2002). Unutar ploda nalazi se mala glatka koštica koja ima dugačak utor i prekriva masno sjeme (Dog, 2009).

Tablica 1. Sistematika pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L.) (Khan i sur., 2010)

Taksonomska kategorija	Naziv
Carstvo	<i>Plantae</i>
Divizija	Tracheophyta
Razred	Magnoliopsida
Red	Rhamnales
Porodica	Elaeagnaceae
Rod	<i>Hippophae</i>
Vrsta	<i>Hippophae rhamnoides</i>

Otprilike 150 vrsta, podvrsta i sorti pasjeg trna identificirano je unutar Euroazije, a razlikovale su se po staništu grma, izgledu bobica i hranjivoj vrijednosti. Osim *Hippophae rhamnoides* L. u literaturi se često spominju još dvije podvrste *ssp. Carpatica* Rousi i *ssp. Fluviatilis* Soest (Franjić i sur., 2016). U Hrvatskoj se uzgaja na području Međimurja i Podravine, uz rijeke Muru i Dravu (Franjić i sur., 2016). Biljka dobro preživljava na siromašnom tlu i podnosi ekstremne temperature u rasponu od -40 °C do +40 °C (Ruan i Li, 2002).

U srednjoj Aziji lišće se koristilo za liječenje kožnih bolesti i reumatoidnog artritisa, a u Mongoliji ekstrakti lišća i granja koristili su se za liječenje kolitisa i enterokolitisa u ljudi i

životinja. Drevni tibetski i kineski zapisi dokumentiraju uporabu pasjeg trna kod liječenja groznice, hepatitisa, cirkulatornih poremećaja, upala, toksičnosti, apscesa, kašlja, prehlade, ishemične bolesti srca, probavnih tegoba, kao laksativno sredstvo, kod metaboličkih poremećaja, pročišćavanja krvi, tumora (pretežito u želudcu i jednjaku) i ginekoloških poremećaja (Ballabh i Chaurasia, 2007). Također, znanstvena istraživanja pokazuju njegovu potencijalnu ulogu u prevenciji kroničnih bolesti poput dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i karcinoma (Bal i sur., 2011). Utvrđeno je kako hiporamin izoliran iz lišća pasjeg trna posjeduje snažnu antivirusnu aktivnost i širok spektar djelovanja protiv virusa gripe i herpesa (Suryakumar i Gupta, 2011). Također, utvrđeni su zdravstveni učinci na moždani i kardiovaskularni sustav. Ulje pasjeg trna poboljšava cirkulaciju krvi, sprječava oksidaciju nezasićenih masnih kiselina i pojačava imunitet (Basu i sur., 2007).

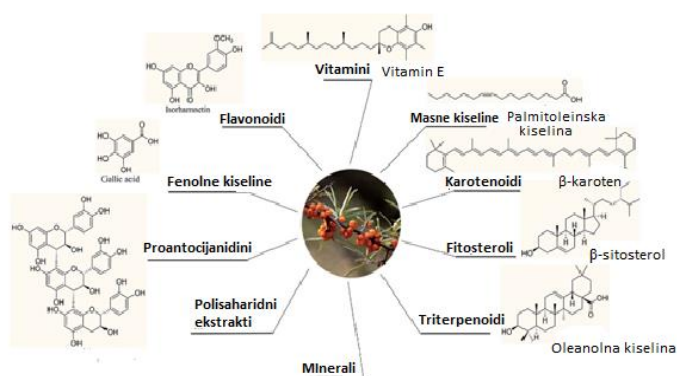
Plodovi pasjeg trna (Slika 1) koriste se za proizvodnju džemova, likera, sirupa i pigmenata. U Njemačkoj i skandinavskim zemljama sok od ploda pasjeg trna je vrlo popularan te se koristi za proizvodnju različitih funkcionalnih „ready to serve“ pića. Komercijalna proizvodnja soka pasjeg trna često rezultira velikom količinom komine koja sadrži vrijedne prirodne antioksidanse. U Rusiji se pogača nusproizvod proizvodnje ulja pasjeg trna koristi za pečenje kruha, a u Estoniji za povećanje hranjive vrijednosti pšeničnog kruha. Također, pogača se koristi za proizvodnju vitaminskih smjesa za ishranu životinja i ptica (Vinay i sur., 2012).



Slika 1. Pasji trn (Kawthar Muhammad, 2019)

2.2. KEMIJSKI SASTAV PASJEG TRNA

Kemijski sastav ploda pasjeg trna (Tablica 2) razlikuje se ovisno o klimatskim uvjetima, geografskom podrijetlu i korištenim analitičkim metodama (Zeb, 2004). Pasji trn bogat je izvor aminokiselina, mikro i makroelemenata (P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Cd, Cl) (Kumar i sur., 2011), a pulpa pasjeg trna sadrži vitamine kao što su vitamin A, E, B1, B2, B3 (niacin, nikotinamid), B6, folna kiselina (B9) i vitamin C (Stobodan i sur., 2010). Ovisno o sorti, koncentracija vitamina C varira, pa tako u europskoj podvrsti *H. rhamnoides* koncentracija se kreće od 0,3 do 3 g/kg ploda dok u mongolskoj *H. fluviatilisod* i kineskoj *H. sinensis* od 4,6 do 13,3 g/kg (Zeb, 2004). Utvrđeno je kako je koncentracija vitamina C u pasjem trnu dvadeset puta veća nego u glogu, tri puta veća nego u kiviju, šest puta veća nego u citrusima, 80 puta veća nego u rajčicama, a skoro 200 puta veća nego u jabukama (Xiao i sur., 2007). Ugljikohidrati su glavna komponenta suhe tvari u plodovima pasjeg trna čija vrijednost je u rasponu od 400 do 600 g/kg suhe tvari (Bieł i sur., 2017). Plodovi pasjeg trna obiluju nezasićenim (86,3 %) i zasićenim masnim kiselinama (13,7 %), a najzastupljenije su linolenska (omega-3), linolna (omega-6), palmitoleinska (omega-7), oleinska (omega-9) i palmitinska kiselina. Svi dijelovi biljke sadrže brojne bioaktivne spojeve kao što su flavonoidi, fenolne kiseline, karotenoidi, tokoferoli i fitosteroli (Slika 2). Istraživanja su pokazala kako bioaktivni spojevi pasjeg trna pokazuju različita biološka djelovanja i imaju važnu ulogu u ljudskom organizmu jer neutraliziraju i uklanjaju slobodne radikale, preveniraju oksidativni stres, sprječavaju razne bolesti te imaju povoljne učinke na zdravlje zbog čega se pasji trn sve više koristi u proizvodnji funkcionalne hrane (Terechuk i sur., 2019).



Slika 2. Glavni bioaktivni spojevi pasjeg trna (prema Ren i sur., 2020)

Tablica 2. Udio pojedinih komponenti pojedinih dijelova pasjeg trna (Rajchal, 2009)

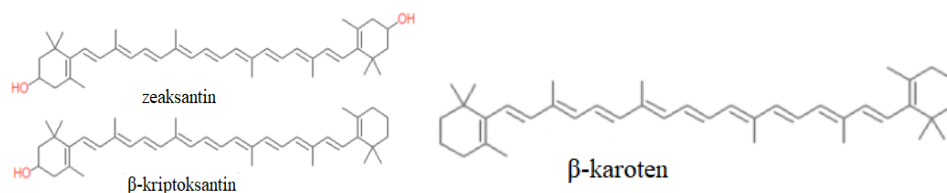
GLAVNI SPOJEVI	KONCENTRACIJA	GLAVNI SPOJEVI	KONCENTRACIJA
SOK		ULJE	
vitamin C	1161,1–1302,5 g/100 g	ulje iz sjemenki	10,37 – 19,51 %
vitamin A	0,75 mg/100 g	vitamin E	101,5 – 277,6 mg/100 g
Karotenoidi	7,5 – 7,4 mg/100 g	vitamin C	149 mg/100 g
karotenoidi u ulju	1570 mg/100 g	karotenoidi	3,3 mg/100 g
ukupni flavoni	365 – 885 mg/100 g	zasićene masne kiseline	12-20 %
ukupni flavoni (svježi plod)	354 mg/100 g	nezasićene masne kiseline	88,3-89,1 %
proteini u plodu	34,6 %		
ukupni šećeri	6,29 %		
organske kiseline	4,35 %		
PULPA		PLODOVI	
Ulje	8,44 %	vitamin C u soku	1161,1 – 1302,5 mg/100 g
karotenoidi	763 mg/100 g	vitamin A u soku	0,75 mg/100 g
vitamin E	255 – 435 mg/100 g	karotenoidi u soku	7,2 – 7,4 mg/100 g
vitamin C	780 mg/100 g	ukupni flavoni (svježi sok)	365 – 885 mg/100 g
		ukupni flavoni (svježi plod)	354 mg/100 g
		proteini	34,6 %
		ukupni šećeri	6,29 %
		organske kiseline	4,35 %

2.2.1. Karotenoidi

Karotenoidi su jedna od glavnih grupa biljnih pigmenata prisutnih u prirodi s oko 600 identificiranih kemijskih struktura. Široko su rasprostranjeni u sjemenkama, voću, cvijeću i povrću s bojama u rasponu od žute, narančaste pa sve do intenzivno crvene. Dijele se u dvije skupine: ksantofile, oksigenirane derivate karotena (lutein, zeaksantin i β -kriptoksantin) i karotene koji imaju lančastu ugljikovodičnu strukturu (α -karoten, β -karoten i likopen) (Rodriguez-Amaya, 2016; Yang i sur., 2001). Mogu biti u acikličkom obliku poput likopena ili imati prstenastu strukturu na jednom ili oba kraja lanca poput α - i β -karotena.

Karotenoidi imaju mnogo fizioloških funkcija, učinkoviti su u borbi protiv slobodnih radikala i poboljšavaju imunološki sustav. Količina, prisutnost i vrsta karotenoida u pasjem trnu ovise o sortimentu, uvjetima uzgoja, klimi i vremenu berbe. U plodovima pasjeg trna su identificirani β -karoten, zeaksantin, likopen, lutein, tokoferol, β -kriptoksantin, a sadržaj ukupnih karotenoida je bio u rasponu od 1 do 120 mg/100g (Teleszko i sur., 2015). Prema istraživanju Tkacz i sur. (2020) u plodovima različitih sorti pasjeg trna utvrđeno je da je koncentracija karotena bila u rasponu od 19 do 47 %, a ksantofila od 16 do 81 %. Prema istraživanju Pop i sur. (2014) ukupan sadržaj karotenoida plodova pasjeg trna uzgojenih u Maleziji iznosio je $17,19 \pm 1,4$ mg/100 g svježe mase, a u Rumunjskoj vrsti od 53,1 do 96,7 mg/100 g s.tv. Sadržaj β -karotena u plodovima pasjeg trna kineske sorte veći je od one u bundevi i dvostruko veći nego u mrkvi, a ta se koncentracija nije smanjivala nakon zamrzavanja ploda (Xiao-Hua i sur., 2007). Nadalje, usporedbom različitih vrsta pasjeg trna s indijskih Himalaja urvrđeno je da plodovi *H. rhamnoides* sadrže veće koncentracije karotenoida u usporedbi s *H. tibetanom* i *H. salicifolia* (Ranjith i sur., 2006). Prema istraživanju Criste i sur., (2020) od četiri ispitivane sorte pasjeg trna, sorta „Carmen“ imala je najvišu koncentraciju ukupnih karotenoida (35,78 mg/100 g), a najzastupljeniji spojevi bili su zeaksantin (22,78 mg/100 g) i lutein (4,74 mg/100 g). Prema istraživanju Rafalska i sur. (2017) najzastupljeniji spoj u plodovima bio je zeaksantin di-palmitat. U sorti „Carpatica“, najzastupljeniji karotenoid bio je zeaksantin (81,29 mg/g s.tv.) (Ursache i sur., 2017).

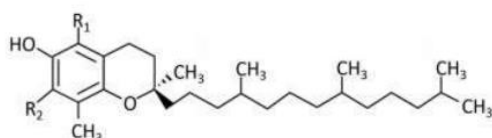
Veliki je interes u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji ne samo za plod nego i za ulje pasjeg trna zbog visokog sadržaja karotenoida te visoke antioksidativne aktivnosti (Cenkowski i sur., 2006). Posebno je značajan u oftalmološkoj zaštiti jer je u pasjem trnu zeaksantin prisutan u esteficiranom obliku s jednom ili dvije masne kiseline (Larmo i sur., 2014; Yang i Kallio, 2001). Esteri ksantofila, zeaksantina i β -kriptoksantina zajedno sa β -karotenom (Slika 3) predstavljaju glavnu frakciju u neomašćenom ekstraktu ili ulju pasjeg trna (Pop i sur., 2015; Giuffrida i sur., 2012; Weller i Breithaupt, 2003). Na sadržaj karotenoida u ulju pasjeg trna značajno utječe sortiment i područje uzgoja. Tako na primjer, u malezijskoj sorti „Mara“ više od 62 % karotenoida su mono i diesteri, u rumunjskim sortama 71 %, a u švedskim 55 % (Pop i sur., 2015; Andersson i sur., 2009). Osim karotenoida, u plodu i ulju pasjeg trna identificirani su i steroli kao npr. kampesterol (12,4 mg/ 100 g ulja u plodu), β -sitosterol (576,9 mg/100 g ulja u plodu) i stigmasterol (6,6 mg/100 g ulja u plodu pasjeg trna). Koncentracije kampesterola (22,4 mg/100 g ulja) i β -sitosterola (746,3 mg/ 100 g ulja) su veće u ulju sjemenki pasjeg trna (Cenkowski i sur., 2006).



Slika 3. Kemijska struktura zeaksantina i β -kriptoksantina (prema Jaswir i Noviendri, 2010.)

2.2.2. Tokoferoli

Tokoferoli i tokotrienoli su skupina spojeva koji imaju aktivnost vitamina E, a među njima je najaktivniji α -tokoferol. Tokoferoli djeluju kao antioksidansi, koji neutraliziraju slobodne radikale te sprječavaju oksidaciju nezasićenih masnih kiselina (Hrvatska enciklopedija, 2021). Sintetizirani su iz biljaka i drugih fotosintetskih organizama. Tokoferoli i tokotrienoli se razlikuju po bioraspoloživosti te fiziološkim i kemijskim aktivnostima. U prirodi se pojavljuju četiri različite forme tokoferola (Slika 4) i tokotrienola, a razlikuju se po broju i poziciji metilnih grupa na aromatskom prstenu kromanolne glave. Tri metilne grupe sadrže α -izomer, dok β - i γ - izomeri sadrže dvije i δ -izomer jednu metilnu grupu na aromatskom prstenu (Hunter i Cahoon, 2007).



Naziv	R ₁	R ₂
α -	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H
γ	H	CH ₃
δ -	H	H

Slika 4. Kemijska struktura α -, β -, γ - i δ -tokoferola (prema Niki i Abe, 2019)

U istraživanju Pop i sur. (2015) plodovi i sjemenke pasjeg trna su sadržavali visoku koncentraciju tokoferola, odnosno α -tokoferola (46,40 mg/kg) dok su u nižim koncentracijama određeni γ -tokoferol i δ -tokoferol.

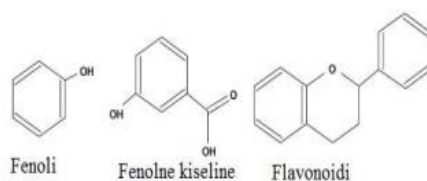
U istraživanju Zadernowski i sur. (2003) ukupna koncentracija tokoferola u ulju plodova šest sorti pasjeg trna uzgojenih u sjeveroistočnoj Poljskoj i Bjelorusiji bila je u rasponu od 101,4 do 128,3 mg/100 g ulja, a najzastupljeniji su bili α - i δ -tokoferol čija udio je iznosio od 32,1 do 37,5 % ukupnih tokoferola dok su ostali tokoferoli detektirani u tragovima.

Utvrđeno je kako se sadržaj ukupnog tokoferola u ulju pasjeg trna povećao više od 2 puta tijekom zrijenja ploda za razliku od zelenog bobičastog voća čija koncentracija γ -tokoferola je zrenjem opadala kada je plod promijenio boju iz zelene u maslinastožutu (Zadernowski i sur., 2003). Lipofilna frakcija bogata tokoferolima i karotenoidima doprinosi antioksidacijskom kapacitetu ploda pasjeg trna.

