

# Izolacija bioaktivnih spojeva lista pasjeg trna primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima

---

**Pufek, Paula**

**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:159:524278>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-04**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Paula Pufek

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH  
SPOJEVA LISTA PASJEG TRNA  
PRIMJENOM UBRZANE  
EKSTRAKCIJE OTAPALIMA**

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



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



## ZAHVALA

*Iskreno se zahvaljujem svojoj dragoj mentorici doc.dr.sc. Maji Repajić na uloženom trudu i vremenu, suradnji, susretljivosti, te na stručnim i prijateljskim savjetima. Hvala na ukazanom povjerenju i vodstvu, kako tijekom izrade završnog, tako i ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem doktorandici Eni Cegledi i kolegici Ines Staroveški na ugodnoj atmosferi i zajedničkom radu u laboratoriju.*

*Od srca hvala i mojoj obitelji i prijateljima na potpori i podršci tijekom cijelog studija*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

### IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA LISTA PASJEG TRNA PRIMJENOM UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA

*Paula Pufek, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210252*

**Sažetak:** Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj temperature (80, 100 i 120 °C), statičkog vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 min) te broja ciklusa (1, 2 i 3) tijekom ubrzane ekstrakcije otapalima na izolaciju fenolnih spojeva i pigmenta iz lista pasjeg trna. U dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski je određen udio ukupnih fenola, klorofila *a* i *b*, ukupnih klorofila te antioksidacijski kapacitet. Udio ukupnih fenola određen je u rasponu 69,05-112,96 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t., udio ukupnih klorofila 0,58-2,36 mg g<sup>-1</sup> s.t., udio klorofila *a* 0,21-0,76 mg g<sup>-1</sup> s.t., udio klorofila *b* 0,21-2,11 mg g<sup>-1</sup> s.t., dok je antioksidacijski kapacitet određen u rasponu 766,72-1182,02 μmol TE g<sup>-1</sup> s.t. Najviši udio ukupnih fenola dobiven je pri 120 °C/10 min/3 ciklusa, najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta pri 120 °C/15 min/3 ciklusa, a najviši udio ukupnih klorofila pri 80 °C/10 min/2 ciklusa.

**Ključne riječi:** *pasji trn, ASE, ukupni fenoli, klorofili, antioksidacijski kapacitet*

**Rad sadrži:** 45 stranica, 13 slika, 3 tablice, 56 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *doc.dr.sc. Maja Repajić*

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

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

**Datum obrane:** 23. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF SEA BUCKTHORN LEAF USING ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION

*Paula Pufek, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058210252*

**Abstract:** The aim of this research was to examine the influence of temperature (80, 100 and 120 °C), static extraction time (5, 10 and 15 min) and cycle number (1, 2 and 3) during accelerated solvent extraction on the isolation of phenolic compounds and pigments from the sea buckthorn leaf. Obtained extracts were spectrophotometrically analyzed for the content of total phenols, chlorophyll *a* and *b*, total chlorophylls and antioxidant capacity. The content of total phenols was in range 69.05-112.96 mg GAE g<sup>-1</sup> dm, total chlorophylls 0.58-2.36 mg g<sup>-1</sup> dm, chlorophyll *a* 0.21-0.76 mg g<sup>-1</sup> dm, chlorophyll *b* 0.21-2.11 mg g<sup>-1</sup> dm, while antioxidant capacity was in range 766.72-1182.02 μmol TE g<sup>-1</sup> dm. The highest yield of total phenols was obtained at 120 °C/10 min/3 cycles, the highest value of antioxidant capacity was achieved at 120 °C/15 min/3 cycles, and the highest total chlorophylls were obtained at 80 °C/10 min/2 cycles.

**Keywords:** *sea buckthorn, ASE, total phenols, chlorophylls, antioxidant capacity*

**Thesis contains:** 45 pages, 13 figures, 3 tables, 56 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *Maja Repajić, PhD, Assistant professor*

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

**Reviewers:**

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

**Thesis defended:** September 23<sup>th</sup>, 2022



## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. PASJI TRN</b> .....	2
<b>2.2. KEMIJSKI SASTAV LISTA PASJEG TRNA</b> .....	5
<b>2.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI LISTA PASJEG TRNA</b> .....	6
2.3.1. Fenolni spojevi .....	6
2.3.2. Pigmenti .....	7
2.3.3. Ostali bioaktivni spojevi.....	8
<b>2.4. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA</b> .....	9
2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima .....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	14
<b>3.1. MATERIJAL</b> .....	14
3.1.1. List pasjeg trna .....	14
3.1.2. Kemikalije i standardi .....	14
3.1.3. Aparatura i pribor .....	16
<b>3.2. METODE</b> .....	18
3.2.1. ASE .....	18
3.2.2. Određivanje suhe tvari .....	20
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola .....	20
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje biljnih pigmenata .....	21
3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom.....	22
3.2.6. Obrada podataka.....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	25
<b>4.1. UDIO UKUPNIH FENOLA</b> .....	25
<b>4.2. UDIO KLOROFILA</b> .....	27
<b>4.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET</b> .....	30
<b>4.4. UTJECAJ UVJETA ASE NA UDIO UKUPNIH FENOLA I KLOROFILA TE ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET</b> .....	33
4.4.1. Utjecaj uvjeta ASE na udio ukupnih fenola .....	34
4.4.2. Utjecaj uvjeta ASE na udio ukupnih klorofila .....	35
4.4.3. Utjecaj uvjeta ASE na antioksidacijski kapacitet.....	36
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	39
<b>6. LITERATURA</b> .....	40

## 1. UVOD

Pasji trn (*Hippophae rhamnoides* L.) vrijedna je i jedinstvena biljka prirodno rasprostranjena u sjevernoj i srednjoj Europi te zapadnoj i srednjoj Aziji, no danas se udomaćila u raznim dijelovima svijeta. Biološki aktivni sastojci koji se nalaze u različitim dijelovima biljke imaju mnogo pozitivnih učinaka na zdravlje poput antioksidativnog, kardioprotektivnog, antidijabetičkog, hepatoprotektivnog, antikancerogenog, antivirusnog, antibakterijskog, imunomodulatornog i protuupalnog djelovanja. Iz tog razloga biljka dobiva sve više pažnje te se zbog njezinog potencijala na njoj provodi sve više znanstvenih istraživanja.

List pasjeg trna predstavlja bogat izvor polifenola, karotenoida, sterola, vitamina, minerala, raznih antioksidanasa i mnogih drugih spojeva, no obzirom na genotip, spol biljke, klimatsku zonu i uvjete uzgoja, vrijeme berbe, rukovanje biljkom nakon berbe i metodu ekstrakcije njegov kemijski sastav može varirati. Biološki aktivni sastojci iz lista pasjeg trna mogu se izolirati različitim tehnikama ekstrakcije poput konvencionalnih (destilacija, maceracija, perkolacija, Soxhlet ekstrakcija i hladno prešanje) i naprednih (ekstrakcija superkričnim fluidima, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ubrzana ekstrakcija otapalima).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj uvjeta ubrzane ekstrakcije otapalima, temperature (80, 100 i 120 °C), statičkog vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 min) te broja ciklusa ekstrakcije (1, 2 i 3 ciklusa) na izolaciju fenolnih spojeva i pigmenata iz lista pasjeg trna. Pritom se kao otapalo koristio 70 %-tni etanol. U dobivenim ekstraktima određivan je maseni udio ukupnih fenola, klorofila *a* i *b*, ukupnih klorofila te antioksidacijski kapacitet FRAP metodom.

## 2. TEORIJSKI DIO

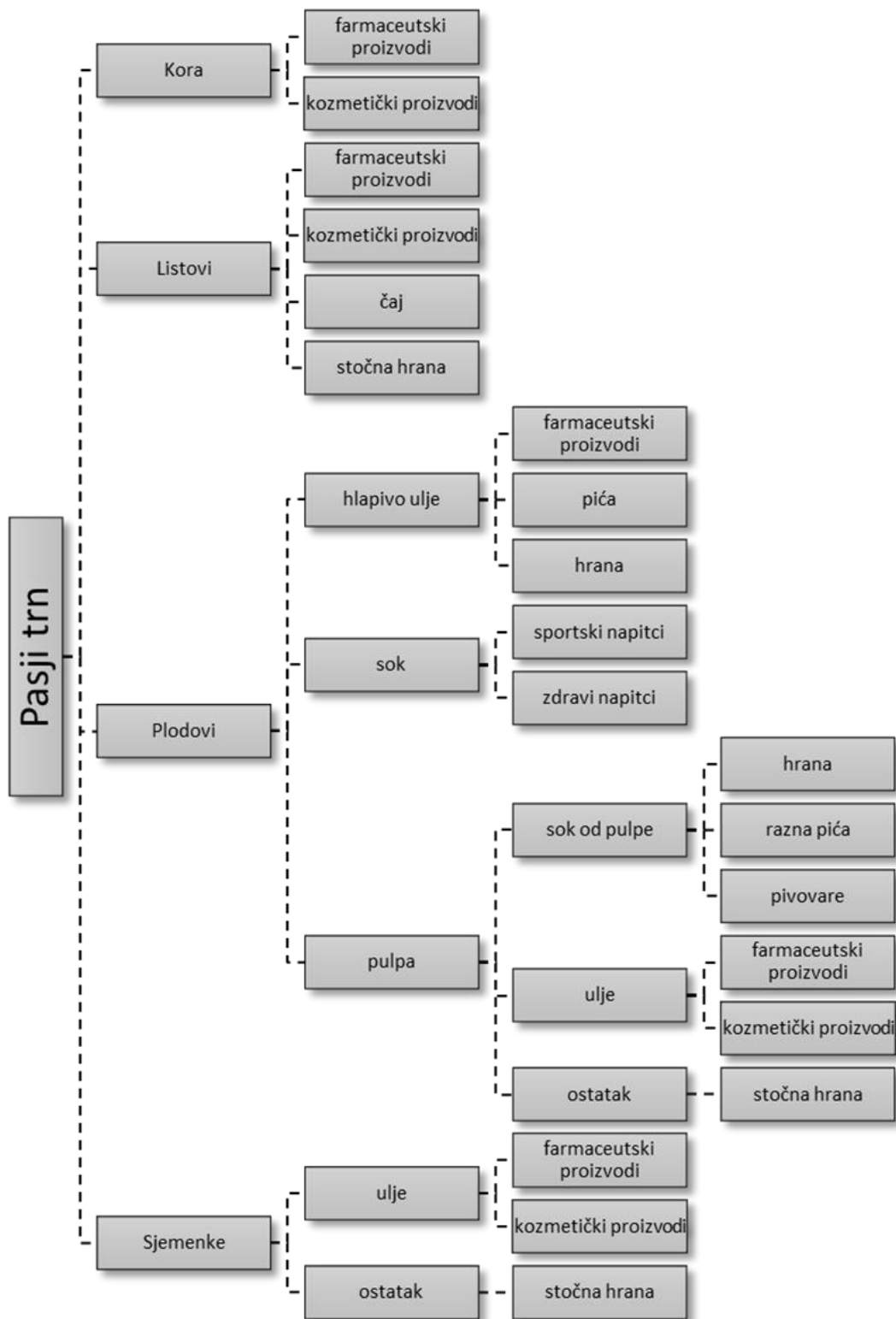
### 2.1. PASJI TRN

Pasji trn razgranat je listopadni grm ili niže stablo koje pripada obitelji zlolesina (Elaeagnaceae) te doseže visinu do 6 m (slika 1). Jednogodišnje grane prekrivene su srebrnastosivim dlakama, starije grane su gole i crvenosmeđe boje, dok se postrani ogranci mogu razviti u snažne trnove. Srebrnastosivi listovi dugi su 5-7 cm, linearni su i suličasti, cjelovitog ruba, prekriveni zvjezdastim dlakama, s otprilike 5 mm dugom peteljkom te se izmjenično nižu uzduž grane. Sitni cvjetovi pasjeg trna veličine su do 3 mm, dvodomni su, razvijaju se na prošlogodišnjim ograncima, cvatu prije listanja ili istodobno, a ocvjeće je neugledno, u obliku dvolapne čaške. Muški cvjetovi sastoje se od 4 prašnika, a ženski su pojedinačni s nadraslom jednogradnom plodnicom i jednim sjemenim zametkom. Plod čini 7-8 mm duga narančastocrvena sočna boba gdje čvrsti endokarp obavija samo jednu sjemenku (Nikolić i Topić, 2005). Snažan korijenski sustav ove biljke, koji provodi biljci neophodnu fiksaciju dušika, veoma se lako razvija pa je stoga biljka pogodna za sadnju u degradiranim tlima. Osim toga razgranati korijen djeluje i preventivno na eroziju tla (Raudone i sur., 2021).