2.2.3. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi čine najbrojniju i najrašireniju grupu bioaktivnih spojeva prisutnih u biljkama te se smatra da najviše pridonose ukupnom unosu antioksidansa u ljudskoj prehrani (Spanos i sur., 1990). Sastavljeni su od aromatskog prstena koji ima vezanu jednu ili više hidroksilnih skupina, a razlike u njihovoj aktivnosti, pripisuju se razlikama u kemijskoj građi molekula koje mogu biti jednostavne strukture ili u obliku visoko polimeriziranih spojeva (Slika 5).

Najčešća podjela fenolnih spojeva (Slika 6) temelji se na broju aromatskih jezgri u fenolnoj molekuli na: monofenole (fenolne kiseline i njihovi derivati, fenolni alkoholi, itd.) i polifenole (flavonoidi, stilbeni) (Stalikas, 2007; Naczki i Shahidi, 2004). Djeluju kao kelatori metala, razbijaju lančane reakcije koje pokreću slobodni radikali te ubrzavaju ili usporavaju enzimsku aktivnost. Obzirom na razlike u kemijskoj građi dijele se na: flavone, flavonole, flavan-ole i antocijane (Brnic, 2015). Flavonoidi se nalaze u mnogim biljkama, a koncentrirani su u sjemenkama, pokožici, kori voća i drveća, cvijeću i lišću te posjeduju antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost (Rice-Evans i sur., 1995).

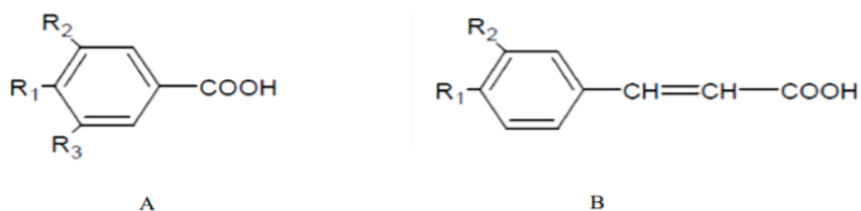


Slika 5. Struktura jednostavnih fenolnih spojeva (prema Jimenez-Lopez i sur., 2021.)



Slika 6. Podjela fenolnih spojeva (prema Xiuzhen i sur., 2007)

Flavonoidi su spojevi niske molekulske mase koji sadrže 15 ugljikovih atoma organiziranih u C6-C3-C6 konfiguraciji te čine više od 6000 fenolnih spojeva. Ime potječe od riječi *flavus* (grč. *žuto*), mnogi predstavnici su žuti biljni pigmenti. Nalaze se u raznim dijelovima biljke poput cvijeta, lista, bobica, sjemenki, kore i korijena. Razlikuju se prema stupnju nezasićenosti, oksidacije, prema broju i položaju hidroksilnih, metoksilnih i glikozidnih skupina u prstenu povezane piranskim prstenom C koji ima vezan kisik. Glavne skupine flavonoida su flavoni, flavonoi, flavan-3-oli, izoflavoni, flavanoni i antocijanidini (Nollet i Gutierrez-Urbe, 2018). Flavonoidi i konjugati imaju značajnu fiziološku i biokemijsku ulogu u biljkama. Antocijani osim što doprinose boji cvijeta, djeluju kao metaboliti stresa zbog nedostatka hranjivih tvari, ranjavanja, kao uništavači slobodnih radikala te kao zaštita od UV zračenja (Liu i sur., 2018). Flavonoli su najraširenija podskupina flavonoida. Flavonoli poput miricetina, kvercetina, izoramnetina i kempferola obično se pojavljuju kao *O*-glikozidi. Odgovorni su za boju, okus, zaštitu vitamina i enzima, štite od oksidacije masti i UV zračenja (Sharma i sur., 2018). Fenolne kiseline se dijele se u dvije glavne skupine: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Slika 7) te njihove derivate a u različitim dijelovima biljke su prisutne slobodne ili vezane kao esteri i glikozidi (Ji i sur., 2020).



Slika 7. Osnovne strukture hidroksibenzojevih (A) i hidroksicimetnih (B) kiseline (Bravo i sur., 2013)

2.2.3.1. Fenolni spojevi pasjeg trna

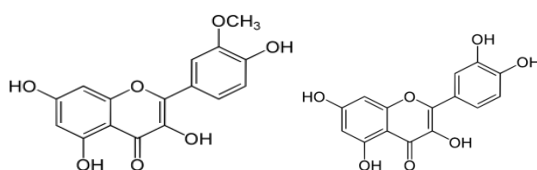
Polifenoli u vrstama *Hippophae* uglavnom su flavonoidi i fenolne kiseline, a veću koncentraciju fenola sadrže listovi pasjeg trna od plodova (Yogenda Kumar i sur., 2013). Sadržaj polifenola u plodovima *H. rhamnoides* L. *Subsp. Wolongensis* bio je veći (od 29,8 do 38,8 mg/g) nego u dudu (4,44 mg/GAE g), šipku (3,90 mg/GAE g) i borovnici (8,40 mg/GAE g) (Ji i sur., 2020). U pasjem trnu ukupno je identificirano 473 fenolnih spojeva od kojih su najzastupljeniji spojevi prikazani u Tablici 3.

Tablica 3. Najzastupljeniji fenolni spojevi pasjeg trna (Guo i sur., 2016)

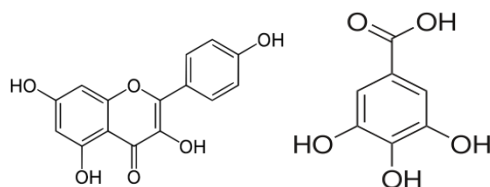
FENOLNI SPOJEVI PASJEG TRNA	KONCENTRACIJA
Izoramnatin	13,1 g/100 g s.tv.
Kvercetin	5,51 g/100 g s. tv.
Epikatehin	2,14 g/100 g s. tv.
Kempferol	1,23 g/100 g s. tv.
Izoramnatin-3-glukozid-7-ramnozid	148 mg/100 g s.tv.
Izoramnatin-3-rutinozid	58,6 mg/100 g s.tv.
Kempferol-3-soforozid-7-ramnozid	45,0 mg/100 g s.tv.
Izoramnatin-3-soforozid-7-ramnozid	39,7 mg/100 g s. tv.
Kvercetin-3-glukosid	39,7 mg/100 g s. tv.
Protokatehinska kiselina	39,3 mg/100 g s.tv.
Kvercetin-3-rutinosid	32,9 mg/100 g s.tv.
Galna kiselina	19,8 mg/100 g s.tv.
Izoramnatin-3-glucozid	15,5 mg/100 g s. tv.
Katehin	8,99 mg/100 g s.tv.
Ferulinska kiselina	3,76 mg/100 g s.tv.

Najzastupljeniji flavonoidi u plodovima pasjeg trna su **flavonoli** čija koncentracija je određena u rasponu od 212,89 do 407,78 mg/100 g (Teleszko i sur., 2015). Najzastupljeniji predstavnici flavonola su derivati izoramnetina i kvercetina (Slika 8) poput izoramnetin-3-ramnozid-glukozida, kvercetin-3-glukozid-7-ramnozida te kempferola (Hajazimi i sur.,2016). U plodovima različitih sorti pasjeg trna derivati izoramnetina predstavljaju više od 65 % ukupnih flavonola (Tkacz i sur., 2020).

U plodovima njemačkih sorti pasjeg trna „*Leikora*“ i „*Ascola*“ identificirani su derivati kvercetina, kao npr. kvercetin-3-rutinozid (rutin) i kvercetin-3-glukozyd, a u sorti „*Colosal*“ identificiran je i luteolin-7-glukozyd (Criste i sur., 2020; Fizcek i sur., 2019). Analizom osam ruskih sorti pasjeg trna detektirano je jedanaest flavonola od kojih su najdominantniji izoramnetin, kvercetin, kempferol (Slika 9) i njihovi derivati (Teleszko i sur., 2015). U šest estonskih sorti ekstrakata pasjeg trna identificirani su *trans*-resveratrol, katehin, miricetin i kvercetin te je u sorti „*Trafimovskaja*“ utvrđen najveći sadržaj kvercetina (116 mg/100 g sušenih bobica) (Gorbatsova i sur., 2007). U plodovima sorte „*RC-4*“ određeno je oko dva puta više miricetina i kvercetina (17,2 mg/g svježe mase ploda) u odnosu na sorte „*E6590*“, „*Chuyskaya*“ i „*Zlatna kiša*“ (Fatima i sur., 2015).



Slika 8. Strukturna formula izoramnetina i kvercetina (Jiang i sur., 2019.)

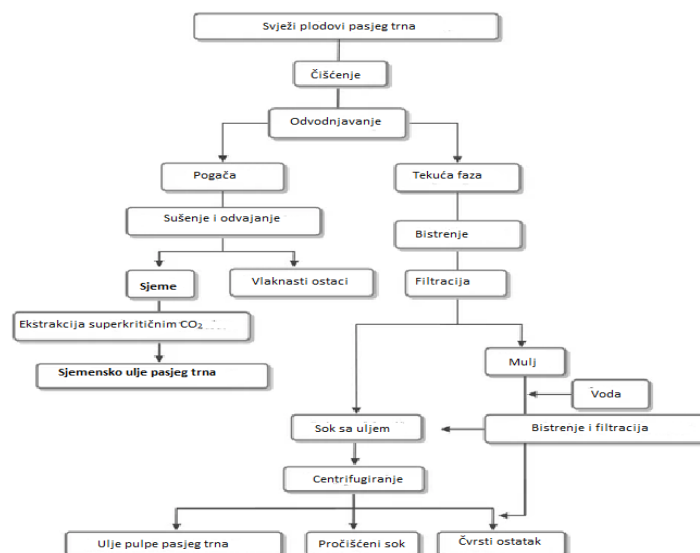


Slika 9. Strukturna formula kempferola i galne kiseline (Yogendra Kumar i sur., 2013)

U istraživanju (Criste i sur., 2020) u plodovima pasjeg trna sorte Golden Abundant i Colosal koncentracija galne kiseline (Slika 9) iznosila je 19,37 mg/100 g odnosno 18,58 mg/100 g. Također i u istraživanju Bittová i sur. (2014) galna kiselina bila je dominantna kiselina u lišću (79 mg/kg) i u bobicama (16,9 mg/kg) dok su druge fenolne kiseline poput kava, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline određene u značajno nižim koncentracijama. Salicilna kiselina (21 do 47 mg/kg s.tv. plodova) je bila dominantna fenolna kiselina u plodovima pasjeg trna u istraživanju Zadernowski i sur. (2003) te su u padajućem nizu određene *p*-kumarinska, kava, galna i vanilinska kiselina.

2.3. PROIZVODNJA ULJA PASJEG TRNA

Biljna ulja dobivaju se mehaničkom ekstrakcijom ili hladnim prešanjem različitih dijelova biljaka, najčešće sjemena, plodova i koštica (Zielinska i Nowak, 2017) (Slika 10). Prema kemijskom sastavu ulja su esteri glicerola i masnih kiselina. Biljna ulja kao bogat izvor masnih kiselina imaju široku primjenu na tržištu medicinskih i kozmetičkih proizvoda.



Slika 10. Shematski prikaz prerade plodova pasjeg trna (prema Zielinska i Nowak sur., 2017)

Najpoznatiji proizvod pasjeg trna je ulje sjemenki i osušene komine plodova odnosno pulpe zaostale nakon proizvodnje soka, a dobiva se mehanički, prešanjem i ekstrakcijom otapalima. Ulje sjemenki je žute do svijetlo narančaste boje, a ulje pulpe tamnocrvene boje i pastozne konzistencije (Cossuta i sur., 2007). Ulje pasjeg trna sadrži brojne nutritivne i bioaktivne spojeve koji djeluju antioksidativno i protuupalno, a mnogi od njih se smatraju odgovornim za jačanje imunološkog sustava. U ulju su prisutne visoke koncentracije lipofilnih sastojaka, najčešće nezasićenih masnih kiselina i fitosterola (osobito β -sitosterola) koje imaju važnu ulogu u prevenciji cerebrovaskularnih i karadiovaskularnih poremećaja (Olas, 2018). Također, ulje obiluje terpenima, flavonoidima, fenolima, vitaminima (A,E i K) i elementima u tragovima (željezo, cink, selen i mangan). Upravo nezasićene masne kiseline ulja sjemena pasjeg trna, palmitoleinska kiselina (omega-7) i γ -linolenska kiselina (omega-6) su odgovorne za regeneraciju kože. γ -linolenska kiselina odgovorna je za nastajanje prostaglandina koji štiti kožu od infekcija, alergija i upale te inhibira proces starenja. Sadržaj karotenoida jedna je od ključnih karakteristika komercijalnih ulja pasjeg trna, a sadržaj karotenoida u ulju jako varira ovisno o sorti i kreće se od 0,5 do 21,4 g/kg (Li i sur., 2003).

Ulje sjemena pasjeg trna ima veći sadržaj tokoferola odnosno, vitamina E ($233,907 \pm 0,245$ mg/100 g) u odnosu na pulpu (Chauhan i Varshneya, 2012). U ulju pasjeg trna određeno je četrnaest fitosterola koji se svrstavaju u tri podgrupe: 4-desmetil sterole, 4 α -monometil sterole i 4,4-dimetil sterole, a najzastupljeniji fitosterol u ulju pasjeg trna je β -sitosterol (Teleszko i sur., 2015). Ulje sjemenki pasjeg trna, ekstrakti lista, grana i korijena pasjeg trna imaju značajan potencijal kao prirodni antioksidansi te bi se mogli koristiti kao aditivi u hrani i za proizvodnju izoliranih bioaktivnih molekula (Wang i sur., 2016).

2.3.1. Pogača kao nusproizvod proizvodnje ulja pasjeg trna

Prilikom proizvodnje ulja različitim metodama ekstrakcije zaostaje značajna količina nusproizvoda, npr. pogača, koja predstavlja bogat izvor makro i mikroelemenata poput K, Na, Mg, Ca, Fe, Mn, Cu, Zn, Cr, ugljikohidrata, proteina i organskih kiselina te različitih grupa bioaktivnih spojeva poput fenolnih spojeva (Ivanova i sur., 2019). Pogača ploda pasjeg trna kao vrijedan nusproizvod proizvodnje ulja ima potencijal upotrebe u prehrambenoj industriji za obogaćivanje proizvoda već prisutnih na tržištu ili za proizvodnju novih funkcionalnih proizvoda te u farmaceutskoj industriji. Pogača se koristi kao funkcionalno-tehnološki dodatak (stabilizator, emulgator i antioksidans) te kao izvor dijetalnih vlakana u emulzijama (Ivanova i sur., 2019).

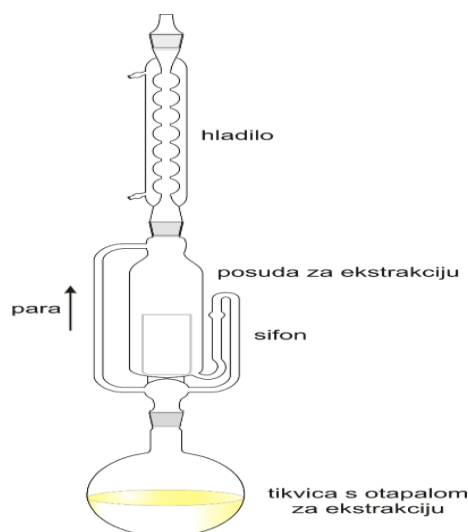
2.4. METODE EKSTRAKCIJE

Ekstrakcija je postupak koji se koristi za koncentriranje i razdvajanje neke tvari iz krute ili tekuće smjese prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka smjese (Conde i sur., 2013). Izbor otapala ovisi o polarosti spojeva koje se želi ekstrahirati, a najčešće korištena otapala za izolaciju bioaktivnih spojeva su etanol, metanol, etil acetat, aceton i voda (Kaurinovic i Vastag, 2019). Nužno je odabrati odgovarajuću metodu i uvjete ekstrakcije kako bi se izolirali spojevi u što većem udjelu (Pinelo i sur., 2005).