**Slika 1.** Pasji trn (*vlastita fotografija*)

Ova biljna vrsta veoma dobro podnosi različite okolišne uvjete, samoniklo raste u planinskim regijama te je naročito otporna na višu slanost tla, zbog čega se smatra pionirskom biljkom (Cossuta i sur., 2007). Otpornost na sušu i podnošenje velikog raspona temperature također su neke od povoljnih prilagodbi pasjeg trna (Raudone i sur., 2021). Prirodno je rasprostranjena u sjevernoj i srednjoj Europi te zapadnoj i srednjoj Aziji. Uvjeti koje preferira pasji trn jesu topla i sunčana mjesta, šume u kojima ima dovoljno sunčevog svjetla, ali i sjenoviti obronci te šljunčana i pješčana mjesta. Biljku karakterizira vegetativno i generativno, odnosno endoornitohorno rasprostranjivanje. Vegetativno rasprostranjivanje znači da se izbojci doneseni riječnim bujicama mogu ukorijeniti i razviti u samostalnu biljku, dok drugi pojam označava rasprostranjivanje sjemenkama koje raznose ptice (Franjić i sur., 2016). Bogat sadržaj prisutnih različitih biološki aktivnih molekula osigurava pasjem trnu već više od tisućljeća kategorizaciju kao ljekovita biljka u Tibetu, Mongoliji i Kini. U Kini i bivšem Sovjetskom Savezu već su od 1950-ih mnogi ljekoviti pripravci ove biljke (samonikle ili kultivirane) korišteni u liječenju opekline, rana, oralnih upala, čira na želucu i rana koje su nastale kao posljedica zračenja (Cossuta i sur., 2007). U staroj Grčkoj lišće pasjeg trna se u svrhu debljanja i sjajnije kose dodavalo u stočnu hranu za konje odakle i dolazi naziv hippophaë, što na latinskom znači konjski sjaj (Thomas i Schroeder, 1996). S obzirom na prethodno dokazana antioksidacijska, antikancerogena, antistresna, antidijabetička, antiaterosklerotička, antimikrobna, imunomodulacijska, hepato-, kardio-, neuro-, cito- i radioprotektivna svojstva interes za ovu biljnu vrstu i njezin sastav u stalnom je porastu. Pasji trn vrijedna je sirovina u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, dok u prehrambenoj industriji kao sastojak hrane još uvijek nije posve iskorišten njegov veliki potencijal. Kao oblik komercijalne prerađevine nalazimo ga u raznim pićima, konzervama, džemovima, želeima, prašcima, sirupima, čajevima, pivu, vinima i eteričnim uljima, međutim spomenuti proizvodi češće su dostupni na lokalnim nego na globalnim tržištima (Tkacz i sur., 2022). Slika 2 prikazuje proizvode koji se mogu dobiti od pojedinih dijelova ove biljke.



**Slika 2.** Proizvodi koji se dobivaju od pojedinih dijelova biljke pasjeg trna (prema Thomas i Schroeder, 1996)

## 2.2. KEMIJSKI SASTAV LISTA PASJEG TRNA

Kemijski sastav pasjeg trna promjenjiv je s obzirom na genotip, spol biljke, klimatsku zonu područja gdje se biljka uzgaja, uvjetima uzgoja, vremenu berbe, rukovanju biljkom nakon berbe te s obzirom na primijenjenu metodu ekstrakcije (Raudone i sur., 2021). Niz kemijskih spojeva koje sadrži pasji trn, ne samo da su zanimljivi s kemijskog gledišta, nego mnogi od njih posjeduju biološki i terapijski učinak. Antioksidativna, antitumorska, hepatoprotektivna i imunomodulacijska svojstva samo su neka od mnogih povoljnih svojstava ove biljke. Pasji trn sadrži velike količine mineralnih tvari (Ozturk i sur., 2018). Yang i Kallio (2001) navode da se sadržaj željeza može se kretati u rasponu od 22 do 282 mg kg<sup>-1</sup>, dok su Stobdan i sur. (2010) u pulpi biljke koja raste u dolini Leh u Trans-Himalaji odredili 647,2 mg L<sup>-1</sup> kalija, 176,6 mg L<sup>-1</sup> kalcija, 30,9 mg L<sup>-1</sup> željeza, 22,5 mg L<sup>-1</sup> magnezija, 84,2 mg L<sup>-1</sup> fosfora, 414,2 mg L<sup>-1</sup> natrija, 1,4 mg L<sup>-1</sup> cinka, 0,7 mg L<sup>-1</sup> bakra, 1,06 mg L<sup>-1</sup> mangana i 0,53 mg L<sup>-1</sup> selen. U istom istraživanju određene su i sljedeće količine raznih vitamina: vitamin C (275 mg 100 g<sup>-1</sup>), vitamin A (432,4 IU 100 g<sup>-1</sup>), vitamin E (3,54 mg 100 g<sup>-1</sup>), riboflavin (1,45 mg 100 g<sup>-1</sup>), niacin (68,4 mg 100 g<sup>-1</sup>), pantotenska kiselina (0,85 µg 100 g<sup>-1</sup>), vitamin B6 (1,12 mg 100 g<sup>-1</sup>) i vitamin B2 (5,4 µg 100 g<sup>-1</sup>) (Stobdan i sur., 2010).

Sami listovi izvor su mnogih hranjivih i bioaktivnih tvari kao što su flavonoidi, karotenoidi, slobodni i esterificirani steroli, triterpeni i izoprenoli. Flavonoli, leukoantocijanidini, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin i galna kiselina neki su od polifenolnih spojeva zastupljenih u listu pasjeg trna. Fenolni spojevi kao katehin i elaginska kiselina, vitamini kao vitamin E, ferulinska i folna kiselina te pigment β-karoten najznačajniji su antioksidansi, dok list pasjeg trna također sadrži i znatne koncentracije minerala, od kojih su najzastupljeniji kalcij, magnezij i kalij (Ozturk i sur., 2018). Shipulina i sur. (2006) navode hidrolizabilne galo- i elagitanine monomernog tipa: striktinin, izostriktinin, kazuarinin, kazuariktin kao glavne sastojke frakcije tanina iz listova pasjeg trna. U listovima i plodovima nalazi se više od 40 hlapljivih spojeva od kojih je destilacijom vodenom parom ploda izdvojeno 8 alifatskih estera, 9 alifatskih alkohola i 10 alifatskih ugljikovodika. Iz listova su također izolirani tanini hipofenini A i B (Kumar i sur., 2011). Valíček i Havelka (2008) su tvrdili da listovi pasjeg trna sadrže u prosjeku 3,8 % ugljikohidrata, 0,2 % protopektina, 1 % organskih kiselina, 170 mg 100 g<sup>-1</sup> katehina, polifenola, karotenoidnog likopena, bioflavonoida i kumarina, 8 % tanina i do 370 mg 100 g<sup>-1</sup> vitamina C.

### 2.3. BIOLOŠKI AKTIVNI SPOJEVI LISTA PASJEG TRNA

Svi dijelovi ove biljke dobar su izvor velikog broja bioaktivnih spojeva, što ju čini prirodnim antioksidansom. Neki od bioaktivnih spojeva jesu karotenoidi, tokoferoli, steroli, flavonoidi, lipidi, vitamini, tanini i minerali (Kumar i sur., 2011). Fenolni spojevi su najvećim dijelom zaslužni za antioksidativno djelovanje. Potiskivanje radikala iz mitohondrija i antiproliferativni učinak na stanice raka zadaća je klorofila koji također i moduliraju redoks status, odnosno djeluju na balans između oksidanasa (ili prooksidanasa) i antioksidanasa. Unos karotenoida učinkovito djeluje na smanjenje rizika od kroničnih bolesti u starosnoj dobi (Raudone i sur., 2021).

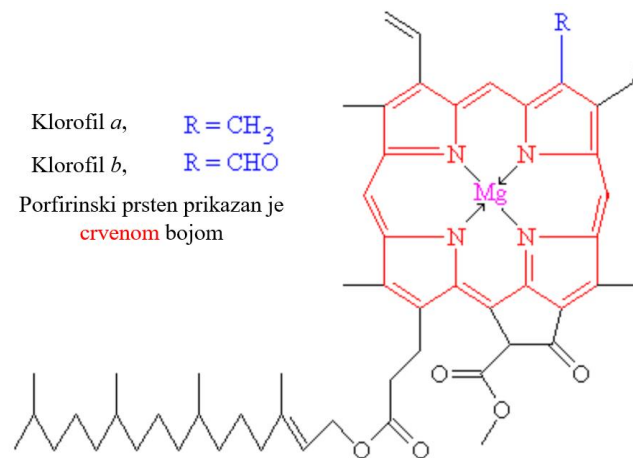
#### 2.3.1. Fenolni spojevi

Listovi pasjeg trna su, u usporedbi s plodovima, puno veći izvor fenolnih spojeva, a osobito hidrolizirajućih i kondenziranih tanina, triterpena i flavonoida (Ciesarová i sur., 2020). Glavnu komponentu listova pasjeg trna čine flavonoidi, od kojih su najzastupljeniji leukocijanidin, katehin, flavonoli i tragovi flavanona. Od flavonola se najčešće mogu izolirati izoramnetin, kvasin i kamelin (Ozturk i sur., 2018). Zbog svoje sposobnosti *in vitro* inhibicije pri ulasku pseudotipiziranog virusa SARS-CoV-2 u stanice, spomenuti flavonol izoramnetin zadobio je veliku znanstvenu pozornost u doba pandemije COVID-19. Rezultati pojedinih istraživanja upućuju na veliki potencijal materijala bogatih izoramnetinom za liječenje Covid-19 (Zhan i sur., 2021). Za efektivan fiziološki učinak flavonoida na stijenku krvnih žila potrebno je sudjelovanje vitamina C. Njihova aktivnost stabilizira vitamin C u tijelu i reducira njegovu oksidaciju. Još neke od povoljnih funkcija flavonoida na organizam, osim spomenute kontrole ateroskleroze, jesu i snižavanje razine kolesterola, stvaranje eutireoidnog stanja, odnosno uspostavljanje hormonalne ravnoteže kod hipertireoze te uklanjanje upala. Fenolne kiseline kao što su galna, protokatehinska, *p*-kumarinska, ferulna, *p*-hidroksibenzojeva i elaginska kiselina se, kako navode Zadernowski i sur. (2005), osim u listu, također mogu pronaći i u plodu ili soku pasjeg trna (Ozturk i sur., 2018). Tigong i sur. (1991) tvrde da se flavonoidi u 100 g zrakom osušenog lista nalaze u rasponu od 319 do 2100 mg. Park i Joo (2021) listove pasjeg trna ekstrahirali su različitim koncentracijama etanola (0, 40, 80 i 100 %), a u dobivenim ekstraktima ispitivali su sadržaj ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i askorbinske kiseline te njihovo antioksidativno djelovanje. Ekstrakti dobiveni ekstrakcijom 40 i 80 %-tnim etanolom (285,06 i 285,64 mg GAE g<sup>-1</sup>) sadržavali su višu koncentraciju ukupnih fenola od ekstrakata dobivenih ekstrakcijom 0 i 100 %-tnim etanolom. Isti ti ekstrakti pokazali su bolju aktivnost

uklanjanja radikala protiv DPPH, superoksida<sup>-</sup>, ABTS<sup>+</sup>, veću aktivnost uklanjanja nitrita (NO<sup>-</sup>) i veću redukcijsku moć.