U konvencionalne metode ekstrakcije ubrajaju se mehanička ekstrakcija, ekstrakcija otapalom, hidrodestilacija, destilacija vodenom parom, ekstrakcija vrućom vodom te Soxhlet ekstrakcija (Ignat i sur., 2011). Konvencionalne tehnike ekstrakcije zahtjevaju duže vrijeme ekstrakcije, veće količine organskih otapala, a zbog manje selektivnosti korištenih otapala vrlo često je potrebno dobivene ekstrakte koncentrirati i pročišćavati (Sahne i sur., 2016).

Soxhlet ekstrakcija je jedna od najčešćih metoda za izolaciju ulja i lipofilnih bioaktivnih spojeva iz čvrstih uzoraka. Prednost je jednostavnost metode, aparature kao i korištenje male količine uzorka. Glavni dijelovi Soxhlet aparature su tikvice, ekstrakcijska komora i hladilo (Slika 11).

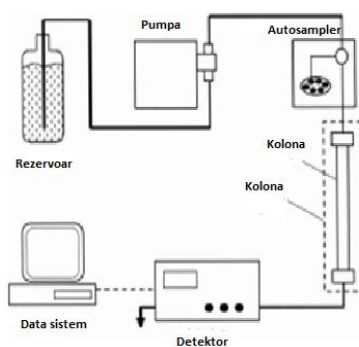
U posljednje vrijeme razvijene su napredne metode ekstrakcije kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE) i ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (HHP) (Ignat i sur., 2011). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je jednostavna, jeftina i učinkovita alternativa konvencionalnim metodama ekstrakcije te učinkoviti način ekstrakcije ulja i bioaktivnih spojeva (Carrera i sur., 2012). Temelji se na korištenju energije dobivene ultrazvukom (zvučni valovi frekvencije iznad 20 kHz) koja prolazi kroz medij te se događa fenomen kavitacije čime se olakša ekstrakcija tvari iz čvrstog uzorka pomoću otapala kojeg se bira ovisno o prirodi otopljene tvari koja se ekstrahira (Carrera i sur., 2012).



Slika 11. Soxhlet aparatura (prema Generalić, 2021)

2.5. ODREĐIVANJE BIOAKTIVNIH SPOJEVA KROMATOGRAFSKIM METODAMA

Kromatografske metode se koriste za odvajanje i identifikaciju kemijskih sastojaka prisutnih u određenim smjesama. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je metoda tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja. Većina postupaka koristi HPLC tehniku obrnutih faza uz gradijentalno eluiranje sa linearnim povećanjem udjela organskog otapala za što bolje odvajanje komponenata smjese, pri čemu se najpolarniji sastojci prvi eluiraju (Leo i sur., 2012). Koristi se kolone s malim česticama (stacionarna faza) kroz koju se mobilna faza upumpava pod visokim tlakom. Kada uzorak prođe kroz mobilnu fazu kroz kolonu pod visokim pritiskom omogućava se njegovo razdvajanje na sastavnice. Prednosti HPLC metode u usporedbi s ostalim kromatografskim tehnikama su relativno visoki radni tlak (do 400 bara), mali promjer čestica punila i mali promjer kolone, osjetljivi detektori za detekciju male količine analita, visoki stupanj separacije i brza analiza (Dong, 2006). Osnovne komponente HPLC sustava obuhvaćaju spremnik s mobilnom fazom, crpku, sustav za nanošenje uzorka (injektor), kolonu, kućište kolone, detektor i sustav za analizu podatka (Slika 12). Danas se sve više koristi tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC), radi boljeg i učinkovitijeg analiziranja smjese spojeva. UPLC je kromatografska metoda vrlo slična HPLC-u osim što se koriste znatno veći tlakovi do 1000 bara za prolaz mobilne faze kroz stacionarnu fazu zbog čega je ubrzano vrijeme analize, odnosno poboljšana detekcija i razdvajanje.



Slika 12. Dijagram HPLC sustava (prema Synder i sur., 2009)

2.5.1. Detekcija

Kako bi se bilo koji kemijski spoj identificirao, potrebno je odabrati prikladan detektor. Najčešće korišten je UV detektor zahvaljujući njegovoj visokoj osjetljivosti i zato što brojne otopljene tvari imaju apsorpcijske maksimume niskih valnih duljina u rasponu od 190-210 nm (Sasidharan i sur., 2010). DAD detektor funkcionira na isti način, no njegova prednost je što omogućava usporedbu različitih spektara, što olakšava identifikaciju spojeva (Aguilar i sur., 1996). Posljednjih godina najčešće se koristi kombinacija UPLC i dvojne spektrometrije masa (eng. *Tandem Mass Spectrometry*, MS/MS). Maseni detektor detektira spojeve na osnovi njihove molekulske mase odnosno na temelju omjera mase i naboja (m/z), a najčešće korišteni je trostruki kvadrupol (skraćenica QQQ, eng. *triple quadrupole*). Maseni spektrometri pretvaraju molekulu analita u nabijeno (ionizirano) stanje s naknadnom analizom fragmentiranih iona koji nastaju tijekom procesa ionizacije, a na temelju njihovog m/z (Pitt, 2009). Prvi kvadrupol u konfiguraciji trostrukog kvadrupola ionizira molekule analita te se odabrani molekularni ioni zatim fragmentiraju u drugom kvadrupolu i selektivno izoliraju u posljednjem trećem kvadrupolu radi određivanja količine analita za svaki omjer mase i naboja (Champagne, 2021). Osjetljivost, selektivnost i točnost učinili su LC MS tehniku izborom za određivanje metabolita lijekova, pesticida, aditiva, biljnih ekstrakta u rasponu od mikrogramskih do čak nanogramskih količina (Kailasam, 2021).

2.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ORAC (engl. *Oxygen radical absorption capacity*) METODOM

Oksidacija je normalna posljedica metabolizma u biološkim organizmima. Rezultat je stvaranja štetnih reaktivnih vrsta kisika (ROS) i reaktivnih vrsta dušika (RNS) kao na primjer superoksida, vodikovog peroksida, radikala singletnog kisika i dušikovog oksida. Ako antioksidans u organizmu ne može ukloniti te radikale i održati ravnotežu između oksidacije i antioksidacije, javlja se oksidacijski stres što dovodi do kroničnih i degenerativnih bolesti (Ji i sur., 2020). Antioksidacijski kapacitet sposobnost je kemijskih spojeva da zaštite biološke sustave protiv potencijalno štetnih efekata kemijskih reakcija ili procesa koji uključuju reaktivne kisikove i dušikove vrste. Prema načinu djelovanja antioksidativne metode dijelimo u dvije grupe:

a) HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*) metode – koje mjere sposobnost kojom se antioksidans veže na slobodne radikale doniranjem vodikovog atoma, a u koje spadaju ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) /TEAC (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil), FCR (engl. *Folin-Ciocalteu reagent*) metoda, FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) i CUPRAC (engl. *Cupric Reducing Antioxidant Power*).

b) SET (engl. *Single Electron transfer*) metode koje se temelje na mjerenju sposobnosti kojom antioksidans reducira oksidans pri čemu mijenja početnu boju, a stupanj promjene boje ovisi o koncentraciji antioksidansa u uzorku. U SET metode ubrajamo TRAP (engl. *Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter*) i ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metodu.

Metoda apsorpcije radikala kisika (ORAC) spada u jednu od najkorištenijih i standardiziranih metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta različitih uzoraka (Glazer, 1990). Prednosti ORAC metode u odnosu na ABTS i DPPH jest što ORAC testovi koriste peroksidne radikale koji su pokazali veliku učinkovitost u reakcijama sa slobodnim radikalima te je provođenje analize automatizirano. Nedostatak ORAC testa je osjetljivost na promjene temperature što može utjecati na točnost rezultata (Prior i sur., 2015). U istraživanju Hosseinian i sur. (2007) određivao se lipofilni i hidrofilni antioksidacijski kapacitet cijelog voća, sokova i pulpe pasjeg trna mjerenog ORAC metodom. U metanolnom ekstraktu ploda pasjeg trna, ORAC vrijednosti bile su u rasponu od 135 do 479 mg/100 g TE, a u acetonskom ekstraktu od 115,30 do 733,15 mg/g.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak ploda pasjeg trna

U ovom istraživanju korištene su dvije sorte pasjeg trna *Hippophae rhamnoides* uzgojene u okolici Zagreba (Hrvatska), sorta A – „Leikora“, sorta B- „Ascola“).

3.1.2. Kemikalije za ekstrakciju pigmenata

- *n*-heksan (Lach-Ner, Prag, Češka)
- aceton (Lach-Ner, Prag, Češka)
- etanol (Lach-Ner, Prag, Češka)

Standardi za kromatografsko određivanje bioaktivnih molekula

- β-karoten (Sigma –Aldrich, Steinheim, Germany)
- lutein (Sigma –Aldrich, Steinheim, Germany)
- zeaksantin (Sigma –Aldrich, Steinheim, Germany)
- kvercetin-3-*O*-glukozid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- kamferol-3-*O*-rutinozid (Thermo Fischer Scientific, Geel, Belgium)
- kava kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- epikatehin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- ferulinska kiselina (Genay, France)
- galna kiselina (Genay, France)
- klorogenska kiselina (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany)
- *p*-kumarinska kiselina (Genay, France)
- katehin (Genay, Lion, France)
- epigalokatehin galat (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany)
- rutin (Genay, Lion, France)

Reagensi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

- Trolox standard (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) (Acros Organics, USA)

- AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamid)-dihidroklorid, 98%) (Acros Organics, Belgija)
- Fluorescein (Riedel-de Haen, Njemačka)
- Metoksilirani β -ciklodekstrin (Acros Organics, USA)
- Fosfatni pufer (75 mM, pH = 7,5)

Priprema: Odvaži se 6,242 g natrijevog fosfata dihidrata ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) i otopi u 200 mL destilirane vode te se u istoj količini vode otopi i 5,687 g dinatrijevog hidrogenfosfata (Na_2HPO_4). U tikvici od 200 mL pomiješa se 61 mL 0,2 M otopine Na_2HPO_4 i 39 mL 0,2 M otopine $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ te se ista nadopuni destiliranom vodom do oznake. U odmjernu tikvicu od 100 mL doda se 37,5 mL 0,2 M otopine fosfatnog pufera te se ista nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- Otopina standarda – Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina)

Priprema: Početna ("stock") otopina trolox, početne koncentracije 103,99 μM se pripravi otapanjem 2,6 mg trolox u 100 mL fosfatnog pufera. Iz pripremljene početne otopine trolox pripremi se 6 razrjeđenja (3,12 – 103,99 μM).

- AAPH (240 mM) (2,2'-azobis(2-amidinopropionamid)-dihidroklorid)

Priprema: Otopi se 0,651 g AAPH u 10 mL 75 mM fosfatnog pufera (75 mM, pH = 7,5). Svaki dan se priprema svježi reagens.

- Fluorescein (70,3 nM)

- Otopina 1

Priprema: Otopi se 22,5 mg fluoresceina u 50 mL 75 mM fosfatnog pufera (pH 7,0).

- Otopina 2

Priprema: Od otopine 1 se uzme 24,5 μL te se nadopuni s 250 mL 75 mM fosfatnog pufera (pH 7,0). Svaki dan se pripravljaju svježja razrjeđenja otopina fluoresceina.

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Laboratorijski sušionik (Nüve FN 500, Turska)
- Eksikator (Jiangsu, Kina)
- Ultrazvučna kupelj (Elma Elmasonic s40H, Njemačka)
- HPLC-PDA (Agilent Technologies, SAD)
- Vortex miješalica (Velp Scientifica, Italija) LC-MS/MS (Agilent, Santa Clara, CA, USA)
- Analitička vaga (točnost $\pm 0,0001$ g) (Sartorius AG, Njemačka)
- Centrifuga (Hermle Z 206A, Njemačka)
- Rotacioni vakuum uparivač – rotavapor (IKA RV10 basic, Njemačka)
- Soxhlet uređaj za ekstrakciju (Gerhardt, Njemačka)
- Spektrofluorimetar CLARIOstar uređaj (BMG LabTech, Offenburg, Njemačka)

Pribor:

- Aluminijske posudice
- Stakleni štapić
- Staklene epruvete
- Odmjerne tikvice (10, 100, 250 i 1000 mL)
- Plastične lađice za vaganje
- Mikrotitarska pločica s 96 jažica (Greiner, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Staklene tikvice s okruglim dnom (25 mL)
- Pipeta od 5 i 10 mL
- Laboratorijske čaše (400, 500 i 600 mL)
- Epruvete tipa Falcon (20 i 50 mL)
- Stakleni lijevak
- Automatske mikropipete (10-100 μ L, 100-1000 μ L)
- Menzura (10, 25, 500 i 1000 mL)
- Eppendorf epruvete volumena 2,5 mL
- Viale (1,5 mL)
- 0,45 μ m filter Chromafil Xtra Pet (Macherey-Nagel GmbH & Co, Njemačka)
- Filter papir

3.2. METODE RADA

3.2.1. Soxhlet ekstrakcija ulja pasjeg trna

Postupak rada:

Liofizirani plod pasjeg trna se usitni i homogenizira te se odvaže 5 g uzorka u papirnati tuljac koji se zatim umetne u stakleni cilindar Soxhlet ekstraktora (Slika 13). Tuljac s uzorkom uroni se u otapalo *n*-heksan s kamenčićima na dnu staklenog cilindra do dijela gdje se nalazi uzorak. Postupak Soxhlet ekstrakcije traje 1 h i 45 min. Ekstrahirano ulje sakuplja se u stakleni cilindar ekstraktora zajedno s ostacima otapala. Dobivena smjesa prelije se u staklenu tikvicu s okruglim dnom, koja se prethodno izvaže, te se otapalo otpari na rotavaporu pri temperaturi 70 °C do suha. Tikvica s uzorkom dobivenog ulja se izvaže te se koristi za pripremu ekstrakata za kromatografsko određivanje karotenoida i tokoferola. Pogača plodova pasjeg trna dobivena nakon ekstrakcije ulja u Soxhlet ekstraktoru se suši na zraku 24 h te se koristi za ekstrakciju fenolnih spojeva i vitamina C.



Slika 13. Soxhlet ekstraktor (vlastita fotografija)

3.2.2. Određivanje ukupne suhe tvari u pogači pasjeg trna

Svaka sirovina se sastoji od vode i suhe tvari, a u suhoj tvari sadržani su svi oni parametri koji čine prehrambenu vrijednost neke namirnice. Ukupna suha tvar (topljiva i netopljiva) u pogači pasjeg trna određivala se sušenjem pri 105 °C do konstantne mase (AOAC, 1984).

Priprema uzorka:

Usitnjeni uzorak pogače pasjeg trna se homogenizirao prije određivanja ukupne suhe tvari.

Postupak određivanja:

U osušenu i izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem stavi se oko 1 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić te se suši u sušioniku pri 105 °C oko dva sata sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja posudica se zatvori poklopcem te hladi u eksikatoru, a zatim se izvaže s točnošću ±0,0002 g. U ohlađenu i izvaganu posudicu s pijeskom stavi se oko 1 g uzorka samljevene pogače i dobro izmiješa pomoću staklenog štapića. Sve zajedno se važe s točnošću od ±0,0002 g. Aluminijska posudica s pijeskom i ispitivanom količinom uzorka stavi se u laboratorijski sušionik, prethodno zagrijan na 105 °C ± 0,5 °C te se zagrijava 1 h sa zaklopljenim poklopcem.

Nakon hlađenja i vaganja sušenje se nastavlja toliko dugo dok razlika između dva uzastopna sušenja, u razmaku od 30 min, ne bude manja od 0,001 g. Važe se ponovno s točnošću ± 0,0002 g.

Ukupna suha tvar izračuna se prema sljedećoj formuli:

$$\text{ukupna suha tvar (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \cdot 100$$

[1]

gdje je:

m_0 – masa posudice i pomoćnog materijala (pijesak, stakleni štapić, poklopac) (g)

m_1 – masa posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja (g)

m_2 – masa posudice s ostatkom nakon sušenja (g)

3.2.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva i vitamina C iz pogače pasjeg trna

Postupak ekstrakcije:

U falcon epruvetu (20 mL) odvaži se 1±0,01 g uzorka pogače pasjeg trna te se doda 10 mL otapala (30 ili 70 % EtOH, v/v). Uzorak se ekstrahira u ultrazvučnoj kupelji pri 40 °C u trajanju od 20, 30 i 40 min. Dobiveni ekstrakt se centrifugira 10 min pri 6000 o/min, profiltrira kroz filter papir i prebaci u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopuni do oznake. Pripremljeni ekstrakti skladište se pri -18 °C do daljnje analize.

3.2.4. Određivanje karotenoidnih pigmenata u ulju pasjeg trna HPLC metodom uz PDA detektor

Priprema uzorka:

Za određivanje karotenoida izvagani uzorci ulja ($1 \pm 0,01$ g) su otopljeni u 5 mL *n*-heksana. Prije injektiranja u HPLC uređaj, uzorci se profiltriraju kroz 0,45 μ m filter u viala za injektiranje.

Princip metode:

HPLC metoda uz PDA detektor korištena je za određivanje karotenoida u ispitivanim uzorcima zbog visoke pouzdanosti i niske granice detekcije. DAD detektor primjenjuje se zato što u jednoj analizi daje precizne vrijednosti apsorbancije te pokriva snimanje cijelog UV-Vis spektra svakog razdvojenog pika.

Postupak rada:

Određivanje pojedinačnih karotenoida (β -karotena, *cis*- γ -karotena, luteina i zeaksantina i njihovih derivata) u ekstraktima ulja plodova pasjeg trna provedeno je prema metodi koju su prethodno opisali Castro-Puyana i sur. (2016) (tablica 4). Za izvođenje metode korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju Agilent 1260 Infinity sistem (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) koji je opremljen s UV/ Vis PDA detektorom. Određivanje je provedeno prema sljedećim kromatografskim uvjetima:

Tablica 4. Gradijent za HPLC-UV/Vis PDA analizu karotenoida (Castro-Puyana i sur., 2016)

t (min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)	Protok(mL/min)
0	100	0	0,8
20	70	30	0,8
35	50	50	0,8
45	20	80	0,8
50	0	100	0,8
52	100	0	0,8

Identifikacija karotenoida provodi se usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom s karakterističnim spektrima UV/VIS PDA standarda. Kvantitativne vrijednosti karotenoida izračunaju su iz jednadžbi baždarnih pravaca β -karotena, luteina i zeaksantina.

Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:

Početne otopine standarda β -karotena, luteina i zeaksantina, početne koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ pripreme se otapanjem 1 mg standarda u 10 mL *n*-heksana. Iz početne otopine standarda pripreme se razrijeđenja standardnih otopina s *n*-heksanom u rasponu od 6,67-100 $\mu\text{g/mL}$. Iz površine pikova i masenih koncentracija standardnih otopina dobiju se baždarni pravci i izračunaju pripadajuće jednadžbe pravaca za svaki standard.

Jednadžbe baždarnih pravaca za standarde karotenoida su:

za β -karoten: $y=374,11x$, $R^2= 0,994$

za lutein: $y=11,86x$, $R^2= 0,949$

za zeaksantin: $y=2,45x$ $R^2= 0,989$

Kvantifikacija *cis*- γ -karotena provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za β -karoten.

3.2.5. Određivanje tokoferola HPLC metodom uz FLD detektor

Priprema uzorka:

Za određivanje tokoferola izvagani uzorci ulja ($1 \pm 0,01$ g) su otopljeni u 5 mL *n*-heksana. Prije injektiranja u HPLC uređaj, uzorci se profiltriraju kroz 0,45 μm filter u viala za injektiranje.

Postupak rada:

Određivanje tokoferola provedeno je prema standardnoj metodi (HRN EN ISO 9936:2007) uz primjenu visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC) i fluorescentnu detekciju (FD), izokratskom metodom normalnih faza. Za izvođenje metode korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju Agilent 1260 Infinity sistem (Agilent Technologies, SAD) uz FLD detektor. Određivanje je provedeno prema kromatografskim uvjetima navedenim u ablici 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja.

Tablica 5. Uvjeti kromatografskog određivanja tokoferola

Kolona:	LiChroCART, Silica 60, 5 μm (250 x 4,6 mm), Merck
Pokretna faza:	otapalo A: smjesa heksan:izopropanol (99,3:0,7; v/v)
Temperatura kolone:	Sobna
Brzina protoka:	0,9 mL min ⁻¹ 100 % A
Vrijeme analize:	25 min
Detektor:	Fluorescentni detektor (FD)
• Valna duljina ekstinkcije:	295 nm
• Valna duljina emisije:	330 nm
Osjetljivost detektora:	Srednja
Injektirani volumen:	20 μL

Izrada baždarenog pravca α -tokoferola i izračun rezultata:

Standardna otopina α -tokoferola pripravljena je otapanjem u *n*-heksanu u odgovarajućim razrjeđenjima (0,2-10,0 $\mu\text{g/mL}$). Iz površine pikova i masenih koncentracija standardnih otopina dobije se baždarni pravac i izračuna pripadajuća jednadžba pravca koja se koristi za izračunavanje koncentracije pojedinačnih tokoferola u analiziranim uzorcima izraženo kao $\mu\text{g/mL}$.

Jednadžba baždarnog pravca za α -tokoferol: $y=35,945 \cdot x$

3.2.6. Određivanje fenolnih spojeva i vitamina C primjenom UPLC-MS/MS metode

Postupak određivanja:

Za određivanje sadržaja pojedinih fenolnih spojeva i vitamina C u analiziranim ekstraktima koršten je UPLC-MS/MS ESI u pozitivnom i negativnom modu prema metodi koju se prethodno opisali Garofulić i sur. (2018) (Tablica 7), a uvjeti kromatografskog određivanja i podaci masene spektrometrije navedeni su u tablici 6. Za kontrolu uređaja i obradu podataka korišten je program Agilent MassHunter Workstation (ver. B.04.01).

Tablica 6. Uvjeti kromatografskog određivanja fenolnih spojeva

Kolona:	Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 μm (100 \times 2,1 mm I.D.)
Pokretna faza:	otapalo A: 0,1 % mravlja kiselina u redestiliranoj vodi otapalo B: 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu
Detektor:	MS/MS trostruki kvadropol (Agilent 6430 QqQ)
Ionski izvor:	ESI
MS parametri:	temperatura plina: 300 $^{\circ}\text{C}$ protok plina (N_2): 11 L/min nebulizer: 40 psi napon na kapilari: +4000 V; -3500 V maseni detektor: MRM mode (m/z 50 - 1000)
Eluiranje:	gradijentno – gradijent prikazan u tablici 3
Temperatura:	35 $^{\circ}\text{C}$
Vrijeme trajanja:	12,5 min
Injektirani volumen:	2,5 μL

Tablica 7. Gradijent za UPLC-MS/MS analizu fenolnih spojeva (Garofulić i sur., 2018)

t (min)	Otapalo A	Otapalo B	Protok (mL/min)
0	95	5	0,3
10	65	35	0,3
10,1	20	80	0,3
11	20	80	0,3
11,1	95	5	0,3
12,5	95	5	0,3

Tablica 8. Podaci masene spektrometrije i identifikacija fenolnih spojeva

Naziv spoja	Prekursor ion	Produkt ion	Fragmentor	Kolizijska energija	Polarnost
FLAVONOLI					
Izoramnetin-3-sinapoilglukozid-glukozid-7-ramnozid	993	463	100	5	pozitivan
Izoramnetin-3-soforozid-7-ramnozide	787	463	100	5	pozitivan
Izoramnetin-3-rutinozide-7-glukozid	787	625	100	5	pozitivan
Kvercetin-3-soforozid-7-ramnozid	773	303	100	5	pozitivan
Kvercetin-3-ramnoglukozid-7-ramnozid	757	303	100	5	pozitivan
Kamferol-soforozide-ramnozid	757	287	120	15	pozitivan
Izoramnetin-3,7-diheksozid	641	479	100	5	pozitivan
Izoramnetin-3-rutinozid	625	317	100	5	pozitivan
Rutin*	611	465	120	5	pozitivan
Rutin*	611	303	120	15	pozitivan
Kamferol-heksozid-ramnozid	595	153	120	15	pozitivan
Kamferol-3-rutinozid*	595	287	120	15	pozitivan
Izoramnetin-3-heksozid	479	317	100	5	pozitivan
Kvercetin-3-glukozid*	465	303	100	5	pozitivan
Izoramnetin-3-ramnozid	463	317	100	5	pozitivan
Kvercetin-3-ramnozid	449	303	100	5	pozitivan
Kvercetin-3-pentozide	435	303	100	5	pozitivan
Kamferol-ramnozid	433	287	120	15	pozitivan
Izoramnetin	317	201	100	5	pozitivan
Kamferol	287	145	120	15	pozitivan
FLAVAN-3-OLI					
Katehin	291	139	100	10	pozitivan
Katehin	291	165	100	10	pozitivan
Epikatehin	291	139	100	10	pozitivan
FLAVONI					
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	449	287	100	35	pozitivan
Luteolin*	287	153	140	35	pozitivan
Apigenin*	271	153	80	30	pozitivan
HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE					
Vanilinska kiselina*	169,1	125,1	100	10	pozitivan
Elaginska kiselina heksozid	436	303	100	10	negativan
Galna kiselina*	169	125	100	10	negativan
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	137	93	100	10	negativan
Siringinska kiselina*	199,1	140,1	90	10	pozitivan
Protokatehinska kiselina	153	109	100	10	negativan

Tablica 9. Podaci masene spektrometrije i identifikacija fenolnih spojeva - nastavak

HIDROKSICIMETNE KISELINE					
Naziv spoja	Prekursor ion	Produkt ion	Fragmentor	Kolizijska energija	Polarnost
HIDROKSICIMETNE KISELINE					
Kafeinska kiselina*	179	135	80	10	negativan
Klorogenska kiselina*	353	191	80	10	negativan
<i>p</i> -kumarinska kiselina*	163	119	80	10	negativan
Ferulinska kiselina*	193	178	80	5	negativan
Ferulinska kiselina*	193	134	80	10	negativan
Ružmarinska kiselina*	359	161	110	10	negativan
Cinamična kiselina*	147	103	80	10	negativan
VITAMINI					
Askorbinska kiselina*	175	115	100	5	negativan

Identifikacija fenolnih spojeva na UPLC MS/MS-u provedena je usporedbom spektra masa i fragmentacijskih uzoraka autentičnih standarda, a za spojeve za koje ne postoje standardi, prekursor i produkt ioni te polaritet određeni su prema literaturnim podacima (Tablica 8). Kvantifikacija pojedinih fenolnih spojeva u uzorcima izračunata je prema baždarnim jednadžbama standardnih spojeva (Tablica 9), a za kvantifikaciju spojeva za koje ne postoje standardi korištene su jednadžbe pravaca spojeva iz iste grupe fenolnih spojeva. Standardi polifenola za izradu kalibracijskih krivulja otopljeni su u metanolu u koncentraciji od 100 mg/mL, a točke kalibracije bile su u rasponu od 0,10 do 50 mg/mL. Dobivene koncentracije izražene su u mg/100 g osušenog uzorka pogače, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja.

Tablica 10. Baždarne jednadžbe standardnih spojeva

Spoj	Baždarna krivulja	R²
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	y= 1580 x	0,99
Kamferol-3- <i>O</i> -rutinozid	y= 217,43 x	0,98
Kava kiselina	y= 1282 x	0,99
Epikatehin	y= 221,99 x	0,97
Ferulinska kiselina	y= 44,403 x	0,99
Galna kiselina	y= 203,67 x	0,99
Klorogenska kiselina	y= 3410,5 x	0,99
<i>p</i> -kumarinska kiselina	y= 198,3 x	0,99
Katehin	y= 5477,2 x	0,98

Tablica 11. Baždarne jednadžbe standardnih spojeva - nastavak

Spoj	Baždarna krivulja	R ²
Epigalokatehin galat	y= 355,6 x	0,98
Rutin	y= 153,45 x	0,99
Epikatehin galat	y= 218,67 x	0,99
Procijanidin B2	y= 523,87 x	0,99
Miricetin	y= 90,266 x	0,99
Apigenin	y= 198,43 x	0,99
Luteolin	y= 494,98 x	0,98
Kinična kiselina	y= 1409,6 x	0,99
Vanilinska kiselina	y= 153,43 x	0,98

3.2.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

3.2.7.1. *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta hidrofилnih spojeva ORAC metodom*

Princip metode:

ORAC metoda prema mehanizmu djelovanja spada u HAT metodu koja se temelji na prijenosu atoma vodika, a mjeri se inhibicija peroksil radikala koji nastaje uslijed raspadanja azo-spoja, 2,2'-azobis(2- amidinoproionamid)-dihidroklorid) (AAPH), pri stalnoj brzini na 37 °C. Ova metoda je klasičan primjer antioksidacijske aktivnosti sprječavanjem lančanih reakcija radikala (Prior, 2015). ORAC metoda se koristi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta antioksidansa topljivih u vodi (H-ORAC) i u uljima (L-ORAC).

Priprema uzoraka:

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka ORAC metodom, pripreme se odgovarajuća razrjeđenja uzoraka fosfatnim puferom (75 mM, pH 7,5).

Postupak određivanja:

U jažicu mikrotitarske pločice otpipetira se 150 µL otopine fluorescina, a u odgovarajuće jažice 25 µL uzorka ili 25 µL fosfatnog pufera (slijepa proba) ili 25 µL otopine standarda Troloxa odgovarajućih razrjeđenja (3,12 – 103,99 µM) za izradu baždarnog pravca.. Pločica s jažicama se inkubira u čitaču mikroploča 30 min/37 °C prije početka mjerenja.

Nakon inkubacije, mjeri se fluorescencija (λ eks. 485 nm i λ em. 520 nm) pri temperaturi od 37 °C svakih 90 s kako bi se odredio pozadinski signal. Nakon 3 ciklusa, 25 μ L svježe pripremljenog 240 mM AAPH je injektirano softverski pomoću unutarnjeg ubrizgavača. Mjerenje intenziteta fluorescencije traje do 120 min.

MARS softver (MARS 2.0 software, BMG LABTECH, Offenburg, Germany) za analizu podataka omogućuje automatsku evaluaciju. Mjerenje je provedeno u duplikatu te su rezultati prosječne vrijednosti dvaju mjerenja iskazani zajedno sa standardnom devijacijom. ORAC vrijednosti izražavaju se kao μ mol troloks ekvivalenta po litri (μ mol/TE L), odnosno preračunato na 100 g suhe tvari ekstrakta kao μ mol troloks ekvivalenta na 100 g suhe tvari ekstrakta (μ mol/TE/10/g s.tv.e.).

3.2.7.2. *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta lipofilnom ORAC metodom*

Huang i sur. (2002) su unaprijedili ORAC metodu za lipofilne antioksidanse koristeći metilirani β -ciklodekstrin (RMCD) koji učinkovito povećava topljivosti lipidnih antioksidanasa u fosfatnom puferu.

Priprema uzoraka:

Prethodno dobiveni ekstrakti otpare se na rotavaporu pri 70 °C do suha. Prema radu Naguib i sur. (2003) određen je omjer ulja i acetona; 0,5 g dobivenog ulja otopi se u 20 mL acetona. Potom se napravi razrjeđenje 1:1 sa 7 % RMCD otopinom te se stavi 1 h u ultrazvučnu kupelj pri sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci se promiješaju na vortex miješalici (40 o/min) te profiltriraju kroz 0,45 μ m filter. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti lipofilnih spojeva u uzorku ORAC metodom pripreme se odgovarajuća razrjeđenja uzoraka.

Postupak rada:

Antioksidacijski kapacitet ekstrakata određen je ORAC metodom prema radu Naguib i sur. (2003). U 7 % RMCD pripremljena su odgovarajuća razrjeđenja uzoraka i standardne otopine Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), dok su u 75 mM fosfatnom puferu (pH 7,38) pripremljene otopine fluoresceina (63 nM) i izvor radikala 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorida (240 mM AAPH).