### 2.3.2. Pigmenti

Klorofil je zeleni biljni pigment odgovoran za odvijanje fotosinteze. Uloga klorofila u fotosintezi jest apsorpcija i prijenos svjetlosne energije. Molekula klorofila sastavljena je od četiri pirolna prstena međusobno povezanih ugljikovim mostom. Četiri prstena čine porfirinski prsten u čijem se središtu nalazi atom magnezija. U višim biljkama nalaze se dva kemijski srodna oblika klorofila: klorofil *a* i klorofil *b* (slika 3). Klorofil *a* na drugom pirolnom prstenu ima vezanu metilnu skupinu (-CH<sub>3</sub>), dok je u molekuli klorofila *b* na istom mjestu vezana aldehidna skupina (-CHO) (Hrvatska enciklopedija, 2021a). U slučaju njihove razgradnje dolazi do promjene boje, okusa ali i nutritivne vrijednosti biljke. Klorofil *a* i *b* razlikuju se i po boji. Klorofil *a* je plavkastozelen, a klorofil *b* žutozelen (Rubinskienė i sur., 2015).



**Slika 3.** Prikaz strukture molekula klorofila *a* i *b* (prema Anonymus 1, 1997)

Karotenoidi su žuti, narančasti i crveni pigmenti koji su posebice rašireni u tamnozelenom lisnatom povrću i žutonarančastom voću i povrću. Smatra se da njihov učinak preventira karcinogenezu. Karoten ( $\beta$ -karoten, C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>) je jedan spoj iz te skupine koji se uz klorofil najčešće nalazi u zelenim biljkama, pa tako i u listu pasjeg trna (Hrvatska enciklopedija, 2021b).



U već prije spomenutom istraživanju, Park i Joo (2021) također su odredili udio klorofila *a* i *b* te njihov ukupni udio. Iz lista pasjeg trna različitim je koncentracijama ekstrakcijskog otapala etanola (0, 40, 80 i 100 %) ekstrahirano 7,77 – 30,65 g mL<sup>-1</sup> klorofila *a*, 4,96 – 49,20 g mL<sup>-1</sup> klorofila *b* te 12,74 – 77,58 g mL<sup>-1</sup> ukupnih klorofila. Raudone i sur. (2021) istražili su sadržaj klorofila i karotenida u konvekcijski osušenim i liofiliziranim listovima pasjeg trna 10 različitih ženskih sorti (Avgustinka, Botaniceskaja Liubitelskaja, Botaniceskaja, Hibrid Percika, Julia, Nivelena, Otradnaja, Podarok Sadu, Trofimovskaja i Vorobjovskaja). Način sušenja značajno je utjecao na sadržaj klorofila i karotenoida. U liofiliziranim je uzorcima sadržaj klorofila *a* bio 1,4 puta veći, dok je sadržaj klorofila *b* bio 19 puta, a ukupnih klorofila 1,6 puta veći u odnosu na konvekcijski osušene uzorke. Koncentracija klorofila razlikovala se i ovisno o sorti. Dokazano je da je klorofil *b* osjetljiviji na razgradnju izazvanu sušenjem u odnosu na klorofil *a*. Guan i sur. (2005) dokazali su da se povećanjem temperature sušenja smanjuje koncentracija klorofila u uzorcima. Što se tiče karotenoida, njihova je koncentracija značajno varirala s obzirom na sortu, ali ovisno i o metodi sušenja. Najviše vrijednosti karotenoida nalazile su se u liofiliziranim uzorcima lista pet sorti (Avgustinka, Botaniceskaja, Otradnaja, Julia i Nivelena). Ukupna količina karotenoida u osušenim listovima iznosila je 0,34±0,01 mg g<sup>-1</sup>. Količine klorofila i karotenoida koje se nalaze u listu pasjeg trna usporedive su s količinama koje se nalaze u svakodnevno korištenom voću i povrću (Raudone i sur. 2021). Repajić i sur. (2020) koristili su ASE za izolaciju klorofila i karotenoida. Dokazali su statistički značajan utjecaj temperature, statičkog vremena ekstrakcije i broja ciklusa ekstrakcije na sadržaj ispitivanih pigmenata. Prinos ukupnih klorofila i karotenoida porastao je 2 puta porastom temperature. Ipak, najviši prinos pojedinih klorofila i karotenoida postigao se pri temperaturi od 80 °C, dok je daljnjim povišenjem zabilježen pad prinosa. Uzimajući u obzir statičko vrijeme ekstrakcije prinos svih pigmenata bio je najviši pri statičkom vremenu 10 min. Bila je vidljiva i pozitivna korelacija s povećanjem broja ciklusa, odnosno, najviši prinos pigmenata postignut je s maksimalnim brojem ciklusa ekstrakcije. Konačno, najviša vrijednost ukupnih pigmenata dobivena je pri 110 °C, statičkom vremenu 10 min i primjenom 4 ciklusa.

### 2.3.3. Ostali bioaktivni spojevi

Osim flavonoida, klorofila i karotenoida, u listovima pasjeg trna prisutni su i mnogi drugi bioaktivni spojevi. Goncharova i Glushenkova (1996) u svom su znanstvenom istraživanju određivale razne bioaktivne spojeve u listovima od dviju vrsti pasjeg trna. Navode kako se u listovima nalaze znatne količine izoprenola, estera voska, a prisutni su i ugljikovodici,

triterpenol esteri, sterol esteri, triterpenoli, masni alkoholi i steroli. U svojim prethodnim istraživanjima dokazale su prisutnost lipida i karotenoida te su prikazale ukupni sastav masnih kiselina (Goncharova i Glushenkova, 1995a; Goncharova i Glushenkova 1995b; Goncharova i Glushenkova 1993).

#### **2.4. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA**

Ekstrakcija je tehnološka operacija koja predstavlja potpuno ili djelomično odjeljivanje smjese tvari. Za uspješno odjeljivanje, tvari moraju imati različitu topljivost u različitim otapalima. Bioaktivne molekule različito su topljive u različitim vrstama otapala te o sastavu biljnog materijala ovisi odabir optimalnog otapala. Neka od najčešće korištenih otapala jesu metanol, etanol, aceton, etil acetat i njihove vodene otopine koje se smatraju najučinkovitijim otapalima za izolaciju bioaktivnih molekula iz biljnih materijala. Etanol i vodene otopine etanola koriste se u većoj mjeri za industrijske potrebe s obzirom na metanol, kojeg karakterizira toksičnost (Dragović, 2020). Prisustvo i udio vode u organskoj fazi otapala, za razliku od čistog etanola ili acetona, značajno povećava proces difuzije i olakšava ekstrakciju bioaktivnih molekula iz biljnog materijala (Mohammedelnour i sur., 2017). Vrsta otapala za ekstrakciju bira se prema raznim kriterijima. Otapalo bi, po mogućnosti, trebalo biti što jeftinije, pogodno za ponovnu upotrebu, dostupno u dovoljnim količinama, nezapaljivo, neškodljivo za tehničara, a kasnije i konzumenta, da ne ugrožava okoliš prilikom odlaganja, a najvažnije, da zadovoljava kriterije tvari koja se želi izdvojiti. Posljednje podrazumijeva polarnost (koja mora biti jednaka kao što je polarnost tvari), reaktivnost (otapalo se ne smije razgrađivati niti reagirati s tvari koja se izdvaja), točka vrenja (koja treba biti što niža kako bi se otapalo lakše odvojilo od izdvojene tvari), viskozitet (koji treba biti nizak kako bi otapalo lakše prošlo kroz sloj krutih čestica) i stabilnost otapala (na toplinu, svjetlost i kisik) (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Kako bi se na kraju ekstrakcije izdvojila tvar u čistom obliku, provodi se kristalizacija ili otparavanje otapala u kojem je željena izdvojena tvar otopljena (Lianfu i Zelong, 2008).

Pri ekstrakciji iz čvrste tvari bitno je povećati površinu uzajamnog djelovanja među fazama. To se postiže usitnjavanjem i homogenizacijom. Da bi se željena tvar raspršila u volumenu otapala potrebno je da ta tvar, zajedno s otapalom u kojem se otopila, najprije prijeđe iz namirnice (općenito iz krute tvari) na njezinu površinu, nakon čega se lako raspršuje u otapalu. Vrijeme ekstrakcije ovisi o nekoliko parametara: topljivost komponente u otapalu, temperatura ekstrakcije, površina materijala izložena otapalu, viskoznost otapala i volumni protok otapala. Proces ekstrakcije ubrzava se povišenjem temperature, što potiče brže otapanje tvari u otapalu

i njezino brže difundiranje u volumen otapala. Bitno je, ipak, da temperatura ne bude previsoka pri čemu bi moglo doći do ekstrakcije nepoželjnih tvari ili pak degradacije željene tvari. Brži volumni protok otapala omogućuje smanjenje graničnog sloja između koncentrirane otopine i površine čestica čime se brzina ekstrakcije također povećava (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Dugim vremenom ekstrakcije i visokom temperaturom povećava se mogućnost oksidacije fenola, čiji je prinos u dobivenom ekstraktu stoga znatno manji (Dai i Mumper, 2010).

Podjela tehnika ekstrakcije vrši se na konvencionalne i napredne metode. U konvencionalne metode spadaju destilacija (vodena, vodeno-parna i parna), maceracija, perkolacija, Soxhlet ekstrakcija i hladno prešanje. Konvencionalne metode karakteriziraju mnogi nedostaci kao što su degradacija bioaktivnih komponenti zbog visokih temperatura ili predugog trajanja ekstrakcije, hidroliza ili oksidacija bioaktivnih molekula i velike potrebne količine otapala koje se upotrebljava. Međutim, one se zbog jednostavnosti i učinkovitosti i dalje najčešće koriste (Dragović, 2020).

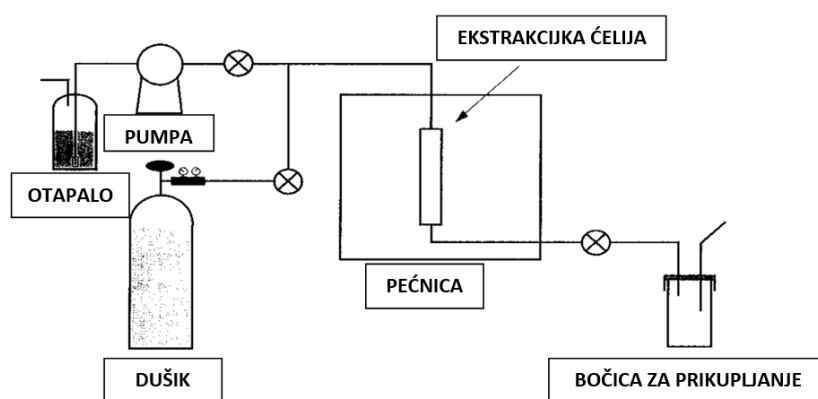
U naprednim metodama ekstrakcije koriste se puno manje količine ekstrakcijskih otapala te su takve metode ekološki prihvatljivije u usporedbi s konvencionalnim metodama (Drosou i sur., 2015). Primjenom naprednih metoda omogućuje se dobivanje viših ili sličnih ekstrakcijskih prinosa u kraćem vremenu. Razlog tome jest njihovo provođenje bez prisustva svjetla i kisika (Nayak i sur., 2015). U ove metode ekstrakcije spadaju ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) i ubrzana ekstrakcija otapalima (ASE) (Dragović, 2020).

#### 2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. *Accelerated Solvent Extraction*, ASE) je tehnika brze ekstrakcije koja omogućuje dobivanje ekstrakata iz krutih i polukrutih uzoraka uz malu potrošnju otapala (manje od 50 mL) i to u vrlo kratkom vremenu (manje od 20 min). Ova tehnika ekstrakcije potpuno je automatizirana, a prvi put je predstavljena 1995. godine od strane američke tvrtke Dionex (Gan i sur., 1999). ASE je metoda koja omogućuje izdvajanje željenih spojeva pri temperaturama od 50 do 200 °C, čime je ubrzana kinetika ekstrakcije. Kako bi otapalo pri ovim visokim temperaturama ostalo u tekućem stanju, ASE iziskuje rad pri povišenom tlaku (10-15 MPa). Visokim temperaturama i tlakom povećava se učinak samog procesa (Mottaleb i Sarker, 2012). Porastom temperature smanjuje se viskoznost i površinska napetost otapala, dok se istovremeno povećava topljivost uzorka, brzina difuzije i

transfer mase, a međumolekulske interakcije između otopljenog analita i matriksa se znatno smanjuju (Tandon i Rane, 2008). S obzirom da su neki bioaktivni spojevi termolabilni, a visoke temperature mogu utjecati i na njihovu bioaktivnost, važno je da se temperatura ekstrakcije prethodno primjereno odredi. Pri visokim temperaturama moguć je nastanak otrovnih ili neželjenih spojeva, odnosno mogu se odvijati neke neželjene reakcije (Alvarez i Rivera, 2020). Visoki tlak, osim što omogućava da otapalo pri visokim temperaturama ostane u tekućem stanju, on pridonosi i bržem punjenju ekstrakcijske ćelije otapalom te olakšava prodiranje otapala u pore materijala koji se ekstrahira (Tandon i Rane, 2008).