U jažicu mikrotitarske pločice otpipetira se 150 μ L otopine fluoresceina te 25 μ L uzorka, 25 μ L 7 % RMCD otopine za slijepu probu ili 25 μ L razrijeđenih otopina standarda Troloxa za izradu baždarnog pravca. Ploča s jažicama se inkubira u čitaču mikroploča 30 min/37 °C prije početka mjerenja.

Nakon inkubacije, mjeri se fluorescencija (λ eks. 493 nm i λ em. 515 nm) svakih 90 s kako bi se odredio pozadinski signal. Nakon 3 ciklusa, 25 μ L svježe pripremljenog 240 mM AAPH je injektirano softverski pomoću unutarnjeg ubrizgivača. Mjerenje intenziteta fluorescencije traje do 120 min. Mjerenje je provedeno u duplikatu, a analiza dobivenih podataka napravljena je pomoću odgovarajućeg računalnog programa (MARS 2.0 software, BMG LabTech, Offenburg, Njemačka). Dobiveni su rezultati izraženi kao prosječne vrijednosti dvaju mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom kao μ mol troloks ekvivalenta po litri (μ mol/TE/L), odnosno preračunato na μ mol/TE/100 g ulja.

3.2.8. Obrada rezultata

Za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka korišten je programski sustav Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD). Multifaktorska analiza varijance (ANOVA) korištena je kako bi se utvrdila važnost utjecaja pojedinih varijabli (vrsta ekstrakcijskog otapala; vrijeme ekstrakcije) na promatrane parametre (maseni udio fenolnih spojeva te vrijednost H-ORACA-a). Statistički značajna razlika razmatrana je na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti), a sve srednje vrijednosti rezultata uspoređene su s Tukey HSD testom.

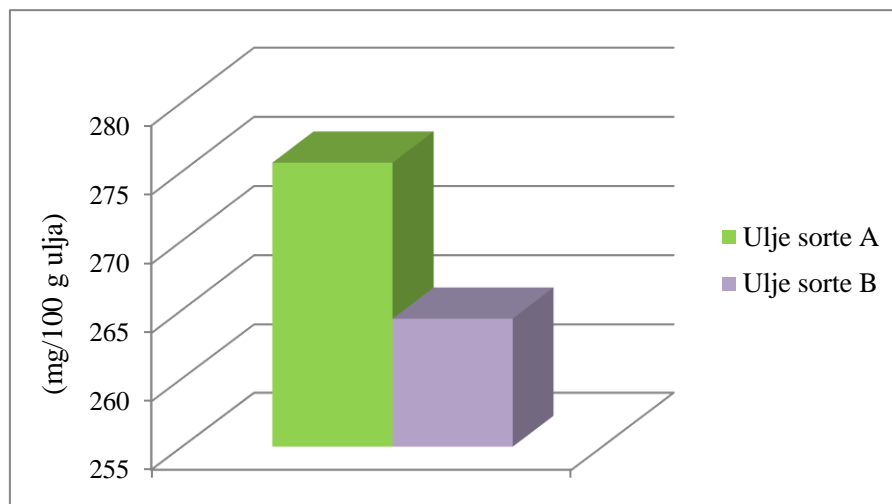
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome istraživanju korišteni su plodovi pasjeg trna, sorte *Leikora* (A) i sorte *Ascola* (B). Sortu A „*Leikora*“ karakteriziraju veće bobice, svijetlo narančaste boje dok sortu B „*Ascola*“ karakteriziraju manji plodovi tamnonarančaste boje. Ukupna suha tvar liofiliziranih plodova sorte A iznosila je 90,09 %, a sorte B 94,05 %. Soxhlet ekstrakcijom iz liofiliziranog ploda sorte A dobiveno je 27,73 % ulja, a iz sorte B 27,82% ulja. U pogači ploda pasjeg trna koja je zaostala nakon ekstrakcije ulja također je određena suha tvar pogače sorte A i sorte B koja je iznosila 79,94 %, odnosno 82,09 %. Nakon Soxhlet ekstrakcije u ekstraktima ulja provedeno je kromatografsko određivanje tokoferola primjenom HPLC metode uz FLD detektor te karotenoida primjenom HPLC metode uz DAD detektor. U pogačama sorte A i B ispitan je utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom iz upotrebu vodenih otopina etanola (30 i 70 %, v/v) na izolaciju fenolnih spojeva i vitamina C te je određivanje provedeno primjenom UPLC-ESI MS/MS metode. Također u uljima i ekstraktima pogače određen je lipofilni i hidrofilni antioksidacijski kapacitet ORAC metodom.

Maseni udjeli identificiranih i kvantificiranih tokoferola (Slika 14), karotenoida (Tablica 10) izraženi su kao mg/100 g ulja. Lipofilni ORAC izražen je kao $\mu\text{mol}/\text{TE}$ 100 g ulja (Slika 15), skupine fenolnih spojeva (Tablice 11 i 12) kao i vitamin C (Tablica 14) izraženi su kao mg/100 g s. tv. uzorka, ukupni fenolni izraženi su kao mg/100 g (Tablica 13). Hidrofilni ORAC izražen je kao $\mu\text{mol}/\text{TE}/10$ g s. tv. (Slika 16).

4.1.SADRŽAJ TOKOFEROLA i KAROTENOIDA U ULJIMA DVIJE SORTE PASJEG TRNA EKSTRAHIRANIM SOXHLET EKSTRAKCIJOM

4.1.1. Rezultati određivanja sadržaja tokoferola u uljima HPLC metodom uz FLD detektor



Slika 14. Rezultati masenih udjela α -tokoferola (mg/100 g ulja) određenih HPLC metodom uz FLD detektor u uljima dvije sorte pasjeg trna, sorte „Leikora“ (A) i sorte „Ascola“ (B)

U uzorcima ulja ploda sorte A i sorte B određen je samo α -tokoferol, dok su ostali tokoferoli određeni u tragovima. Viši udio α -tokoferola određen je u sorti A (275,63 mg/100 g ulja), nego u sorti B (264,36 mg/100 g ulja) (Slika 14). I u istraživanju Zadernowski i sur. (2003) u ulju ploda pasjeg trna α -tokoferol bio je najzastupljeniji spoj, a maseni udio je iznosio od 101,4 do 128,3 mg/100 g ulja što je značajno niže u usporedbi s rezultatima u ovom radu. Razlog tomu može biti utjecaj sortimenta, vremena berbe i okolišnih uvjeta uzgoja pasjeg trna što je pokazalo i trogodišnje istraživanje Andersson i sur. (2008) gdje je sadržaj tokoferola i tokotrienola značajno varirao tijekom zrenja u plodovima četiri sorte pasjeg trna. Isto istraživanje je pokazalo kako je sadržaj α -tokoferola bio veći u razdoblju zrenja te u pozitivnoj korelaciji s dnevnom temperaturom. Također, različiti čimbenici poput stresa, suše, niske temperature i visokog inteziteta svjetlosti utječu na sintezu tokoferola (Andersson i sur., 2008).

4.1.2. Rezultati određivanja sadržaja karotenoida u uljima HPLC metodom uz PDA detektor

U Tablici 10 prikazani su rezultati masenih udjela pojedinačnih karotenoida u uljima obje sorte pasjeg trna te zbroj pojedinačnih karotenoida izražen kao ukupni karotenoidi. Ukupni karotenoidi određeni su u podjednakim udjelima odnosno u ulju sorte A udio ukupnih karotenoida iznosio je 917, 03 mg/100 g ulja, a u ulju sorte B iznosio je 915, 11 mg/100 g ulja (Tablica 10). Prema Rajchal i sur. (2009) sadržaj karotenoida u ulju pasjeg trna iznosio je 1570 mg/100 g ulja što je značajno više u usporedbi s rezultatima u ovom radu. U istraživanju Tkacz i sur. (2020) utvrđeno je kako je koncentracija karotenoida bila u rasponu od 19 do 47%, a ksantofila od 16 do 81 %. Najzastupljeniji spojevi u ulju ploda pasjeg trna bili su derivati luteina te zeaksantina od kojih su najzastupljeniji bili derivat 4 zeaksantina te derivat 3 luteina. Sastav i maseni udio karotenoida u pasjem trnu ovisi o sortimentu, uvjetima uzgoja, klimi i vremenu berbe (Raffo i sur., 2004). Rezultati dobivenu u ovom radu su u skladu s istraživanjima Ciesarová i sur. (2020) te Pop i sur. (2014) gdje su najzastupljeniji pigmenti također bili zeaksantin i njegovi derivati, β karoten te esteri luteina.

Tablica 10. Rezultati masenog udjela karotenoida (mg/100 g ulja) određenih u uljima ploda pasjeg trna sorti „Leikora“ (A) i „Ascola“ (B)

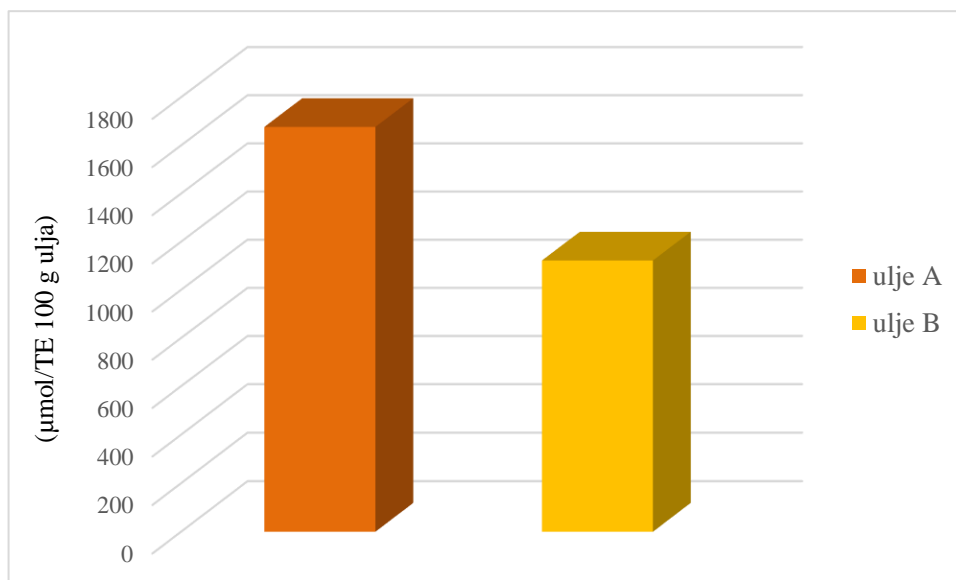
PIGMENTI (mg/100 g ulja)	Ulje (sorta A)	Ulje (sorta B)
Zeaksantin	26,58±1,72	11,78±1,11
der 1 zeaksantina	14,07±0,26	5,71±0,37
der 2 zeaksantina	57,02±0,30	70,51±1,33
der 3 zeaksantina	19,24±1,31	5,73±0,03
der 4 zeaksantina	249,58±2,65	155,65±3,95
Lutein	72,23±0,04	99,04±3,14
der 1 lutein	113,131±1,61	211,05±3,06
der 2 lutein	54,24±2,33	27,56±0,83
der 3 lutein	264,05±1,74	126,54±1,47
β -karoten	28,87±0,51	53,75±1,46
<i>cis</i> - β -karoten	6,61±0,1	3,76±0,03
<i>cis</i> - γ -karoten	nd	96,45±0,80
γ karoten	nd	5,84±0,86
β kriptoksantin	4,34±0,07	12,63±1,29
der 1 β kriptoksantin	7,08±0,02	6,62±0,02
der 1 likopen	nd	22,49±1,46
UKUPNI KAROTENOIDI	917,03±9,23	915,11±16,57

nd- neidentificiran spoj

Istraživanjima je utvrđeno da mono- i diesteri čine većinu karotenoida u malezijskim (62 %), rumunjskim (71 %) te švedskim (55 %) sortama pasjeg trna (Pop i sur., 2015; Andersson i sur., 2009). U istraživanju Olas (2018) te Urssache i sur. (2017) identificirano je dvanaest spojeva iz skupine karotenoida od kojih su najzastupljeniji bili zeaksantin (81,29 mg/g s. tv.) i astaksantin (22,94 mg/g s. tv.). U plodovima tri njemačke sorte „Askola“, „Hergo“ i „Leikora“ glavni karotenoidi bili su zeaksantin, karoten i kriptoksantin, a genotip je utjecao na akumulaciju i profil karotenoida (Raffo i sur., 2004). U skladu s rezultatima u ovom radu je i istraživanje Criste i sur. (2020) gdje su u plodovima pasjeg trna identificirani lutein, zeaksantin, beta kriptoksantin, cis beta karoten i beta karoten.

4.1.3. Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta lipofilnom ORAC metodom

Prema dobivenim rezultatima ulje sorte A imalo je veći lipofilni antioksidacijski kapacitet (1676,9 $\mu\text{mol/TE/100 g}$ ulja) nego ulje sorte B (1122,1375 $\mu\text{mol/TE/100 g}$ ulja) (Slika 15). Antioksidativna svojstva lipofilnih bioaktivnih spojeva kao i kod fenolnih spojeva variraju zbog razlika u sortama, vremenu berbe, uvjetima skladištenja itd (Criste i sur., 2020). Ovo istraživanje je u skladu s radom Recendava i sur. (2018) gdje je također u sorti „Leikora“ određena veća vrijednost antioksidativnog kapaciteta nego u sorti „Ascola“.



Slika 15. Rezultati antioksidacijskog kapaciteta ($\mu\text{mol/TE}$ 100 g ulja) lipofilnih spojeva u ulju dvije sorte pasjeg trna „Leikora“ (A) i sorte „Ascola“ (B) primjenom ORAC metode

4.2. IZOLACIJA FENOLNIH SPOJEVA I VITAMINA C POGAČE PLODOVA PASJEG TRNA PRIMJENOM EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNE ULTRAZVUKOM

Maseni udjeli pojedinačnih fenolnih spojeva određeni su u ekstraktima pogače plodova dvije sorte pasjeg trna dobivenih primjenom UAE uz različita otapala (30 i 70 % etanol, v/v) i vremena trajanja ekstrakcije (20, 30 i 40 min).

4.2.1. Rezultati određivanja fenolnih spojeva u ekstraktima pogače dvije sorte pasjeg trna određene UPLC MS/MS metodom

U Tablici 11 prikazani su rezultati masenih udjela pojedinačnih fenolnih spojeva sorte A, u Tablici 12 rezultati pojedinačnih fenolnih spojeva sorte B, a u Tablici 13 prikazan je ukupan maseni udio fenolnih grupa kao zbroj pojedinačnih spojeva određenih u ekstraktima pogače sorte A i B. U ispitivanim uzorcima ukupni flavonoli (U F-OL) bili su u rasponu od 12,75 do 28,51 mg/100 g, ukupni flavanoli (U FLA-3-OL) od 1,07 do 2,40 mg/100 g, ukupne hidroksibenzojeve kiseline (UHBA) od 2,60 do 11,38 mg/100 g, a ukupne hidroksicimetne kiseline (UHCA) od 18,56 do 36,32 mg/100 g (Tablica 13). Najniži maseni udio ukupnih fenola (zbroj svih fenolnih grupa) određen je u pogači sorte B ekstrahirane 30 %-tnim etanolom i vremenu ekstrakcije od 30 min (40,06 mg/100 g), a najveća vrijednost određena je u ekstraktima iste sorte ekstrahiranoj 70 %-tnim etanolom i dužem vremenku ekstrakcije od 40 min (66,01 mg/100 g), (Tablica 13). Na temelju rezultata, najzastupljenije grupe fenolnih spojeva u svim ekstraktima pogače čine hidroksicimetne kiseline (HCK) i flavonoli.

Maseni udio HCK-a pogače sorte A kretao se u rasponu od 18,56 do 34,87 mg/100 g s. tv., a sorte B u rasponu od 19,68 do 36,32 mg/100 g s. tv. (Tablica 13). U ekstraktima pogače sorte A i sorte B najveći udio HCK određen je u 70 %-tnim etanolnim ekstraktima i vremenu ekstrakcije od 40 min. Ukupno je identificirano šest HCK u analiziranim uzorcima, a u najvećim udjelima su određene cimetna (8,90 do 22,14 mg/100 g) (Tablica 12), kava (1,12 do 6,53 mg/100 g) (tablica 11) i *p*-kumarinska kiselina (0,16 do 7,51 mg/100 g) (Tablica 12). Dobiveni rezultati su u skladu sa istraživanjem Criste i sur. (2020) gdje su cimetna kiselina i njeni derivati bili su najzastupljenije HCK u plodovima pasjeg trna. Također, u plodovima pasjeg trna sorte "Leikora" i "Askola" te sibirske sorte "Orangeveja" uzgojene u Njemačkoj osim dominantnih flavonola u značajnim udjelima je određena i cimetna kiselina (Ficzek i sur., 2019). Istraživanja pokazuju da ovisno o sortimentu, uzgojnim uvjetima i vremenu berbe značajno varira sastav fenolnih kiselina.

Tako na primjer prema literaturnim podacima dominantne fenolne kiseline u pasjem trnu su *p*-kumarinska, kava i ferulinska kiselina (Criste i sur., 2020; Hajazimi i sur., 2016; Fatima i sur., 2015).

Maseni udio flavonola u ekstraktima pogače sorte A kretao se u rasponu od 13,08 do 22,25 mg/100 g s. tv., a u ekstraktima sorte B od 12,75 do 28,51 mg/100 g s. tv. (Tablica 13). Identificirano je devetnaest flavonola, a najzastupljeniji flavonoli u ekstraktima pogače obje sorte bili su izoramnetin-3-heksozid i rutin što je u skladu s istraživanjem Ciesarová i sur. (2020). Najveći maseni udijeli izoramnetin-3-heksozida (12,05 mg/100 g s. tv.) i rutina (6,40 mg/100 g s. tv.) određeni su u ekstraktima pogače sorte B primjenom 70 %-tne vodene otopine etanola i vremena ekstrakcije od 30 odnosno 20 min (Tablica 12).

I u istraživanju Pop i sur. (2013) identificirano je devetnaest flavonola u plodovima *H. rhamnoides* L. subsp. *Carpatica* od kojih su najzastupljeniji bili izoramnetin-3-glukozid, izoramnetin-3-ramnozilglukozid, izoramnetin-3-soforozid-7-ramnozid, izoramnetin, kvercetin-3-heksozid, izoramnetin-3-heksozid, izoramnetin-3-glukozid-7-ramnozid i rutin. Druga istraživanja su utvrdila da su derivati izoramnetina dominantna flavonolna i fenolna frakcija u pasjem trnu (Ma i sur., 2016; Fatima i sur., 2015), a prema Teleszko i sur. (2018) derivati izoramnetina smatraju se dominantnom polifenolnom frakcijom koja čini preko 6 5% ukupnih flavonola. U analiziranim pogačama u najvećem udjelu je određen i kvercetin-3-glukozid (0,73 do 2,40 mg/100 g s. tv.). Na niže udjele flavonola u analiziranim pogačama vjerojatno su utjecali visoka temperatura i duže vrijeme Soxhlet ekstrakcije tijekom proizvodnje ulja ploda pasjeg trna.

Prema istraživanju Gorbatova i sur. (2007) u sorti “*Trafimovskaja*” također je utvrđen značajan udio kvercetina. Neka istraživanja pokazuju da duže sazrijevanje listova i plodova rezultira povišenim sadržajem kvercetina odnosno da vrijeme berbe biljke značajno može utjecati na njezin sastav (Criste i sur., 2020).

Rezultati pokazuju kako otapalo ima statistički značajan utjecaj na ukupne flavonole i HCK te da su veći udijeli dobiveni kad je kao otapalo korišten 70 %-tni etanol dok vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na udjele određivanih spojeva. Prema istraživanjima vodene otopine etanola u rasponu od 50 do 80 % te aceton su učinkovitija otapala za ekstrakciju većine fenolnih spojeva (Dirar i sur., 2019; Oreopoulou i sur., 2019). U analiziranim ekstraktima pogače maseni udio ukupnih flavanola kretao se u rasponu od 1,07 do 2,40 mg/100 g. Određena su dva flavanola, epikatehin (0,36 do 0,99 mg/100 g) i katehin (0,30 do 1,03 mg/100 g) što je u skladu sa literaturnim podacima (Ma i sur., 2016).

Najveći udio epikatehina određen je u ekstraktu pogače B, a katehina u pogači A primjenom 70 %-tne vodene otopine etanola i vremena trajanja ekstrakcije od 30 odnosno 40 min. Prema istraživanju Suryakumar i Gupta (2011) epikatehin je prisutan u višim udjelima u listovima i zelenim bobicama pasjeg trna.

U analiziranim pogačama određena su tri flavona od kojih su najzastupljeniji luteolin-7-*O*-glukozid, apigenin i luteolin. Najveći udio luteolin-7-*O*-glukozida (0,32 mg/100 g s. tv.) određen je u ekstraktima pogače sorte B primjenom 70 %-tne vodene otopine etanola i vremena trajanja ekstrakcije od 40 min (Tablica 12). Luteolin (0,17 mg/100 g s. tv.) i apigenin (0,27 mg/100 g. s. tv.) su bili u najvećem udjelu zastupljeni u ekstraktima pogače sorte A primjenom 70 %-tne odnosno 30 %-tne vodene otopine etanola i vremena trajanja ekstrakcije od 20 min (Tablica 11).

Prema literaturnim podacima luteolin-7-glukozid je najzastupljeniji flavanol u plodovima pasjeg trna sorte Colosal (Criste i sur., 2020).

U pogačama sorte A i B detektirano je šest hidroksibenzojevih kiselina, a maseni udjeli ukupnih HBK-a kretali su se u rasponu od 2,60 do 11,38 mg/100 g s. tv. (Tablica 13). Najviši maseni udjeli HBK određeni su u ekstraktima sorte A i sorte B sa 70 %-tnim etanolom i vremenu trajanja ekstrakcije od 20 odnosno 40 min (Tablica 13). U analiziranim ekstraktima najzastupljenija je bila vanilinska kiselina (8,88 mg/100 g s. tv.) s najvišim udjelom u pogači sorte A (Tablica 11), a protokatehinska kiselina (1,03 mg/100 g s. tv.) u pogači sorte B kada je ekstrakcija provedena sa 70 %-tnim etanolom i pri vremenu ekstrakcije od 20 odnosno 30 min (Tablica 12). Prema istraživanjima, vanilinska, galna i salicilna kiselina su najzastupljenije fenolne kiseline u plodovima i lišću pasjeg trna (Ciesarová i sur., 2020; Ji i sur., 2020; Zadernowski i sur., 2003. Sortiment, mjesto uzgoja, vrijeme berbe, skladištenje i procesiranje značajno utječu na sastav fenolnih spojeva (Criste i sur., 2020; Pop i sur., 2015).

Tablica 11. Rezultati određivanja fenolnih spojeva (mg/100 g s. tv.) u ekstraktima pogače pasjeg trna sorte „*Leikora*“ (A) dobivenih primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Fenolni spojevi	Maseni udio (mg/100 g s.tv.)					
	A1 20	A1 30	A1 40	A2 20	A2 30	A2 40
FLAVONOLI						
Izoramnatin-3-sinapoilglukozid-glukoza-7-ramnozid	0,11±0,01	0,10±0,02	0,09±0,01	0,05±0,01	0,07±0,02	0,07±0,01
Izoramnatin-3-soforozid-7-ramnozid	0,20±0,01	0,18±0,01	0,15±0,02	0,14±0,01	0,18±0,01	0,21±0,01
Izoramnatin-3-rutinozid-7-glukozid	0,07±0,00	0,15±0,02	0,12±0,02	0,05±0,02	0,14±0,02	0,11±0,02
Kvercetin-3-soforozid-7-ramnozid	0,55±0,02	0,44±0,01	0,46±0,01	0,60±0,77	0,52±0,01	0,56±0,01
Kvercetin-3-ramnoglukozid-7-ramnozid	0,12±0,02	0,09±0,01	0,08±0,01	0,07±0,01	0,08±0,02	0,12±0,01
Kampferol-soforozid-ramnozid	0,34±0,00	0,43±0,01	0,27±0,02	0,13±0,01	0,02±0,00	0,34±0,01
Izoramnatin-3,7-diheksozid	0,28±0,01	0,30±0,00	0,26±0,03	0,14±0,00	0,26±0,01	0,34±0,01
Izoramnatin-3-rutinozid	1,41±0,01	1,99±0,00	1,73±0,06	0,84±0,01	2,18±0,02	2,06±0,02
Rutin	6,23±0,01	3,95±0,01	4,92±0,09	4,29±0,06	4,36±0,01	6,00±0,21
Kampferol-heksozid-ramnozid	0,23±0,02	0,18±0,00	0,13±0,02	0,19±0,01	0,16±0,01	0,23±0,03
Kampferol-3-rutinozid	0,26±0,02	0,13±0,02	0,18±0,01	0,63±0,01	0,21±0,01	0,25±0,01
Izoramnatin-3-heksozid	6,16±0,01	5,65±0,03	5,11±0,05	3,58±0,04	7,68±0,01	8,19±0,01
Kvercetin-3-glukozid	1,27±0,01	1,26±0,03	0,99±0,03	0,73±0,02	1,68±0,01	1,58±0,02
Izoramnatin-3-ramnozid	0,69±0,00	0,74±0,02	0,50±0,00	0,77±0,02	0,80±0,02	0,97±0,03
Kvercetin-3-ramnozid	0,32±0,01	0,16±0,01	0,22±0,01	0,13±0,01	0,19±0,02	0,18±0,01
Kvercetin-3-pentozid	0,09±0,01	0,02±0,00	0,05±0,02	0,06±0,01	0,06±0,02	0,18±0,02
Kampferol-ramnozid	0,30±0,02	0,20±0,00	0,09±0,02	0,26±0,02	0,23±0,02	0,05±0,01
Izoramnatin	0,12±0,01	0,24±0,04	0,12±0,02	0,10±0,01	0,18±0,01	0,16±0,02
Kamferol	0,34±0,01	0,27±0,01	0,35±0,04	0,31±0,02	0,33±0,01	0,64±0,02
FLAVAN-3-OLI						
Katehin	0,87±0,02	0,86±0,05	0,72±0,03	0,51±0,01	0,92±0,02	1,03±0,02
Epikatehin	0,91±0,02	0,79±0,06	0,75±0,02	0,56±0,16	0,87±0,01	0,94±0,02
FLAVONI						
Luteolin-7-O-glukozid	0,11±0,01	0,25±0,02	0,11±0,01	0,27±0,01	0,24±0,01	0,30±0,02
Luteolin	0,14±0,01	0,04±0,02	0,09±0,01	0,17±0,01	0,09±0,01	0,06±0,02
Apigenin	0,27±0,03	0,14±0,02	0,06±0,01	0,25±0,02	0,06±0,02	0,08±0,01

Tablica 11. Rezultati određivanja fenolnih spojeva (mg/100 g s. tv.) u ekstraktima pogače pasjeg trna sorte „Leikora“ (A) dobivenih primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom - nastavak

	Maseni udio (mg/100 g s.tv.)					
HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE						
Vanilinska kiselina	0,69±0,01	4,83±0,04	5,51±0,02	8,88±0,01	0,28±0,01	3,1±0,02
Heksozid elaginske kiseline	0,62±0,02	0,39±0,01	0,46±0,01	0,35±0,01	0,57±0,01	0,67±0,02
Galna kiselina	0,22±0,03	0,18±0,02	0,25±0,02	0,25±0,02	0,23±0,01	0,29±0,02
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	0,50±0,02	0,59±0,03	0,49±0,03	0,51±0,02	0,30±0,01	0,69±0,01
Siringinska kiselina	0,77±0,01	0,98±0,02	0,48±0,02	0,49±0,01	0,38±0,02	0,90±0,01
Protokatehinska kiselina	0,90±0,02	0,71±0,01	0,54±0,02	0,89±0,01	0,83±0,01	0,05±0,01
HIDROKSICIMETNE KISELINE						
Kava kiselina	6,26±0,03	5,75±0,01	1,12±0,02	2,73±0,02	5,49±0,02	5,64±0,02
Klorogenska kiselina	0,29±0,03	0,19±0,02	0,22±0,02	0,27±0,02	0,12±0,01	0,15±0,01
<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,80±0,03	3,89±0,03	0,29±0,03	3,72±0,01	7,51±0,01	5,54±0,01
Ferulinska kiselina	2,30±0,01	0,30±0,01	1,05±0,02	0,62±0,02	0,42±0,01	0,35±0,02
Ružmarinska kiselina	1,68±0,02	2,68±0,05	1,95±0,01	1,06±0,02	2,30±0,01	2,32±0,01
Cimetna kiselina	15,71±0,08	17,50±0,11	13,93±0,06	13,95±14, 12	16,23±1,10	20,87±0,0 2

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja±SD. A- pogača sorte A, frakcija 1- vodena otopina etanola (30 %, v/v), frakcija 2 - vodena otopina etanola (70 %, v/v); vrijeme trajanja ekstrakcije u minutama: 20, 30 i 40.

Tablica 12. Rezultati određivanja pojedinačnih fenolnih spojeva (mg/100 g s. tv.) u ekstraktima pogače pasjeg trna sorte „Ascola“ (B) dobivenih primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Fenolni spojevi	Maseni udio (mg/100g s.tv.)					
	B1 20	B1 30	B1 40	B2 20	B2 30	B2 40
FLAVONOLI						
Izoramnatin-3-sinapoilglukozid-glukoza-7-ramnozid	0,06±0,01	0,11±0,02	0,08±0,01	0,09±0,02	0,12±0,01	0,13±0,01
Izoramnatin-3-soforozid-7-ramnozid	0,12±0,02	0,17±0,21	0,11±0,01	0,20±0,02	0,26±0,05	0,18±0,01
Izoramnatin-3-rutinozid-7-glukozid	0,09±0,02	0,13±0,02	0,09±0,01	0,16±0,01	0,15±0,02	0,07±0,01
Kvercetin-3-soforozid-7-ramnozid	0,38±0,02	0,56±0,03	0,46±0,02	0,58±0,01	0,69±0,01	0,52±0,02
Kvercetin-3-ramnoglukozid-7-ramnozid	0,05±0,01	0,07±0,01	0,09±0,01	0,07±0,01	0,09±0,01	0,07±0,01
Kampferol-soforozid-ramnozid	0,17±0,01	0,23±0,01	0,10±0,01	0,02±0,01	0,29±0,02	0,03±0,01
Izoramnatin-3,7-diheksozid	0,19±0,01	0,27±0,01	0,22±0,02	0,34±0,01	0,33±0,01	0,27±0,03
Izoramnatin-3-rutinozid	1,05±0,02	1,69±0,02	1,12±0,03	1,56±0,02	1,73±0,02	1,63±0,01
Rutin	3,99±0,02	5,58±0,01	6,34±0,03	6,40±0,04	7,96±2080	5,71±0,01
Kampferol-heksozid-ramnozid	0,06±0,02	0,19±0,01	0,17±0,03	0,07±0,01	0,16±0,02	0,17±0,02
Kampferol-3-rutinozid	0,57±0,03	0,21±0,01	0,20±0,03	0,41±0,01	0,45±0,01	0,32±0,01
Izoramnatin-3-heksozid	6,04±0,03	0,21±0,01	6,61±0,04	11,90±0,09	12,05±0,06	9,88±0,14
Kvercetin-3-glukozid	1,12±0,03	1,72±0,01	1,37±0,01	2,45±0,08	2,40±0,05	2,18±0,02
Izoramnatin-3-ramnozid	0,43±0,02	0,68±0,02	0,51±0,03	0,67±0,04	0,76±0,01	0,69±0,03
Kvercetin-3-ramnozid	0,18±0,01	0,35±0,03	0,23±0,02	0,34±0,06	0,35±0,01	0,28±0,01
Kvercetin-3-pentozid	0,06±0,01	0,08±0,00	0,09±0,01	0,14±0,02	0,15±0,02	0,13±0,02
Kampferol-ramnozid	0,07±0,02	0,15±0,02	0,38±0,02	0,07±0,01	0,20±0,02	0,12±0,02
Izoramnatin	0,07±0,02	0,08±0,00	0,05±0,01	0,11±0,03	0,12±0,02	0,11±0,01
Kamferol	0,31±0,01	0,27±0,02	0,33±0,01	0,98±0,04	0,25±0,01	0,40±0,02
FLAVAN-3-OLI						
Katehin	0,30±0,01	0,44±0,01	0,41±0,01	0,79±0,01	0,87±0,01	0,56±0,02
Epikatehin	0,38±0,01	0,51±0,01	0,36±0,02	0,85±0,02	0,95±0,01	0,62±0,02
FLAVONI						
Luteolin-7-O-glukozid	0,19±0,02	0,25±0,01	0,22±0,01	0,14±0,01	0,15±0,02	0,32±0,01
Luteolin	0,08±0,01	0,04±0,02	0,10±0,01	0,06±0,02	0,13±0,02	0,10±0,02
Apigenin	0,12±0,01	0,12±0,03	0,09±0,01	0,05±0,01	0,14±0,01	0,06±0,02