Uzorak koji se podvrgava ASE trebao bi biti što sitniji (manji od 1 mm). Finim usitnjavanjem uzorka povećava se površina čestica, a što je površina veća, to je ekstrakcija brža. Takav uzorak se, pomiješan najčešće s dijatomejskom zemljom, puni u ćelije od nehrđajućeg čelika u koje se prethodno stavio filter. Uloga dijatomejske zemlje, odnosno adsorbensa, jest da apsorbira vlagu koja se eventualno nalazi u uzorku te sprječava začepljenje ćelija pri korištenju visokog tlaka. Napunjene ćelije stavljaju se u rotirajuće utore, na ekranu se zadaju željeni parametri nakon čega se pokreće proces ekstrakcije. Otapalo za ekstrakciju se pri zadanom tlaku i temperaturi pumpa u uzorak koji se zagrijava u pećnici. Nakon tako provedene ekstrakcije ekstrakt se filtrira i sakuplja u bočice, a ćelije se ispiru i suše komprimiranim dušikom (Mottaleb i Sarker, 2012). Shematski prikaz procesa ASE prikazan je na slici 4.



**Slika 4.** Shematski prikaz procesa ASE (prema Richter i sur., 1996)

Za ovu metodu ekstrakcije najčešće se koriste organska otapala različitog polariteta (od *n*-heksana do metanola), a samim postupkom smanjen je i negativan utjecaj para otapala na

ljudsko zdravlje i okoliš s obzirom da se ovom metodom upotreba otapala smanjuje čak i do 90 % (Wang i Weller, 2006). Alvarez-Rivera i sur. (2020) tvrde da je smjesa vodene otopine etanola (EtOH > 50 %), bilo zakiseljena ili ne, pogodno otapalo za ekstrakciju polifenola ASE metodom.

S obzirom da ASE sustav ima mnogo više prednosti nego nedostataka, u posljednje se vrijeme u velikoj mjeri odabire kao metoda ekstrakcije. Giergielewicz-Možajska i sur. (2001) pobrojali su prednosti i nedostatke ASE sustava u usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije (tablica 1).

**Tablica 1.** Prednosti i nedostaci ASE sustava (prema Giergielewicz-Možajska i sur., 2001)

<p><b>Prednosti</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Jednostavnost korištenja</li> <li>- Jednostavna i brza priprema uzorka</li> <li>- Brzo vrijeme ekstrakcije (oko 15 min)</li> <li>- Korištenje malih količina otapala (oko 15 – 25 mL)</li> <li>- Širok raspon otapala za ekstrakciju (osim jakih kiselina i baza te otapala čija je temperatura samozapaljenja 40 – 200 °C)</li> <li>- Otapala mogu biti čista ili mješavina otapala</li> <li>- Termolabilni analiti mogu se lako ekstrahirati zbog primjene visokog tlaka</li> <li>- Visoka reproducibilnost ekstrakcijskih parametara (temperatura, tlak, statičko vrijeme, volumen ispiranja)</li> <li>- U jednom ciklusu može se ekstrahirati više uzoraka odjednom (ovisno o konfiguraciji uređaja)</li> <li>- Otapalo je potrebno otplinjavati samo ako analit od interesa lako oksidira</li> </ul>
<p><b>Nedostaci</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cijena aparature je visoka</li> <li>- Ekstrakcijske ćelije nekih serija ekstraktora sastoje se od mnogo dijelova što postupak pranja čini kompliciranim</li> <li>- Ekstrakcija općenito nije selektivna</li> <li>- Često potrebno pročišćavanje ekstrakta prije daljnjih analiza</li> </ul>

Michel i sur. (2012) su također, radi već dokazane zvaničnosti i afirmiranosti ASE metode, odabrali istu za svoja istraživanja. Usporedili su prinose ukupnih fenola dobivenih ekstrakcijom lista, stabljike, korijena i sjemena pasjeg trna koristeći dva otapala: etanol i etil acetat. Prinos etanolnih ekstrakata bio je znatno veći od prinosa etil acetatnih ekstrakata, što pripisuju selektivnosti ekstrakcije, odnosno, pošto je etanol polarno otapalo, ono ekstrahira širok raspon molekula uključujući šećer, glikozide i slabo polarne spojeve, dok je etil acetat nepolarno otapalo koje prvenstveno ekstrahira hidrofobne spojeve poput aglikona i spojeve s dugim ugljikovodičnim lancima. Optimiranjem parametara odredili su temperaturu 60 °C i tlak 100 bara kao uvjete ekstrakcije koji daju najviše prinose fenola.

Repajić i sur. (2020) istražili su učinak ASE kao zelene metode za dobivanje polifenola i pigmentata iz lišća samonikle koprive. Usporedili su učinkovitost ASE s obzirom na UAE koja se provodila 30 min pri 80 °C. ASE se provodila pri različitoj temperaturi (20, 50, 80 i 110 °C), statičkom vremenu (5 i 10 min) i broju ciklusa (1-4). Ekstrakcijsko otapalo bio se 96 %-tni etanol. Zaključeno je da su optimalni uvjeti za postizanje najvećih prinosa ispitivanih spojeva temperatura od 110 °C, statičko vrijeme 10 min i 3 ili 4 ciklusa. Isto tako dokazano je da se korištenjem ASE metode u usporedbi s UAE postižu veći prinosi ispitivanih spojeva i 60 % veći antioksidativni kapacitet.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom istraživanju provedeno je ispitivanje utjecaja ekstrakcijskih uvjeta ASE (temperature, statičkog vremena ekstrakcije i broja ciklusa ekstrakcije) za izolaciju fenolnih spojeva i pigmentata iz osušenog lista pasjeg trna. U dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su određeni ukupni fenoli, pigmenti i antioksidacijski kapacitet.

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. List pasjeg trna

Kao materijal korišten je list pasjeg trna iz kultiviranog uzgoja u kontinentalnoj Hrvatskoj (Hrvatsko zagorje) ubran tijekom 2020. godine. Nakon branja, uzorci svježeg lista dopremljeni su u laboratorij te pohranjeni pri -18 °C do postupka liofilizacije. Za potrebe liofilizacije uzorci su pohranjeni 24 h pri -80 °C, nakon čega je provedena liofilizacija pri -55 °C/24 h. Liofilizirani listovi su zapakirani u polipropilenske vrećice, hermetički zatvoreni te pohranjeni pri sobnoj temperaturi do provođenja ASE. Neposredno prije ekstrakcije, liofilizirani uzorci lista su usitnjeni pomoću električnog mlinca (slika 5).



**Slika 5.** Usitnjeni uzorak lista pasjeg trna (*vlastita fotografija*)

##### 3.1.2. Kemikalije i standardi

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

- Etanol, 70 %-tni, odzračeni  
Priprema: S obzirom na potrebni volumen 70 %-tnog etanola izračuna se potrebni volumen 96 %-tnog etanola, a tikvica se zatim nadopuni destiliranom vodom do oznake.
- Destilirana voda
- Folin-Ciocalteu reagens (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev karbonat, anhidrid (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata, 20 %-tna otopina  
Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode te ohladi na sobnu temperaturu. Zatim se doda nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni se u odmjerne tikvici od 1000 mL i filtrira nakon 24 h.
- Galna kiselina (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 5 mg mL<sup>-1</sup>  
Priprema: odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici te se pomoću 10 mL 96 %-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu. Odmjerna tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom.
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), 2 mM  
Priprema: odvaži se 0,0501 g Troloxa i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se nadopuni do oznake 96 %-tnim etanolom.
- Klorovodična kiselina, 37 %-tna (Carlo Erba)
- Klorovodična kiselina, 40 mM  
Priprema: otpipetira se 330 µL 37 %-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjerne tikvici od 100 mL.
- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD)
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM  
Priprema: odvaži se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom.
- Željezo (III)-klorid heksahidrat (FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O) (Gram-Mol)
- Željezo (III)-klorid heksahidrat (FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O), 20 mM otopina  
Priprema: odvaži se 0,541 g željezo (III)-klorida heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake s destiliranom vodom.
- Glacijalna octena kiselina, 99-100 %-tna (Carlo Erba)



- Natrij-acetat trihidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) (Kemika)

- Acetatni pufer, 0,3 M, pH 3.6

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

- FRAP reagens

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

### 3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Liofilizator, Alpha 1-4 LSCPlus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka)
- Analizator vlage (Ohaus MB25, Parsippany, New Jersey)
- ASE ekstraktor, ThermoScientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex Digitec DT 514, Bandelin electronic GmbH & Co., Berlin, Njemačka)
- Električni mlinac (GT11, Tefal, Rumily, Francuska)
- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Vortex miješalica (MS2 Minishaker IKA, Staufen, Njemačka)
- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer, VWR International, Radnor, SAD)



**Slika 6.** Ekstraktor ASE™ 350 (lijevo) i pripremljeni uzorci u ekstrakcijskim ćelijama (desno) (*vlastita fotografija*)

Pribor:

- Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika (Thermo Scientific, 34 mL)
- Celulozni filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- Staklene boce za ekstrakciju (Thermo Scientific) (250 mL)
- Odmjerne tikvice (5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL, 1000 mL)
- Stakleni lijevci
- Plastične epruvete (Falcon) (50 mL)
- Plastične lađice za vaganje
- Spatula
- Staklene čaše (50 mL, 100 mL)
- Menzure (100 mL, 500 mL)
- Mikropipete Eppendorf (100 µL, 1000 µL, 5 mL)
- Staklene epruvete, stalak za epruvete
- Staklene kivete

## 3.2. METODE

### 3.2.1. ASE

Izolacija fenolnih spojeva i pigmenata iz lista pasjeg trna provedena je na uređaju ASE 350<sup>TM</sup> (slika 6). Korišteno ekstrakcijsko otapalo bila je 70 %-tna vodena otopina etanola (70 %-tni etanol), prethodno odzračena. U svrhu definiranja uvjeta ekstrakcije pri kojima se postižu najviši prinosi fenolnih spojeva i pigmenata varirani su parametri ekstrakcije: temperatura (80, 100 i 120 °C), statičko vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min) te broj ciklusa ekstrakcije (1, 2 i 3 ciklusa) čime je ukupno dobiveno 27 ekstrakata (tablica 2).

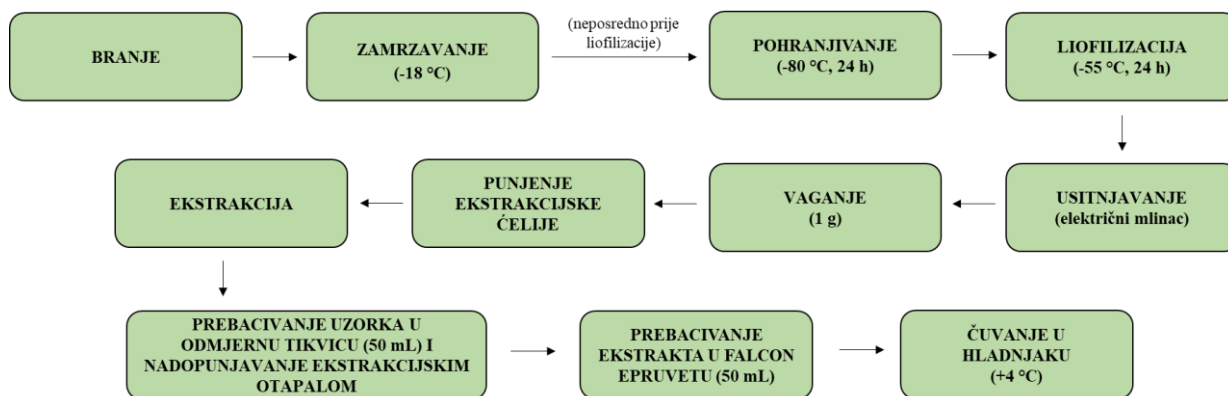
**Tablica 2.** Plan pokusa

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

Prije same ekstrakcije potrebno je na analitičkoj vagi u plastičnoj čašici odvagati  $1 \pm 0,001$  g liofiliziranog i usitnjenog uzorka lista pasjeg trna. Na dno ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika postave se 2 celulozna filtera, a zatim se u ćeliju prebaci izvagani uzorak pomiješan s pola mjerice dijatomejske zemlje, a gotovo cijeli volumen ćelije nadopuni se dijatomejskom zemljom. Ćelija se zatvori i zajedno sa staklenom bocom za ekstrakciju postavlja na predviđeno mjesto u ASE ekstraktoru. Uz podešavanje variranih parametara (temperatura, statičko vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa ekstrakcije) fiksni uvjeti ekstrakcije bili su: tlak 10,34 MPa, volumen ispiranja 30 % i vrijeme propuhivanja dušikom 30 s. Ekstrakt koji je sakupljen u staklenu bocu (slika 7) kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL te se tikvica nadopuni do oznake ekstrakcijskim otapalom. Pripremljeni ekstrakt prebaci se u plastičnu epruvetu od 50 mL i do provođenja spektrofotometrijskih analiza skladišti pri  $+4$  °C. Detaljan prikaz pripreme i ekstrakcije uzorka prije provođenja spektrofotometrijskih analiza prikazan je na slici 8.



**Slika 7.** Ekstrakt lista pasjeg trna skupljeni u staklenu ekstrakcijsku bočicu, prije razrjeđivanja ekstrakcijskim otapalom (*vlastita fotografija*)



**Slika 8.** Shema pripreme i ekstrakcije uzorka prije provođenja spektrofotometrijskih analiza

### 3.2.2. Određivanje suhe tvari

Suha tvar lista pasjeg trna određena je pomoću analizatora vlage. Za određivanje suhe tvari uzeto je 2 g uzorka te postavljeno u posudicu analizatora pri čemu je potrebno da se uzorak pravilno rasporedi po cijeloj površini posudice. Prethodno liofiliziran i usitnjen list pasjeg trna sušio se otprilike 30 min, a određena suha tvar iznosila je 96,02 %.

### 3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

#### ***Princip određivanja:***

Metoda određivanja ukupnih fenola temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom koji je smjesa fosforwolframove i fosfomolibdenske kiseline. Navedene kiseline se pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima reduciraju u wolframov oksid i molbidenov oksid koji su plavo obojeni. Određivanje koncentracije ukupnih fenola provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka, a plavo obojenje, čiji intenzitet je veći ukoliko je u uzorku prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa fenolnih spojeva, mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

#### ***Priprema uzoraka:***

Za određivanje ukupnih fenola ekstrakte lista pasjeg trna potrebno je razrijediti 10 puta ekstrakcijskim otapalom.

#### ***Postupak određivanja:***

U 100  $\mu$ L ekstrakta dodaje se redom 200  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa, 2 mL destilirane vode te nakon 3 min 1 mL otopine natrijeva karbonata. Nakon miješanja pomoću Vortex miješalice pripremljeni uzorci se termostatiraju 25 min pri 50 °C, a zatim slijedi mjerenje

apsorbancije pri valnoj duljini 765 nm. Slijepa proba priprema se na isti način, a umjesto ekstrakta uzima se 100  $\mu\text{L}$  70 %-tnog etanola.

***Izrada baždarnog pravca:***

Pripremljena otopina galne kiseline ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) razrjedi se destiliranom vodom u više razrjeđenja: 50, 100, 150, 250 i  $500 \text{ mg L}^{-1}$ . Zatim se u staklenu epruvetu otpipetira  $100 \mu\text{L}$  galne kiseline određene koncentracije te se redom dodaje  $200 \mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa,  $2 \text{ mL}$  destilirane vode, a nakon 3 min  $1 \text{ mL}$  zasićene otopine natrijeva karbonata. Slijepa proba umjesto galne kiseline sadrži  $100 \mu\text{L}$  destilirane vode. Pripremljeni uzorci se promiješaju pomoću Vortexa i termostatiraju u vodenoj kupelji 25 min pri  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon toga se pri valnoj duljini od 765 nm mjeri apsorbcija, a iz izmjerenih vrijednosti se pomoću programa Microsoft Excel crta baždarni pravac. Na apscisu baždarnog pravca nanose se koncentracije galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ), a na ordinatu se nanose izmjerene vrijednosti apsorbcije pri 765 nm. Prema dobivenoj jednadžbi pravca izračuna se koncentracija ukupnih fenola [1]:

$$Y = 0,0035 \cdot X \quad (R^2 = 0,9997) \quad [1]$$

gdje je:

Y – apsorbcija pri 765 nm

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

$R^2$  – koeficijent determinacije

Koncentracije ukupnih fenola izražene su u  $\text{mg GAE g}^{-1}$  suhe tvari ( $\text{mg GAE g}^{-1} \text{ s.t.}$ ) kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

#### 3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje biljnih pigmenata

***Princip određivanja***

Svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumom pri određenim valnim duljinama. U skladu s korištenim ekstrakcijskim otapalom, spektrofotometrijsko mjerenje apsorbcije ekstrakata provodi se pri valnim duljinama 470; 648,6 i 664,1 (Lichtenthalen i Buschmann, 2001).

### ***Priprema uzoraka***

Prije mjerenja apsorbancije uzorke lista pasjeg trna potrebno je razrijediti 10 puta ekstrakcijskim otapalom.

### ***Postupak određivanja***

U skladu s korištenim ekstrakcijskim otapalom (etanol), kvantitativno određivanje biljnih pigmenata provodi se spektrofotometrijski pri valnim duljinama 648,6 nm za klorofil *a* i 664,1 nm za klorofil *b*. Za slijepu probu služi 70 %-tni etanol, otapalo koje je korišteno za ekstrakciju. Od apsorbancije uzoraka oduzima se apsorbancija slijepe probe, a dobivena vrijednost služi za izračunavanje konačnog rezultata.

Za izračunavanje udjela klorofila *a* i *b* služe sljedeće jednadžbe (Lichtenthaler i Buschmann, 2001) [2, 3].

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

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

gdje je:

A = apsorbancija

$c_a$  = klorofil *a*

$c_b$  = klorofil *b*

Koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih klorofila izražene su u mg g<sup>-1</sup> s.t. kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.2.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom

#### ***Princip određivanja***

Metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridil-triazin koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Shortle i sur., 2014). FRAP metoda temelji se na prijenosu elektrona pri čemu antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima, metalima i karbonilnim spojevima. Navedena reakcija popraćena je smanjenjem intenziteta obojenja koji je izravno proporcionalan koncentraciji

antioksidansa. Vrijednosti dobivene FRAP metodom najčešće se izražavaju preko  $\text{FeSO}_4$ , askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996).

### ***Priprema uzoraka***

Ekstrakti lista pasjeg trna prije analize razrijeđeni su 40 puta.

### ***Postupak određivanja***

Za mjerenje apsorbancije uzoraka u svrhu određivanja antioksidacijskog kapaciteta potrebno je u epruvete otpipetirati redom 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  uzorka i 2080  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa. Pripremljeni uzorci se pomoću Vortex miješalice promiješaju i termostatiraju 5 min pri 37 °C. U slijepu probu dodaje se sve osim uzorka umjesto kojeg se uzima ekstrakcijsko otapalo, 70 %-tni etanol. Apsorbancija se mjeri pri 593 nm.

### ***Izrada baždarnog pravca***

Za izradu baždarnog pravca u 96 %-tnom etanolu se otopi 0,0501 g Troloxa u odmjerne tikvici od 100 mL te se tikvica nadopuni do oznake. Na taj način dobije se 2 mM otopina Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8- tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) od koje se u odmjernim tikvicama (10 mL) rade razrijeđenja na sljedeći način: u tikvice se redom otpipetira 0,125; 0,5; 0,625; 1,25; 2,5 i 5 mL alikvota standardne otopine Troloxa, a tikvice se zatim nadopunjavaju 96 %-tnim etanolom do oznake. Koncentracije Troloxa u tako dobivenim otopinama iznose 25, 100, 125, 250, 500 i 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Nakon toga se u staklene epruvete otpipetira 240  $\mu\text{L}$  destilirane vode, 80  $\mu\text{L}$  otopine Troloxa određene koncentracije i 2080  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa. Pripremljeni uzorci se pomoću Vortex miješalice izmješaju, a zatim se termostatiraju pri 37 °C. Slijepa proba sadrži sve osim otopine Troloxa, umjesto koje se dodaje 80  $\mu\text{L}$  96 %-tnog etanola. Slijedi mjerenje apsorbancije pri 593 nm. Iz dobivenih vrijednosti nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel, gdje su na apscisi označene koncentracije Troloxa ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), dok se na ordinati nalaze izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 593 nm. Dobivena jednadžba pravca služi za izračunavanje antioksidacijskog kapaciteta uzorka [4]:

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

gdje je:

Y – apsorbancija pri 593 nm

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



$R^2$  – koeficijent determinacije

Antioksidacijski kapacitet izražen je u  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.t. kao srednja vrijednost dvaju mjerenja.

### 3.2.6. Obrada podataka

Eksperiment je dizajniran kao puni faktorijalni dizajn, a za statističku analizu primijenjena je multifaktorska analiza varijance uz Tukey HSD test. Statistički značajna razlika razmatrana je na razini  $p \leq 0,05$  (95 %-tni interval pouzdanosti). Eksperimentalni dizajn pokusa i statistička obrada podataka provedeni su u programskom sustavu Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

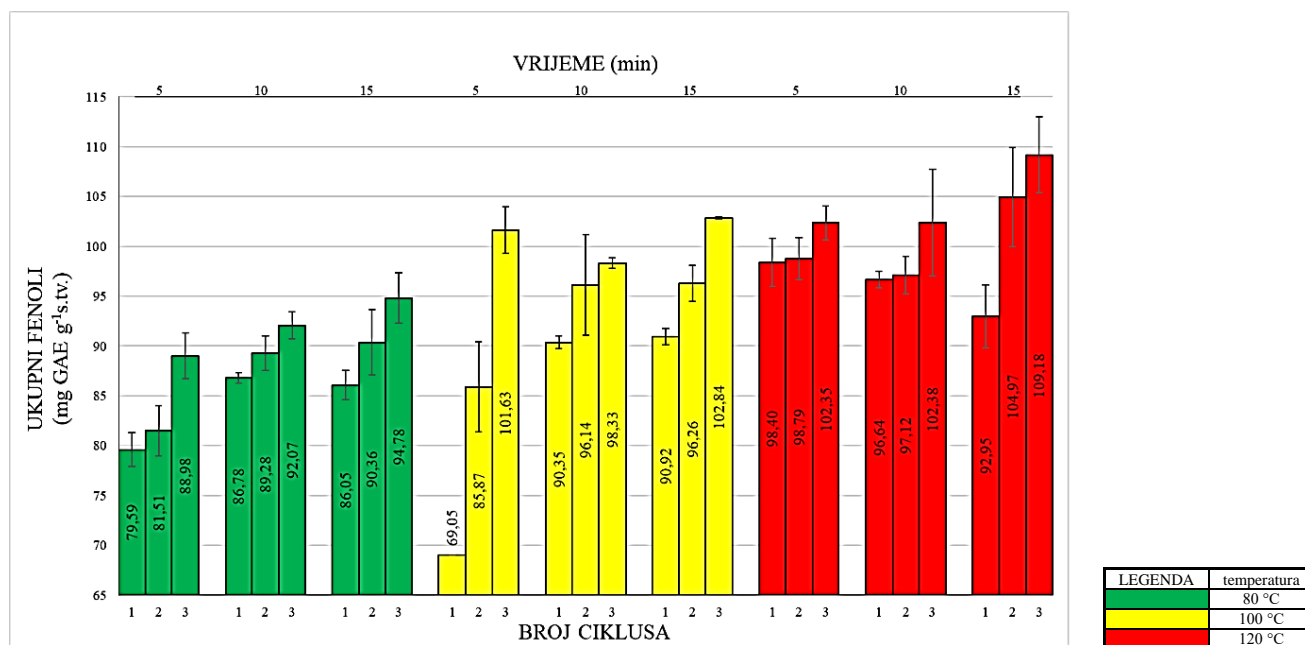
Cilj ovog rada bio je odrediti optimalne uvjete ASE (temperatura, statičko vrijeme ekstrakcije i broj ciklusa ekstrakcije) za izolaciju fenolnih spojeva i klorofila iz osušenog lista pasjeg trna. Korišteno otapalo bio je 70 %-tni etanol.

Varirani parametri ekstrakcije bili su temperatura 80, 100 i 120 °C, statičko vrijeme ekstrakcije 5, 10 i 15 min te broj ciklusa 1, 2 i 3. U dobivenim ekstraktima je spektrofotometrijskim analizama određen udio ukupnih fenola, klorofila *a* i *b* te ukupnih klorofila. Također, određen je i antioksidacijski kapacitet.

Rezultati su prikazani grafički (slike 9, 10, 11, 12 i 13) kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja  $\pm$  standardna devijacija. Napravljena je i statistička analiza čiji su rezultati prikazani u tablici 3 kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška.

### 4.1. UDIO UKUPNIH FENOLA

Na slici 9 prikazane su vrijednosti udjela ukupnih fenola određene u ekstraktima lista pasjeg trna dobivenih primjenom ASE.



**Slika 9.** Udio ukupnih fenola u ekstraktima lista pasjeg trna dobivenih primjenom ASE

Koncentracija ukupnih fenola u listu pasjeg trna određena je u rasponu od 69,05 do 109,18 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t. Točnije, u uzorku koji je ekstrahiran pri 100 °C, statičkom vremenu 5 min i uz primjenu 1 ciklusa određen je najniži udio ukupnih fenola, dok je najviši udio određen u ekstraktu dobivenom pri 120 °C, statičkom vremenu 15 min, uz primjenu 3 ciklusa (slika 9). Prosječna vrijednost ukupnih fenola svih uzoraka iznosila je 93,47 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t. (tablica 3).

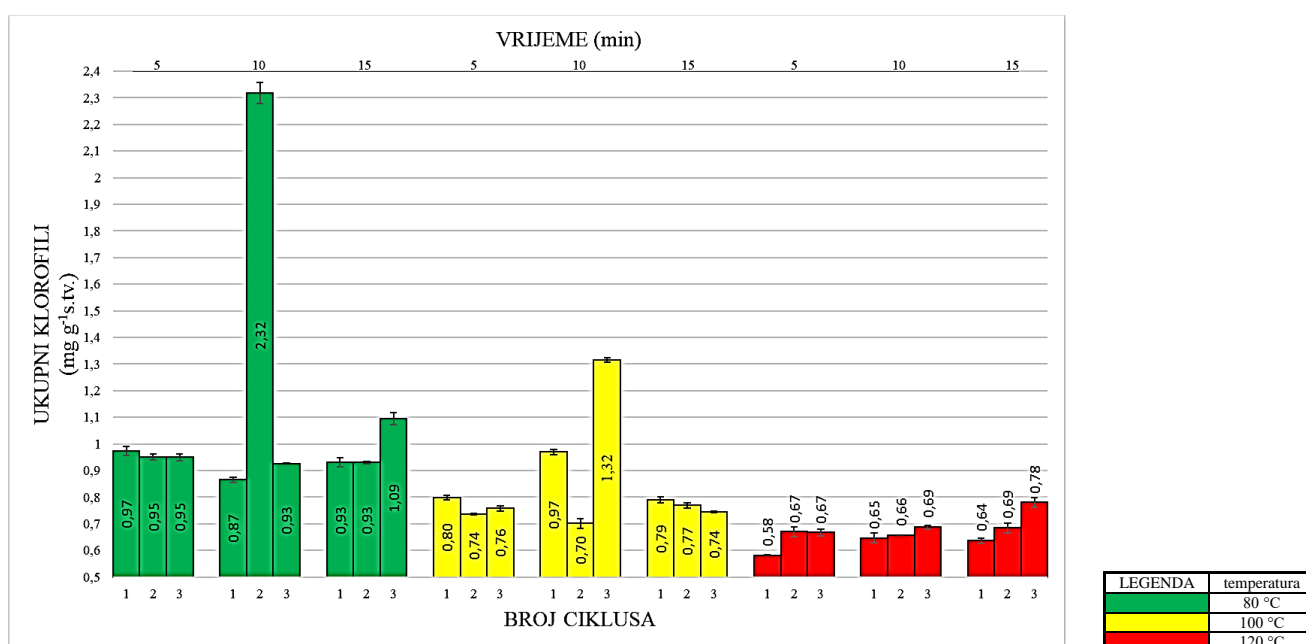
Michel i sur. (2012) određivali su udio ukupnih fenola u listu pasjeg trna iz rasadnika PLANFOR u Francuskoj. Ekstrakcijska tehnika bila je ASE (tvrtka Dionex, Voisins le Bretonneux, France), koja se provodila pod tlakom od 100 bara pri temperaturi od 60 °C, koristeći 5 ciklusa i 5 min statičkog vremena, dok je volumen ispiranja bio 70 %, a vrijeme propuhivanja dušikom 100 s. Princip određivanja ukupnih fenola također se temeljio na kolornoj reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom u etanolnom ekstraktu uzorka. Ovim je postupkom određen ukupni udio fenola u listovima pasjeg trna u vrijednosti od 65±14 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t. Dobivena koncentracija ukupnih fenola niža je i od vrijednosti koje su u ovom istraživanju određene u ekstraktima dobivenim pri 1 ciklusu ispiranja. Ukoliko se uspoređuju rezultati ovog istraživanja koji su dobiveni korištenjem istog parametra (statičko vrijeme od 5 min), može se zaključiti da temperatura ekstrakcije, koja je bila niža u odnosu na temperature primijenjene u ovom istraživanju, znatno doprinosi učinkovitosti izolacije ukupnih fenola iako je u spomenutoj literaturi korišten veći broj ciklusa. Temperatura je općenito jedan od najvažnijih čimbenika u procesu ekstrakcije čvrsto-tekuće. Topljivost polifenola pri višim je temperaturama veća, a to pokazuje i koeficijent prijenosa mase između matriksa materijala i ekstrakcijskog medija koji se povećava povišenjem temperature. Međutim, predugo vrijeme ekstrakcije na visokoj temperaturi može dovesti do oksidacije polifenola ili pak može promijeniti njihovu konformaciju (Asofiei i sur., 2016).

Kumar i sur. (2011) odredili su koncentraciju ukupnih fenola u listu pasjeg trna koristeći maceraciju, Soxhlet ekstrakciju i subkritičnu vodenu ekstrakciju za izolaciju fenola. Za određivanje ukupnih fenola koristili su Folin – Ciocalteu metodu. U uzorcima u kojima je kao metoda ekstrakcije provedena maceracija određeno je 28,35±1,31 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t. (20 - 30 °C). Primjenom Soxhlet ekstrakcije izolirano je od 43,77±1,72 (30 °C) do 77,85±2,36 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t. (80 °C) ukupnih fenola. Nadalje, vrijednost ukupnih fenola u uzorcima tretiranim subkritičnom vodenom ekstrakcijom određena je u rasponu od 76,07±2,41 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t. (pri 100 °C) do 93,72±2,83 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t. (pri 150 °C) što je ujedno i najviša određena vrijednost. Pri višoj temperaturi subkritične vodene ekstrakcije (200 °C) vrijednost izoliranih ukupnih fenola se smanjila, čemu je uzrok vjerojatno oksidacija fenola pri visokim temperaturama.

Uspoređujući njihove rezultate s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju može se zaključiti da je ASE mnogo učinkovitija metoda ekstrakcije od svih triju ekstrakcija koje su provodili Kumar i sur. (2011), pošto su vrijednosti ukupnih fenola dobivene u ovom istraživanju u većini slučajeva znatno veće. Geografsko porijeklo biljke pasjeg trna i izbor ekstrakcijskog otapala također mogu biti neki od čimbenika koji utječu na dobivene vrijednosti ukupnih fenola.

## 4.2. UDIO KLOOROFILA

Udjeli ukupnih klorofila određeni u ekstraktima lista pasjeg trna dobiveni primjenom ASE prikazani su na slici 10.



**Slika 10.** Udio ukupnih klorofila u ekstraktima lista pasjeg trna dobivenih primjenom ASE

Udio ukupnih klorofila (klorofil *a* + klorofil *b*) u uzorcima lista pasjeg trna ekstrahiranim pri različitim uvjetima kreće se u rasponu od 0,58 do 2,32 mg g<sup>-1</sup> s.t. Najniža vrijednost određena je u uzorku ekstrahiranom uz primjenu 120 °C, statičkom vremenu 5 min i 1 ciklus, dok je najviši udio izoliran iz uzorka koji je bio podvrgnut ekstrakciji pri 80 °C statičkom vremenu 10 min i 2 ciklusa (slika 10). Prosječna vrijednost ukupnih klorofila svih uzoraka iznosila je 0,87 mg g<sup>-1</sup> s.t. (tablica 3).

Raudone i sur. (2021) uspoređivali su udio ukupnih klorofila u listovima pasjeg trna deset različitih ženskih kultivara. Listovi su osušeni na dva načina, konvekcijski i liofilizacijom.

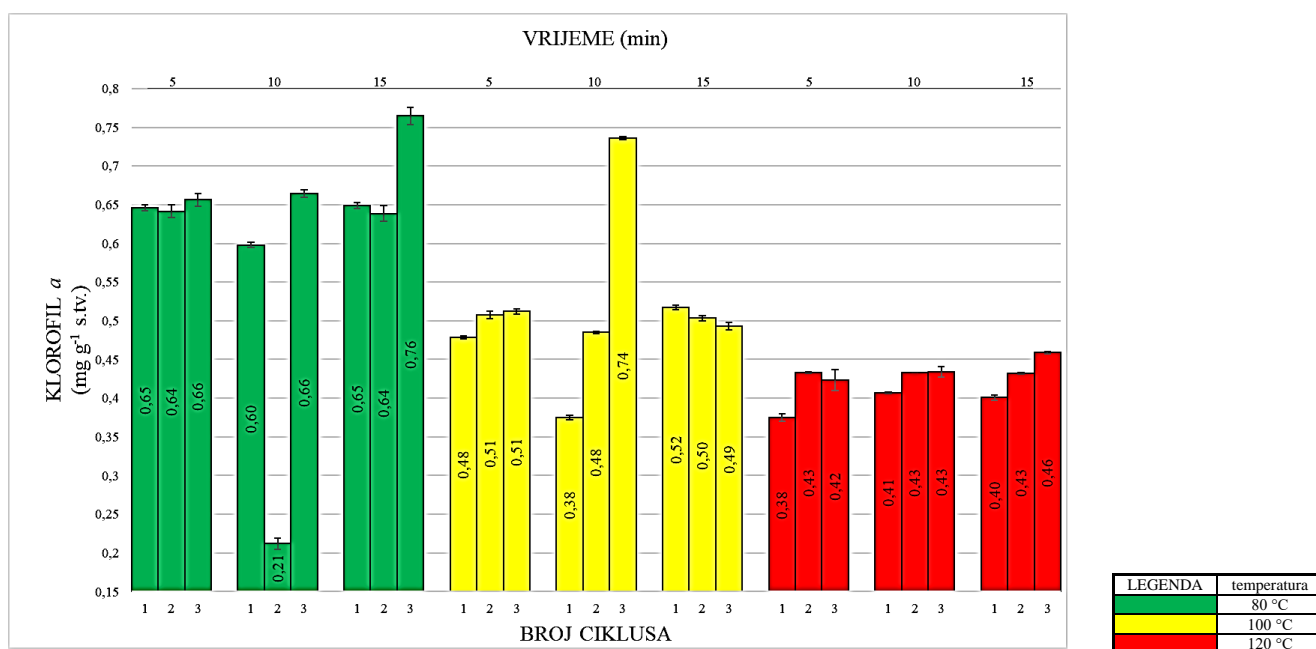
Općenito su dokazali da sušenje liofilizacijom daje bolje vrijednosti parametara kvalitete boje, sa svjetlijim, življim i zelenijim prahovima. Uspoređujući samo vrijednosti ukupnih klorofila određene u prethodno liofiliziranim listovima pasjeg trna s vrijednostima dobivenim u ovom istraživanju, gdje su listovi također bili sušeni liofilizacijom, najviši udio ukupnih klorofila određen je u 4 kultivara: Avgustinka ( $3,08 \pm 0,22 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ), Julia ( $2,97 \pm 0,21 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ), Otradnaja ( $2,97 \pm 0,22 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ) i Botaničeskaja ( $2,96 \pm 0,20 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ). Dobivene vrijednosti nešto su više od najviše vrijednosti dobivene u ovom istraživanju. Ekstrakcija je u njihovom istraživanju provedena na način da je određena količina uzorka prebačena u keramički tarionik s tučkom, dodana je prikladna količina ultračiste vode te je tarionik bio prekriven aluminijskom folijom 2 min. Rehidratiziranom uzorku lista pasjeg trna dodano je 5 g čistog kvarcnog pijeska te je na taj način uzorak usitnjen u tarioniku. Tako tretirani uzorak prebačen je u tikvicu s 80 %-tnom vodenom otopinom acetona, homogeniziran, centrifugiran, supernatant je odvojen i odmah podvrgnut analizi. Dakle, u odnosu na ovo istraživanje, koristili su drugu metodu ekstrakcije i drugo otapalo, što ujedno može biti razlog dobivenim višim vrijednostima u odnosu na vrijednosti dobivene u ovom istraživanju. Osim otapala i metode ekstrakcije, razlog može biti i različit kultivar biljke pasjeg trna te njezino porijeklo.

U istraživanju koje su proveli Guan i sur. (2005) dokazano je da se povećanjem temperature pri konvencionalnom sušenju značajno smanjuje ukupna koncentracija klorofila u listovima pasjeg trna. Vrijednosti koje su dobivene određivanjem udjela klorofila u uzorcima sušenim pri 50, 60, 80 i 100 °C iznosile su  $2,222 \pm 0,326$ ;  $1,493 \pm 0,054$ ;  $1,259 \pm 0,122$  i  $1,156 \pm 0,076 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$  Sve navedene vrijednosti niže su od najviše vrijednosti udjela ukupnih klorofila dobivene u ovom istraživanju, iz čega se zaključuje da je izbor metode sušenja od značajne važnosti. Nadalje, način ekstrakcije također se razlikuje od onog korištenog u ovom istraživanju, što isto tako može biti uzrok razlikama u dobivenim rezultatima. Guan i sur. (2005) ekstrakciju su proveli tako da su osušene usitnjene listove pasjeg trna homogenizirali s 80 %-tnom otopinom acetona, acetonske ekstrakte su centrifugirali, a supernatant je razrijeđen 10 puta 80 %-tnom vodenom otopinom acetona. Osim navedenog, izbor otapala također može utjecati na uspješnost izolacije spojeva.

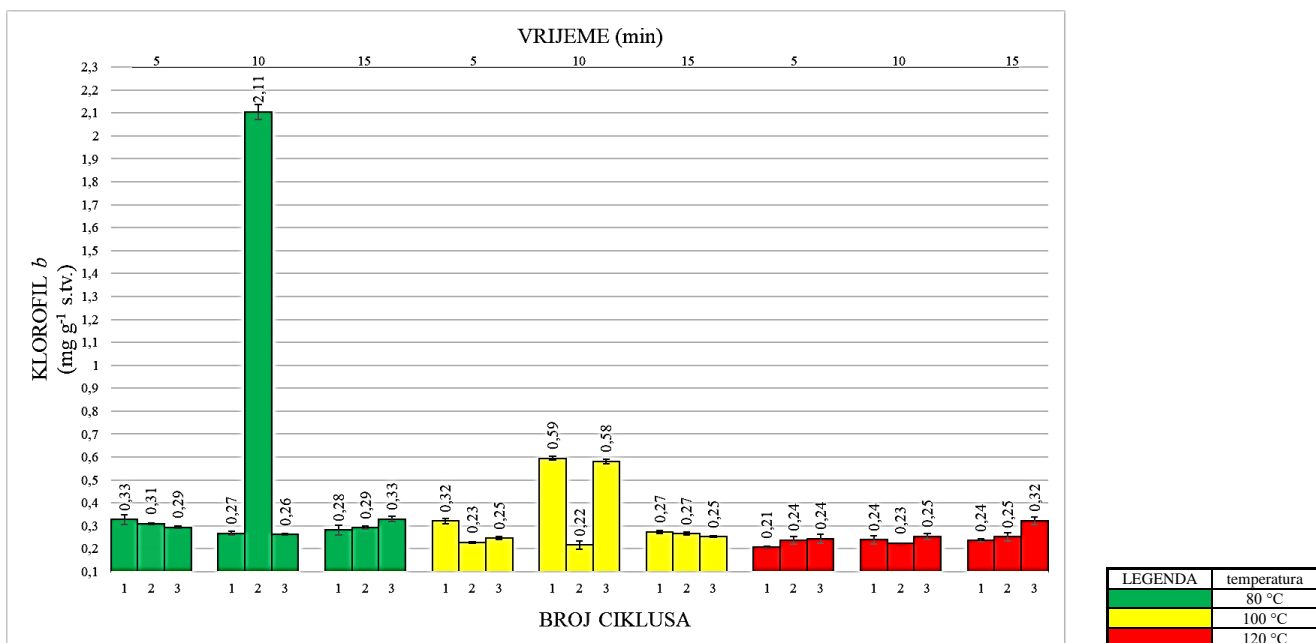
Slike 11 i 12 prikazuju grafički prikaz masenih udjela klorofila *a* i *b* u ekstraktima lista pasjeg trna. Iz grafova se može očitati da je udio klorofila *a* u ekstraktima lista pasjeg trna u većini slučajeva viši od udjela klorofila *b*. Jedina odstupanja, gdje je udio klorofila *b* viši od udjela klorofila *a*, bila su u ekstraktima dobivenim pri 80 °C, statičkom vremenu 10 min i 2 ciklusa te pri 100 °C, statičkom vremenu 5 min i 1 ciklusu. Upravo je pri uvjetima prvog

navedenog odstupanja količina izoliranog klorofila *a* najniža (0,21 mg g<sup>-1</sup> s.t.), a klorofila *b* najviša (2,11 mg g<sup>-1</sup> s.t.). Najviši udio klorofila *a* (0,76 mg g<sup>-1</sup> s.t.) izoliran je pri uvjetima od 80 °C, statičkom vremenu 15 min i 3 ciklusa, a najniži udio klorofila *b* (0,21 mg g<sup>-1</sup> s.t.) izoliran je pri 120 °C, statičkom vremenu 5 min te 1 ciklusu. Prosječna vrijednost udjela klorofila *a* izoliranog iz lista pasjeg trna iznosila je 0,51 mg g<sup>-1</sup> s.t., dok je prosječna vrijednost udjela klorofila *b* iznosila 0,36 mg g<sup>-1</sup> s.t.

Ono što se može zapaziti jest to da se najviši udio klorofila *a* i *b*, odnosno ukupnih klorofila uglavnom dobio ekstrakcijom pri najnižoj korištenoj temperaturi (80 °C). Veoma je važno, glede klorofila, definirati najvišu temperaturu koja omogućuje brzu ekstrakciju i visoke prinose, ali bez da se naruše termolabilni pigmenti (Pasquet i sur. 2011) koji pri nešto višim temperaturama mogu lako izomerizirati ili se razgraditi (Plaza i sur., 2010).



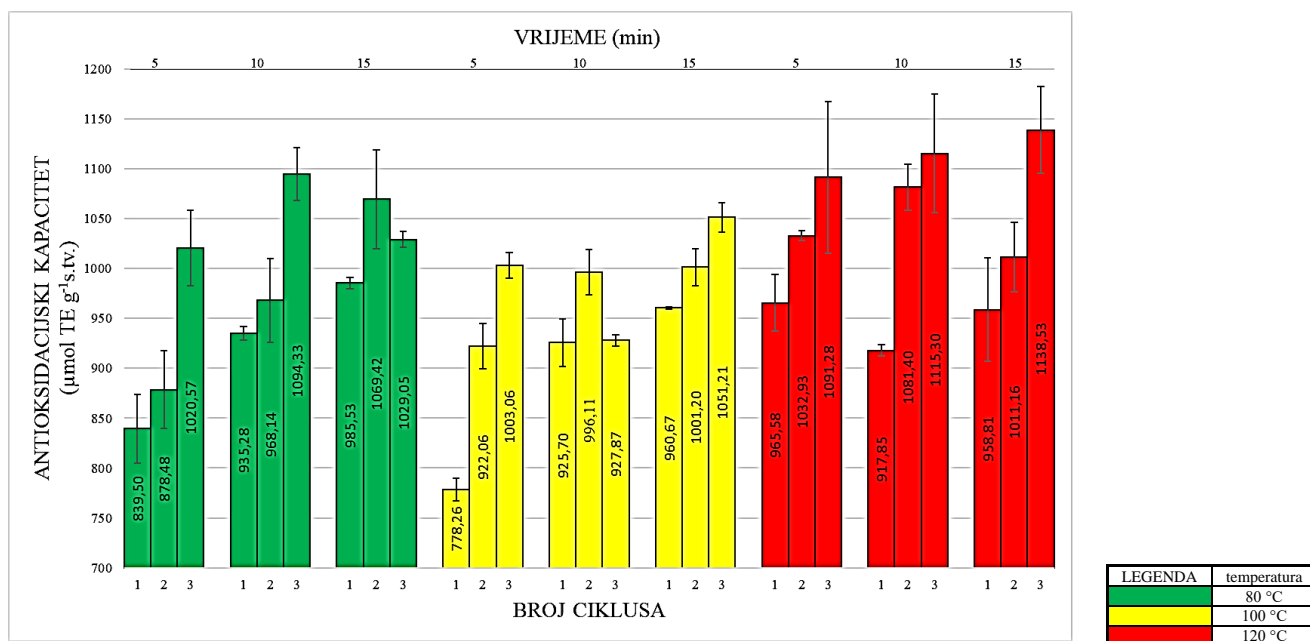
**Slika 11.** Udio klorofila *a* u ekstraktima lista pasjeg trna dobivenih primjenom ASE



**Slika 12.** Udio klorofila *b* u ekstraktima lista pasjeg trna dobivenih primjenom ASE

### 4.3. ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

Na slici 13 prikazane su vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određene u ekstraktima lista pasjeg trna dobivenih primjenom ASE.



**Slika 13.** Antioksidacijski kapacitet ekstrakata lista pasjeg trna dobivenih primjenom ASE

Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta određene su u rasponu od 778,26 do 1138,53  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.t. Najniža vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određena je u uzorku ekstrahiranom pri 100 °C, statičkom vremenu 5 min i 1 ciklusu, dok su uvjeti od 120 °C, statičko vrijeme 15 min i 3 ciklusa rezultirali najvišim antioksidacijskim kapacitetom (slika 13). Prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta svih uzoraka iznosila je 988,86  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.t.

U već spomenutom istraživanju Michel i sur. (2012) vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u etanolnom ekstraktu određivala se također FRAP metodom kojom je dobivena vrijednost 683,21  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.t. Ova vrijednost niža je i od najniže vrijednosti u ovom istraživanju iz čega se može zaključiti da je veoma bitno odabrati pravilne uvjete pri kojima se provodi ekstrakcija. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta dobivene u ovom istraživanju vjerojatno su više zbog korištene više temperature ekstrakcije koja omogućuje učinkovitiju izolaciju biološki aktivnih spojeva koji imaju antioksidacijsko djelovanje. Uzrok može biti i porijeklo pasjeg trna.

U istraživanju kojeg su proveli Kumar i sur. (2011) antioksidacijski kapacitet je iznosio 375,20  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.t. (maceracija), u ekstraktima dobivenim Soxhlet ekstrakcijom određen je rasponu od 579,29 do 870,07  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.t. dok je u ekstraktima dobivenim subkritičnom vodenom ekstrakcijom određen u rasponu od 875,10 do 1106,44  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.t. Odabir tehnike ekstrakcije jedan je od najvažnijih faktora koji definiraju uspješnost ekstrakcije. Antioksidacijski kapacitet u uzorku koji je prethodno maceriran znatno je niži od svih vrijednosti dobivenim u njihovom i u ovom istraživanju. Uz prethodnu Soxhlet ekstrakciju dobivene vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta malo su više, ali ipak nešto niže od vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju. Subkritična vodena ekstrakcija dala je najviše vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta, po čemu se može zaključiti da je ova tehnika najučinkovitija od triju primjenjivanih tehnika ekstrakcije u istraživanju Kumar i sur. (2011). S obzirom na maceraciju i Soxhlet ekstrakciju, ASE se smatra učinkovitijom tehnikom ekstrakcije, dok u ovom slučaju subkritična vodena ekstrakcija i ASE daju ekstrakte veoma bliskih vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta.

Uspoređujući vrijednosti dobivene u istraživanju Upadhyay i sur. (2010) vidljivo je da je antioksidacijski kapacitet određen FRAP metodom u njihovim uzorcima (458,19 i 612,97  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.t.) znatno niži od vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju. Time se još jednom pokazalo da je ekstrakcijska metoda jedan od najvažnijih čimbenika na koje se kod odabira treba obratiti pažnja. U ovom slučaju ASE je kvantitativno omogućila puno učinkovitiju



ekstrakciju spojeva koji su zaslužni za antioksidacijsku aktivnost. Može se zaključiti da je ASE mnogo učinkovitija od ekstrakcije koje su koristili Upadhyay i sur. (2010) koji su vodene i hidroalkoholne ekstrakte lista pasjeg trna dobili namakanjem praha suhih listova u vodenoj, odnosno 70 %-tnoj otopini etanola, na sobnoj temperaturi kroz 24 h. Isti postupak ponovljen je 3 puta. Supernatanti su filtrirani, centrifugirani, etanol je uparen pomoću rotavapora pri 40 °C, ekstrakti su liofilizirani i korišteni za daljnje analize. Osim FRAP metode, za određivanje antioksidacijskog kapaciteta autori su koristili i DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) te ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)] metode.

#### 4.4. UTJECAJ UVJETA ASE NA UDIO UKUPNIH FENOLA I KLOROFILA TE ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET

Tablica 3 prikazuje rezultate statističke analize utjecaja parametara ASE na udio ukupnih fenola i klorofila te antioksidacijski kapacitet u ekstraktima lista pasjeg trna dobivenih primjenom ASE. Statistička obrada podataka potvrdila je signifikantan utjecaj svih ispitivanih parametara ASE ekstrakcije.

**Tablica 3.** Utjecaj parametara ASE na udio ukupnih fenola i klorofila te antioksidacijski kapacitet lista pasjeg trna

Parametri ekstrakcije	Ukupni fenoli (mg GAE g <sup>-1</sup> s.t.)	Ukupni klorofili (mg g <sup>-1</sup> s.t.)	Antioksidacijski kapacitet (μmol TE g <sup>-1</sup> s.t.)
<b>Temperatura</b> (°C)	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*
80	87,71±0,62 <sup>a</sup>	1,10±0,00 <sup>c</sup>	980,03±7,61 <sup>b</sup>
100	92,38±0,62 <sup>b</sup>	0,84±0,00 <sup>b</sup>	951,79±7,61 <sup>a</sup>
120	100,31±0,62 <sup>c</sup>	0,67±0,00 <sup>a</sup>	1034,76±7,61 <sup>c</sup>
<b>Statičko vrijeme</b> (min)	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*
5	89,57±0,62 <sup>a</sup>	0,79±0,00 <sup>a</sup>	947,97±7,61 <sup>a</sup>
10	94,34±0,62 <sup>b</sup>	1,01±0,00 <sup>c</sup>	995,78±7,61 <sup>b</sup>
15	96,48±0,62 <sup>b</sup>	0,82±0,00 <sup>b</sup>	1022,84±7,61 <sup>c</sup>
<b>Broj ciklusa</b>	p<0,01*	p<0,01*	p<0,01*
1	87,86±0,62 <sup>a</sup>	0,80±0,00 <sup>a</sup>	918,57±7,61 <sup>a</sup>
2	93,37±0,62 <sup>b</sup>	0,94±0,00 <sup>c</sup>	995,66±7,61 <sup>b</sup>
3	99,17±0,62 <sup>c</sup>	0,88±0,00 <sup>b</sup>	1052,36±7,61 <sup>c</sup>
<b>Prosječna vrijednost</b>	<b>93,47</b>	<b>0,87</b>	<b>988,86</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna pogreška.

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

#### 4.4.1. Utjecaj uvjeta ASE na udio ukupnih fenola

Rezultati statističke analize pokazali su da je temperatura imala statistički značajan utjecaj ( $p < 0,01$ ) na udio ukupnih fenola u ekstraktima lista pasjeg trna (tablica 3). Iz rezultata je vidljivo da su najviši udjeli ukupnih fenola izolirani pri 120 °C (prosječna vrijednost  $100,31 \pm 0,62$  mg GAE  $g^{-1}$  s.t.), dok je pri 80 °C izoliran najniži udio ukupnih fenola (prosječna vrijednost  $87,71 \pm 0,62$  mg GAE  $g^{-1}$  s.t.). Može se primijetiti da je prinos ukupnih fenola izoliran pri 120 °C viši za 13 % od prinosa pri 80 °C.

Dobiveni rezultati potvrđuju tezu da se topljivost fenola povećava povišenjem temperature. Razlog tome je razaranje staničnih stijenki biljaka uslijed povišenja temperature te posljedično tome olakšan prodor otapala kroz stanične stijenke i omogućeno bolje otapanje fenola u ekstrakcijskom otapalu. Samim time omogućen je bolji prijenos mase između matriksa materijala i ekstrakcijskog medija, odnosno koeficijent prijenosa mase je veći (Asofiei i sur., 2016).

Statičko vrijeme ekstrakcije također je imalo signifikantan utjecaj na udio ukupnih fenola u ekstraktima lista pasjeg trna. Pri statičkom vremenu od 5 min određena je najniža prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola ( $89,57 \pm 0,62$  mg GAE  $g^{-1}$  s.t.), dok su pri vremenu od 10 i 15 min određene signifikantno više prosječne vrijednosti udjela ukupnih fenola ( $94,34 \pm 0,62$  i  $96,48 \pm 0,62$  mg GAE  $g^{-1}$  s.t.). Prinosi udjela ukupnih fenola dobivenih pri statičkom vremenu 10 i 15 min se međusobno nisu statistički razlikovali, a viši su za 5 do 7 % od prinosa dobivenog pri statičkom vremenu 5 min. Time se može zaključiti da je statičko vrijeme od 10 min dovoljno da se postigne zadovoljavajući prinos ukupnih fenola.

Biesaga i Pyrzyńska (2013) su dokazali da dužim vremenom ekstrakcije, uslijed ekstrakcije oksidacijskih enzima i slobodnih radikala, dolazi do nepoželjne degradacije fenola obzirom da oksidacijski enzimi i slobodni radikali reagiraju s ekstrahiranim fenolnim spojevima.

Osim temperature i vremena, učinkovitost ASE ekstrakcije ovisi i o broju ciklusa čije povećanje u ovom istraživanju pozitivno utječe na učinkovitost izolacije ukupnih fenola iz listova pasjeg trna. Broj ciklusa ekstrakcije imao je statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola. U ekstrakciji uz primjenu 1 ciklusa prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola iznosila je  $87,86 \pm 0,62$  mg GAE  $g^{-1}$  s.t., dok je uz primjenu 2 ciklusa određena prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola od  $93,37 \pm 0,62$  mg GAE  $g^{-1}$  s.t. Najviša prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola postignuta je u ekstrakciji uz 3 ciklusa ( $99,17 \pm 0,62$  mg GAE  $g^{-1}$  s.t.) što je za 6 % više od primijenjena dva, odnosno za 11 % više od primijenjenog jednog ciklusa.

Sumiranjem rezultata statističke analize vidljivo je da ekstrakcija pri 120 °C, 15 min i uz 3 ciklusa daje najviše prinose ukupnih fenola iz lista pasjeg trna.

#### 4.4.2. Utjecaj uvjeta ASE na udio ukupnih klorofila

Rezultati statističke analize pokazali su da su sva 3 ispitivana parametra ekstrakcije (temperatura, statičko vrijeme i broj ciklusa) imala signifikantan utjecaj na udio ukupnih klorofila (tablica 3). Vezano za utjecaj temperature, ekstrakcija pri 80 °C rezultirala je najvišim prinosom ukupnih klorofila ( $1,10 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ) što je za 24, odnosno 39 % više od ukupnih klorofila ekstrahiranih pri 100 i 120 °C. Ekstrakcijom pri 120 °C izoliran je najniži prinos ukupnih klorofila ( $0,67 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ).

Repajić i sur. (2020) dokazali su da se prinos ukupnih klorofila i prinos ukupnih karotenoida u listovima samonikle koprive udvostručio porastom temperature. Ekstrakciju su provodili pri 20, 50, 80 i 110 °C. Međutim, kod nekih uzoraka bilo je odstupanja, gdje je najviši prinos zabilježen pri 80 °C, dok se pri višoj temperaturi prinos počeo smanjivati. Sličan trend se može primijetiti u ovom istraživanju, gdje je optimalna temperatura pri kojoj je prinos ukupnih klorofila bio najviši bila 80 °C.

Pasquet i sur. (2011) također napominju važnost pravilnog odabira temperature ekstrakcije. Poželjno je da zbog brze ekstrakcije s visokim prinosima temperatura bude što viša, međutim zbog mogućih oštećenja termolabilnih pigmenata na visokim temperaturama ključno je odabrati optimalnu temperaturu.

Prosječne vrijednosti udjela ukupnih klorofila koje su dobivene s obzirom na varijaciju statičkog vremena također se međusobno statistički značajno razlikuju. Najviša prosječna vrijednost iznosi  $1,01 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ , a odnosi se na primjenu statičkog vremena 10 min. Ova vrijednost je za 22, odnosno 19 % viša od prosječnih vrijednosti za statičko vrijeme 5 i 15 min te se stoga može zaključiti da je statičko vrijeme 10 min optimalno za postizanje zadovoljavajućeg prinosa ukupnih klorofila.

Već spomenuto istraživanje Repajić i sur. (2020), gdje je 10 min statičkog vremena također rezultiralo najvišim prinosom ukupnih pigmenata, u skladu je s dobivenim rezultatima ovog istraživanja.

Produljenjem vremena ekstrakcije ne povećava se nužno koncentracija pigmenata. Štoviše, produljenjem vremena ekstrakcije može doći do degradacije pigmenata, a negativno se utječe i na ekonomsku isplativost procesa ASE (Santos i sur., 2012).

Broj ciklusa ekstrakcije također je imao signifikantan utjecaj na udio ukupnih klorofila. U ekstrakciji uz primjenu 1 ciklusa prosječna vrijednost udjela ukupnih klorofila iznosila je  $0,80 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ , uz primjenu 3 ciklusa određena je prosječna vrijednost udjela ukupnih klorofila od  $0,88 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ , dok je najviša prosječna vrijednost udjela ukupnih klorofila određena u ekstrakciji uz 2 ciklusa ( $0,94 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ) što je za 15 % više od vrijednosti dobivene uz 1 ciklus, odnosno 6 % uz primjenu 3 ciklusa.

S obzirom da je uz primjenu 2 ciklusa dobivena najviša prosječna vrijednost udjela ukupnih klorofila, može se zaključiti da daljnje povećanje broja ciklusa nije potrebno. Sličan trend zabilježili su Taucher i sur. (2016) koji su provodili ekstrakciju karotenoida iz mikroalgi i zaključili da je prvim ciklusom ekstrahirano 99 % karotenoida te da provedba dodatnih ciklusa ekstrakcije uvelike ne utječe na veće prinose karotenoida.

Međutim, suprotno rezultatima ovog istraživanja, Repajić i sur. (2020) došli su do zaključka da je najviši prinos pigmenata u ekstraktima listova koprive dobiven pri maksimalnom broju ciklusa (4).

Sumiranjem dobivenih rezultata može se utvrditi da je najviši udio ukupnih klorofila izoliran primjenom  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min i uz 2 ciklusa (tablica 3).

#### 4.4.3. Utjecaj uvjeta ASE na antioksidacijski kapacitet

Iz rezultata prikazanih u tablici 3 vidljivo je da temperatura ima statistički značajan utjecaj na vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Kod uzoraka koji su ekstrahirani pri  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  određena je