Tablica 12. Rezultati određivanja pojedinačnih fenolnih spojeva (mg/100 g s. tv.) u ekstraktima pogače pasjeg trna sorte „*Ascola*“ (B) dobivenih primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom - *nastavak*

HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE						
Vanilinska kiselina	7,49±0,34	1,28±0,02	0,30±0,01	3,99±0,03	5,89±0,04	1,46±0,02
Heksozid elaginske kiseline	0,51±0,01	0,84±0,01	0,58±0,02	1,24±0,03	1,36±0,02	0,83±0,02
Galna kiselina	0,08±0,02	0,46±0,01	0,15±0,02	0,24±0,01	0,33±0,01	0,40±0,02
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	0,54±0,02	0,52±0,02	0,67±0,01	0,37±0,01	0,52±0,01	0,81±0,03
Siringinska kiselina	0,26±0,01	0,34±0,02	0,35±0,01	0,44±0,01	0,41±0,01	0,97±0,02
Protokatehinska kiselina	0,52±0,02	1,00±0,01	0,84±0,04	0,43±0,01	1,03±0,02	0,69±0,02
HIDROKSICIMETNE KISELINE						
Kava kiselina	6,26±0,01	1,86±0,01	0,40±0,01	5,73±0,03	6,53±0,03	3,82±0,04
Klorogenska kiselina	0,24	0,17±0,01	0,16±0,01	0,24±0,01	0,21±0,01	0,08±0,01
<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,37±0,01	1,81±0,02	0,16±0,01	0,51±0,01	3,14±0,03	6,60±0,05
Ferulinska kiselina	1,16±0,03	2,85±0,01	1,74±0,01	0,85±0,01	2,60±0,29	1,67±0,01
Ružmarinska kiselina	1,75±0,01	2,38±0,01	2,12±0,01	2,51±0,03	3,02±0,01	2,01±0,05
Cimetna kiselina	8,90±0,02	12,98±0,02	17,87±0,2 0	19,37±0,2 7	14,31±0,82	22,14±0,44

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja±SD. B- pogača sorta B, frakcija 1- vodena otopina etanola (30 %, v/v), frakcija 2 - vodena otopina etanola (70 %, v/v); vrijeme trajanja ekstrakcije: 20, 30 i 40 min.

Tablica 13. Rezultati ukupnih fenola (mg/100 g) pogače pasjeg trna sorte „Leikora“ (A) i „Ascola“ (B) dobivenih primjenom UAE

Maseni udio (mg/100 g)					
	U F-OL	U FLA-3-OL	UHBA	UHCA	UKUPNI FENOLI
A1 20	19,11±0,07	2,30±0,89	3,70±0,12	28,05±0,21	53,16
A1 30	16,48±0,11	2,08±0,86	7,67±0,07	30,31±0,04	56,54
A1 40	15,85±0,40	1,72±0,86	7,73±0,07	18,56±0,12	43,86
A2 20	13,08±1,06	1,77±0,27	11,38±0,04	22,36±14,09	48,59
A2 30	19,35±0,20	2,19±0,98	2,60±0,01	32,07±1,11	57,56
A2 40	22,25±0,19	2,40±1,08	5,70±0,07	34,87±0,06	65,22
B1 20	15,01±0,17	1,07±0,20	9,41±0,42	19,68±0,05	45,17
B1 30	12,75±0,18	1,36±0,38	4,44±0,05	22,05±0,01	40,6
B1 40	18,56±0,06	1,17±0,26	2,90±0,02	22,45±0,18	45,08
B2 20	26,57±0,35	1,89±0,98	6,72±0,09	29,21±0,36	64,39
B2 30	28,51±2,45	2,23±1,00	9,54±0,09	29,81±1,16	61,09
B2 40	22,89±0,41	1,65±0,49	5,15±0,08	36,32±0,59	66,01

U F-OL-ukupni flavonoli; U FLA-3-OL-ukupni flavanoli; UHBA- ukupne hidroksibenzojeve kiseline; UHCA- ukupne hidroksicimetne kiseline.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja±SD. A- pogača sorta A; B- pogača sorta B; frakcija 1- vodena otopina etanola (30 %, v/v), frakcija 2 - vodena otopina etanola (70 %, v/v); vrijeme trajanja ekstrakcije: 20, 30 i 40 min.

4.2.2. Rezultati određivanja askorbinske kiseline (vitamin C)

Na temelju dobivenih podataka maseni udio vitamina C ekstrakata pogače sorte A bio je u rasponu od 6,78 do 13,57 mg/100 g s. tv., a sorte B od 14,80 do 30,83 mg/100 g s. tv. (Tablica 14). Najviši maseni udio vitamina C određen je u sorti B kada se za ekstrakciju koristio 70 %-tni etanol pri vremenu trajanja ekstrakcije od 20 min. U plodovima kineske sorte pasjeg trna vitamin C bio je u rasponu od 56 do 3909 mg/100 g, a u plodovima „Askola“, „Hergo“ i „Leikora“ uzgojenim u Njemačkoj u rasponu od 180 do 370 mg/100 g (Zhenog i sur., 2011; Raffo i sur., 2004). U plodovima pasjeg trna uzgojenog u južnoj Švedskoj maseni udio vitamina C iznosio je 695 mg/100 g (Gao i sur., 2000). Na udio vitamina C utječu brojni parametri poput tipa prerade, temperature, svjetlosti i prisutnosti kisika (Vilas-Franquesa i sur., 2020). U analiziranim uzorcima pogače određeni su značajno niži udjeli vitamina C nego u plodovima zbog primjenjenih visokih temperatura kroz duže vrijeme tijekom Soxlet ekstrakcije.

Tablica 14. Rezultati UPLC-MS/MS metode određivanja askorbinske kiseline (mg/100 g s.

tv.) u ekstraktima pogače dvije sorte pasjeg trna „Leikora“ (A) i sorte „Ascola“ (B) dobivenih primjenom UAE

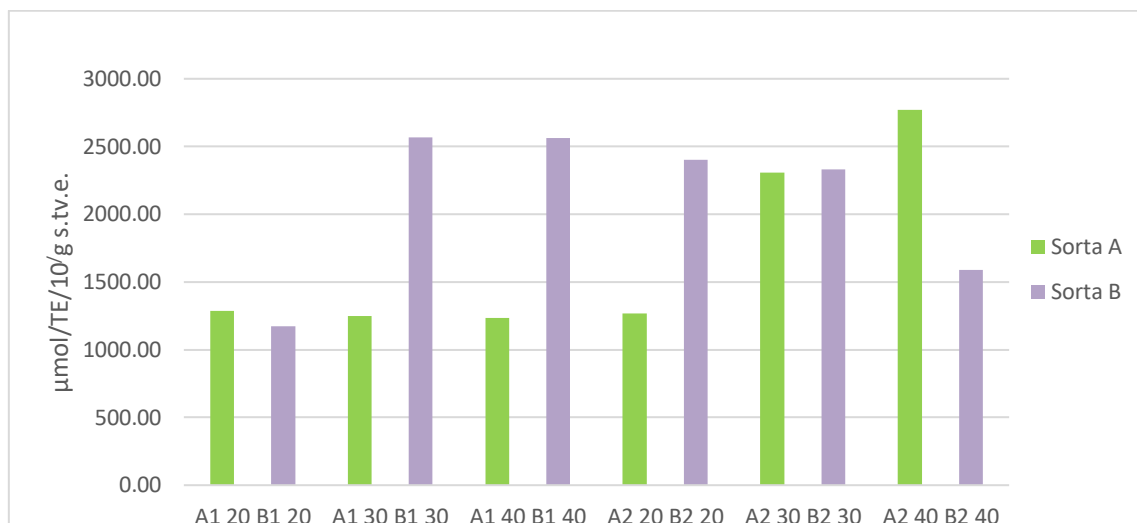
Vitamin C (mg/100 g s. tv.)	
A1 20	10,19±0,51
A1 30	9,96±0,16
A1 40	11,08±0,60
A2 20	6,78±0,13
A2 30	11,06±0,13
A2 40	13,57±0,62
B1 20	14,80±0,42
B1 30	17,62±0,88
B1 40	17,24±0,40
B2 20	30,83±1,79
B2 30	22,61±0,69
B2 40	28,21±1,08

* A- pogača sorta A; B- pogača sorta B; frakcija 1 – vodena otopina etanola (30 %, v/v), frakcija 2 – vodena otopina etanola (70 %, v/v); vrijeme trajanja ekstrakcije: 20, 30 i 40 min. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ±SD.

4.2.3. Rezultati određivanja antioksidativnog kapaciteta ORAC metodom

Na temelju dobivenih rezultata, antioksidacijski kapacitet (AK) sorte A kretao se u rasponu od 1233,38 do 2770,47 $\mu\text{mol}/\text{TE}/10$ g s.tv.e., a sorte B od 1174,56 do 2567,08 $\mu\text{mol}/\text{TE}/10$ g s.tv.e. (Slika 16).

Najviši AK određen je u ekstraktima pogače sorte A u 70 %-tnoj otopini etanola i vremenu trajanja ekstrakcije od 40 min. U istraživanju Rencendava i sur. (2018) utvrđeno je kako obje sorte „Leikora“ i „Ascola“ imaju vrlo visok AK, a sok plodova pasjeg trna imao je značajno manji AK i koncentraciju polifenola u odnosu na pogaču te su veći AK i koncentracije polifenola prisutni u sjemenkama. Kod sorte „Leikora“ detektirana je veća vrijednost AK, a kod sorte „Ascola“ veća koncentracija polifenola što sugerira kako AK nije u korelaciji sa sadržajem polifenola te dana AK osim fenolnih spojeva utječu i ostali bioaktivni spojevi prisutni u biljci. I druga istraživanja su utvrdila da na AK značajno utječu genotip, klimatski uvjeti uzgoja, vrijeme berbe, uvjeti skladištenja te izbor metode za određivanje AK te da je veći AK ekstrakata listova pasjeg trna nego plodova (Criste i sur., 2020; Bittová i sur., 2014).



Slika 16. Rezultati određivanja ORAC antioksidacijskog kapaciteta ($\mu\text{mol TE } 10^{-2} \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.e.}$) u ekstraktima pogače dvije sorte pasjeg trna „*Leikora*“ (A) i sorte „*Ascola*“ (B) dobivenih primjenom UAE

A- pogača sorta A; B- pogača sorta B, frakcija 1- vodena otopina etanola (30 %, v/v), frakcija 2- vodena otopina etanola (70 %, v/v); vrijeme trajanja ekstrakcije: 20, 30 i 40 min.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u okviru provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Viši maseni udjeli α tokoferola (275,63 mg/100 g ulja) i karotenoida (917,03 mg/100 g ulja) određeni su u ulju ploda sorte „Leikora“, a najzastupljeniji karotenoidi bili su lutein i zeaksantin te njihovi derivati. Također, ulje sorte „Leikora“ imalo je veći lipofilni antioksidacijski kapacitet (1676,9 $\mu\text{mol/TE}$ 100 g ulja) nego ulje sorte „Ascola“ (1122,1375 $\mu\text{mol/TE}$ 100 g ulja).
2. Najveća vrijednost ukupnih fenola određena je u ekstraktima pogače sorta „Ascola“ (66,02 mg/100 g), a antioksidacijski kapacitet u ekstraktima pogače sorte „Leikora“ (2770,47 $\mu\text{mol/TE/10 g s.tv. e.}$) ekstrahiranim u 70 %-tnom etanolu i vremenu trajanja ekstrakcije od 40 min.
3. Najzastupljenije grupe fenolnih spojeva u svim ekstraktima pogače bile su hidroksicimetne kiseline (36,32 mg/100 g s. tv.) i flavonoli (28,51 mg/100 g s. tv.), a veće vrijednosti su bile u ekstraktima pogače sorte „Ascola“. Najzastupljenije hidroksicimetne kiseline bile su cimetna, kava i *p*-kumarinska kiselina dok su najzastupljeniji flavonoli bili izoramnetin-3-heksozid i rutin.
4. Najveći maseni udio vitamina C određen je u pogači sorte „Ascola“ (30,83 mg/100 g s. tv.) kada se za ekstrakciju koristio 70 %-tni etanol pri vremenu trajanja ekstrakcije od 20 min.
5. Bolja učinkovitost ultrazvukom potpomognute ekstrakcije bioaktivnih spojeva pogače pasjeg trna postignuta je primjenom 70 % vodene otopine etanola i dužem vremenu trajanja ekstrakcije.

6. POPIS LITERATURE

Andersson SC, Olsson ME, Johansson E, Rumpunen K (2009) Carotenoids in Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries during ripening and use of pheophytin α as a maturity marker. *J Agric Food Chem* **57**, 250-258. doi: <https://doi.org/10.1021/jf802599f>

Andersson SC, Rumpunen K, Johansson E, Olsson ME (2008) Tocopherols and Tocotrienols in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries during Ripening. *J Agric Food Chem* **56**, doi: 10.1021/jf800734v

Bal LM, Meda V, Naik SN, Satya S (2011) Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmoceuticals. *Food Res Int* **44**, 1718-1727. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.002>

Ballabh B, Chaurasia OP (2007) Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh-used in treatment of cold, cough and fever. *J Ethnopharmacol* **112**, 341-349. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.020>

Basu M, Prasad R, Jayamurthy P, Pal K, Arumughan C, Sawhney RC (2007) Anti-atherogenic effects of seabuckthorn (*Hippophaea rhamnoides*) seed oil. *Phytomedicine* **14**, 770-777. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.03.018>

Bieł W, Jaroszewska A (2017) The nutritional value of leaves of selected berry species. *Sci Agr* **74**, 405-410. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0314>

Bittová M, Krejzová E, Roblová V, Kubáň P (2014) Monitoring of HPLC profiles of selected polyphenolic compounds in sea buckthorn (*Hippophae hamnoides* L.) plant parts during annual growth cycle and estimation of their antioxidant potential. **12**, 1152-1161. doi: <http://dx.doi.org/10.2478/s11532-014-0562-y>

Brnic I (2015) Utjecaj sorte i fenofaze na udio fenolnih spojeva u ekstraktima lišća *Vitis vinifera* L., Diplomski rad, Split, Kemijski-tehnološki fakultet

Carrera C, Ruiz-Rodriguez A, Palma M, Barroso CG (2012) Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta* **732**, 100-104. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>

Cenkowski S, Yakimishen R, Przybylski R, Muir WE (2006) Quality of extracted sea buckthorn seed and pulp oil. *Can Biosyst Eng* **48**, 39-316. - https://www.researchgate.net/publication/228643585_Quality_of_extracted_sea_buckthorn_seed_and_pulp_oil Pristupljeno 16.07.2021 > Pristupljeno 12.09.2021.

Champagne A (2021) LC-MS/MS: What is it? Why use it? Materials analysis. <https://www.mccrone.com/mm/lc-msms-chemical-analysis/> > Pristupljeno 01.09.2021.

Chauhan S, Varshneya C (2012) The Profile of Bioactive Compounds in Seabuckthorn: Berries and Seed oil. *Int. J. Theor. App Sci* **4**, 216-220.

Ciesarová Z, Murkovic M, Cejpek K, Kreps F, Tobolková B, Koplík R, i sur. (2020) Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) so exceptional? A review. *Food Res Int* **133**, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109170>

Conde E, Mourc A, Dominguez H, Parajó JC (2013) Extraction of natural antioxidants from plant foods, (Ured. Syed S H Rizvi), In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries, Woodhead Publishing, 506-594. doi: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857090751.2.506>

Cossuta D, Simándi B, Hohmann J, Doleschall F, Keve T (2007) Supercritical carbon dioxide extraction of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) pomace. *J Sci Food Agric* **87**, 2472-2481. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2996>

Criste A, Urcan AC, Bunea A, Pripon Furtuna F R, Olah NK, Madden RH, Corcionivoschi N (2020) Phytochemical Composition and Biological Activity of Berries and Leaves from Four Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Varieties. *Molecules* **25**, 1170. doi: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fmolecules25051170>

Dog TL (2009) Smart Talk on Supplements and Botanicals: Exotic Fruits-Acai, Noni, Mangosteen, Sea buckthorn, and Goji. *Altern Complem Ther* **15**, 166-168. doi: <http://dx.doi.org/10.1089/act.2009.15407>

Dong MW (2006) Modern HPLC for practicing scientists. WileyInterscience, Hoboken, N.J. .doi: <https://doi.org/10.1002/0471973106.ch4>

Dzah CS, Duan Y, Zhang H (2020) The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Biosci* **35**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>

Fatima T, Kesari V, Watt I, Wishart D, Todd JF, Schroeder WR, Paliyath G, 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.) *Phytochemistry* **118**, 181-191. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.08.008>

Ficzek G, Mátravölgyi G, Furulyás D, Rentsendavaa C, Jócsák I, Papp D, Simon G, Végvári G, Stéger-Máté M (2019) Analysis of bioactive compounds of three sea buckthorn cultivars (*Hippophaë rhamnoides* L. ‘Askola’, ‘Leikora’, and ‘Orangeveja’) with HPLC and spectrophotometric methods. *Eur J Hortic Sci* **84**, 31-38. doi: [10.17660/eJHS.2019/84.1.5](https://doi.org/10.17660/eJHS.2019/84.1.5)

Franjić J, Horvat G, Krstonošić D (2016) Novo nalazište i sintaksonomske značajke pasjega trna (*Hippophaë rhamnoides* L., Elaeagnaceae) u Hrvatskoj. *Šumarski list* **140**, 111-115. doi: <https://doi.org/10.31298/sl.140.3-4.1>

Fu L, Su H, Li R, Cui Y (2014) Harvesting technologies for sea buckthorn fruit. *Eng Agric Environ Food* **7**, 64-69. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eaef.2013.10.002>

Gao X, Ohlander M, Jeppsson N, Björk L, Trajkovski V (2000) Changes in Antioxidant Effects and Their Relationship to Phytonutrients in Fruits of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during Maturation. *J Agr Food Chem* **48**, 1485-1490. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/jf991072g>

Garofulić IE, Zorić Z, Pedisić S, Brnčić M, Dragović Uzelac V (2018) UPLC-MS2 Profiling of Blackthorn Flower Polyphenols Isolated by Ultrasound-Assisted Extraction. *J Food Sci* **83**, 2782-2789. doi: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14368>

Generalić E (2021) Soxhlet aparatura. <<https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=Soxhletov+ekstraktor> >Pristupljeno 20.08.2021.

Giuffrida D, Pinteá A, Dugo P, Torre G, Pop RM, Mondello L (2012) Determination of carotenoids and their esters in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) by HPLC-DAD-APCI-MS. *Phytochem Anal* **23**, 267-273. doi: <https://doi.org/10.1002/pca.1353>

Glazer AN (1990) Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol* **186**, 161-168. doi: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86106-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86106-6)

Gorbatsova J, Lougas T, Vokk R, Kalijurand M (2007) Comparison of the contents of various antioxidants of sea buckthorn berries using CE. *Electrophoresis* **28**, 4136-4142. doi: <https://doi.org/10.1002/elps.200700362>

Guo R, Guo X, Li T, Fu X, Liu RH (2016) Comparative assessment of phytochemical profiles, antioxidant and antiproliferative activities of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries. *Food Chem* **15**, 997-1003. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.063>

Hajazimi E, Landberg R, Zamaratskaia G (2016) Simultaneous determination of flavonols and phenolic acids by HPLC-CoulArray in berries common in the Nordic diet. *LWT-Food Sci Technol* **74**, 128-134. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.034>

Hosseinián F, Li W, Hydamaka AW, Tsopmo A, Lowry L, Friel J, Beta T (2007) Proanthocyanidin profile and ORAC Values of Manitoba Berries, Chokecherries, and Seabuckthorn. *J Agric Food Chem* **22**, 6970-6976. doi: <https://doi.org/10.1021/jf071163a>

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=61608> > Pristupljeno 4. 10. 2021.

Hunter SC, Cahoon EB (2007) Enhancing Vitamin E in Oilseeds: unraveling tocopherol and tocotrienol biosynthesis. *Lipids* **42**, 97-108. doi: <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3028-6>

Ignat I, Volf I, Popa VI (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* **126**, 1821-1835. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>

Ivanova GV, Nikulina OY, Koloman and Ivanova AN (2019) Products of sea-buckthorn berries processing in parapharmaceutical production. IOP Conf. Ser: Earth Environ.Sci.315.<http://elib.sfnur.ru/bitstream/handle/2311/128857/ivanova_2019_iop_conf._ser._earth_envirion._sci._315_0520201_0.pdf?sequence > Pristupljeno 13.12.2021.

Jaswir I, Noviendri D, Hasrini Fitri R, Octavianti F (2011) Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry <https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-several-selected-carotenoids-Jaswir-and-Noviyendri-2010_fig2_266354461 > Pristupljeno 20.04.2022.

Ji M, Gong X, Li X, Wang C, Li M (2020) Advanced Research on the Antioxidant Activity and Mechanism of Polyphenols from Hippophae Species - A Review. *Molecules* **25**, doi: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25040917>

Jiang H, Yamashita Y, Nakamura A, Croft K (2019) Quercetin and its metabolite isorhamnetin promote glucose uptake through different signalling pathways in myotubes. doi: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-38711-7>

Jimenez-Lopez C, Pereira AG, Lourenco-Lopes C, Garcia-Oliveira P, Cassani L, Fraga-Corral M, Prieto MA, Simal-Gandara J (2021) Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. 341. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128262>

Kaurinovic B, Vastag D (2019) Flavonoids and Phenolic Acids as Potential Natural Antioxidants. Shalaby E (ured.), Antioxidants, IntechOpen, London. <<https://www.intechopen.com/chapters/65331>> Pristupljeno 13.11.2021.

Kawthar Muhammad (2019) What is Sea Buckthorn <<https://www.coupdecoiff.com/beauty-in-the-kitchen/2019/7/8/what-is-sea-buckthorn>> Pristupljeno 20.04.2022.

Khan BA, Akhtar N, Mahmood T (2010) A comprehensive review of a magic plant, Hippophae rhamnoides. *J Pharmacogn* **2**, 65-68. doi: [https://doi.org/10.1016/S0975-3575\(10\)80053-7](https://doi.org/10.1016/S0975-3575(10)80053-7)

Korekar G, Dolkar P, Singh H, Srivastava RB, Stobdan T (2013) Genotypic and morphometric effect on fruit oil content in seventeen natural population of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) from trans-Himalaya. *Nat Acad Sci Lett* **36**, 603-607. doi: <https://doi.org/10.1007/s40009-013-0176-5>

Kumar R, Phani Kumar G, Chaurasia OP, Singh SB (2011) Phytochemical and Pharmacological Profile of Seabuckthorn Oil: A review. *Res J Med Plant* **5**, 491-499. doi: <https://dx.doi.org/10.3923/rjmp.2011.491.499>

Larmo PS, Järvinen RL, Yang B, Kallio HP (2014) Sea Buckthorn, Dry Eye, and Vision. U: Preedy VR, ured. Handbook of Nutrition, Diet and the Eye, Academic Press; Oxford, UK, 473-380.

Li TSC, Beveridge THJ (2003) Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) : production and utilization. NRC Research Press; Ottawa, Canada.

Li Thomas & Beveridge, Thomas & Drover John (2007). Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification. *Food Chem* **101**. 1633-1639. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.033>

Liu Y, Tikunov Y, Schouten R E, Marcelis L, Visser R, & Bovy A (2018) Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review. *Front Chem* **6**, 52. doi: <https://dx.doi.org/10.3389/fchem.2018.00052>

Naczk M, Shahidi F (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr* **1054**, 95-111. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01409-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01409-8)

Niki E, Abe K (2019) Vitamin E: Structure, Properties and Functions. U: Niki E (ured.) Vitamin E: Chemistry and Nutritional Benefits, The Royal Society of Chemistry, London, str. 1-8. doi: <https://doi.org/10.1039/9781788016216-00001>

Nollet LML, Gutierrez-Urbe JA (2018) Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis U: Flavonoids, (Durazzo A, ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 172-184.

Olas B (2018) The beneficial health aspects of sea buckthorn (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) oil. *J Etnofarmakol* **213**, 183-190. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.022>

Pinelo M, Rubilar M, Sineiro J, Nunez M (2005) A thermal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: catechin, resveratrol and grape extract cases. *Eur Food Res Technol* **221**, 284-290. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-005-1159-7>

Pitt JJ (2009) Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin. Biochem. Rev.* **30**, 19-34. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643089/>> Pristupljeno 01.09.2021.

Pop E, Diaconeasa Z, Fetea F, Bunea A, Dulf F, Pinteana A, & Socaciu C (2015) Carotenoids, tocopherols and antioxidant activity of lipophilic extracts from sea buckthorn berries (*Hippophae rhamnoides*), Apricot pulp and apricot kernel (*Prunus armeniaca*). *Food Sci Technol* **72**, 169-176. doi: <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:11425>

Pop RM, Weesepeel Y, Socaciu C, Pinteana A, Vinicken JP, Gruppen H (2014) Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chem* **147**, 1-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.083>

Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem* **53**, 4290-4302. doi: <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

Rafalska A, Abramowicz K, Krauze M (2017) Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) as a plant for universal application. *World Scientific News* **72**, 123-140. <<http://www.worldscientificnews.com/wp-content/uploads/2017/01/WSN-72-2017-123-140.pdf>> Pristupljeno 14.08.2021.

Raffo A, Paoletti F, Antonelli M (2004) Changes in sugar, organic acid, flavonol and carotenoid composition during ripening of berries of three seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) cultivars. *Eur F Res Technol* **219**, 360-368. doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-004-0984-4>

Rajchal R (2009) Seabuckthorn (*Hippophae salicifolia*) Management Guide. Nepal: The Rufford Small Grants Foundation, str. 1-38.

Ranjith A, Kumar Sarin K, Venugopalan VV, Arumughan C, Sawhney RC, Singh V (2006) Fatty acids, tocopherols and carotenoids in pulp oil of three sea buckthorn species (*Hippophae rhamnoides*, *H. salicifolia* and *H. tibetana*) grown in the Indian Himalayas. *J Americ Oil Chem Soc* **83**, 359-364. doi: <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1213-z>

Raso J, Manas P, Pagan R, Sala FJ (1999) Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrason Sonochem* **5**, 157-162.

Ren R, Li N, Su C, Wang Y, Zhao X, 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**, doi: <http://dx.doi.org/10.1039/D0RA06488B>

Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* **22**, 375-383. doi: <https://doi.org/10.3109/10715769509145649>

Ruan C, Li D (2002) Community characteristics of Hippophae rhamnoides forest and water and nutrient condition of the woodland in Loess Hilly Region. *Chin J App Eco* **13**, 1061-1064.

Sahne F, Mohammadi M, Najafpour GD, Moghadamnia AA (2016) Extraction of bioactive compound curcumin from turmeric (*Curcuma longa* L.) via different routes: a comparative study. *Pakistan J Biotechnol* **13**, 173-180.

Sharma A, Sharma P, Sing Tuli H, Sharma AK (2018) Phytochemical and Pharmacological Properties of Flavonols. *23*, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0027666>

Spanos G A, Wrolstad R E, Heatherbvell D A (1990) Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. *J Agric Food Chem* **38**, 1572-1579. doi: <https://doi.org/10.1021/jf00097a031>

Stalikas DS (2007) Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* **30**, 3268-3295. doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>

Stobodan T, Chaurasia OP, Korekar G, Mundra S, Ali Z, Yadav A, Singh SB. (2010) Attributes of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) to meet nutritional requirements in high altitude. *Defence Sci J* **60**, 226-230. doi: <https://doi.org/10.14429/dsj.60.344>

Suryakumar G, Gupta A (2011) Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J Ethnopharmacol* **138**, 268-278. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.024>

Teleszko M, Wojdylo A, Rudzinskam M, Oszmianski, J, Golis T (2015) Analysis of lipophilic and hydrophilic bioactive compounds content in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries. *J Agr Food Chem* **63**, 4120-4129. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00564>

Terechuk L, Starovoytova K, Ivanova S, & Sergeeva I (2019). Obtaining Functional Products from Sea Buckthorn Berries. *Proceedings of the 2nd International Conference on Education Science and Social Development (ESSD 2019)*. doi: <https://doi.org/10.2991/ESSD-19.2019.90>

Tkacz K, Wojdylo A, Turkiewicz IP, Ferreres F, Moreno DA, Nowicka P (2020) UPLC-PDA-Q/TOF-MS profiling of phenolic and carotenoid compounds and their influence on anticholinergic potential for AchE and BuChE inhibition and on-line antioxidant activity of selected Hippophae rhamnoides L. cultivars. *Food Chem* **309**, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125766>

Ursache FM, Ghinea IO, Turturica M, Apodu I, Rapeanu G, Stanciuc N (2017) Phytochemicals content and antioxidant properties of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) as affected by heat treatment-quantitative spectroscopic and kinetic approaches. *Food Chem* **233**, 442-449. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.107>

Vilas-Franquesa A, Saldo J & Juan B (2020) Potential of sea buckthorn-based ingredients for the food and feed industry – a review. *Food Prod Process and Nutr* **2**, 17. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s43014-020-00032-y>

Vinay K, Madhuri M, Chandresh V (2012) Antioxidant potential and total phenolic contents of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) pomace. *Free Radicals and Antioxidants* **2**, 79-86. doi: <https://doi.org/10.5530/ax.2012.4.14>

Wang Y, Huang F, Zhao L, Zhang D, Wang O, Guo X, Lu F, Yang X, Ji B, Deng Q (2016) Protective effect of total flavones from *Hippophae rhamnoides* L. against visible light induced retinal degeneration in pigmented rabbits. *J Agric Food Chem* **54**, 161-170- doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04874>

Weller P, Breithaupt DE (2003) Identification and quantification of zeaxanthin esters in plants using liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **51**, 7044-7049. doi: <https://doi.org/10.1021/jf034803s>

Xiao-Hua L, Ling-Xue K, Hong-Zhang L (2007) Advances on effective compositions of seabuckthorn. *J Jilin Agric Univ* **29**, 162-167.

Xiuzhen H, Tao S, Hongxiang L (2007) Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int. J Mol Sci* **8**, doi: <http://dx.doi.org/10.3390/i8090950>

Yang B, Kallio HP (2001) Fatty Acid Composition of Lipids in Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) Berries of Different Origins. *J Agr Food Chem* **49**, 1939-1947. doi: <https://doi.org/10.1021/jf001059s>

Yang B, Kallio H (2002) Effects of harvesting time on triacylglycerols and glycerophospholipids of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different origins. *J Food Compos Anal* **15**, 143-157. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/jfca.2001.1041>

Yogendra Kumar MS, Tirpude RJ, Maheshwari DT, Bansal A, Misra K (2013) Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves in vitro. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.057>

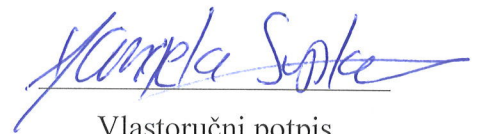
Zadernowski R, Naczek M, Amarowicz R (2003) Tocopherols in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berry oil. **80**, 55-58. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-003-0650-z>

Zeb A (2004) Important therapeutic uses of sea buckthorn (*Hippophae*): A review. *J Biol Sci* **4**, doi: <https://dx.doi.org/10.3923/jbs.2004.687.693>

Zielinska A, Nowak I (2017) Abundance of active ingredients in sea buckthorn oil. *Lipids Health Dis* **19**, 95. doi: <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0469-7>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja DANIJELA SUŠILOVIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis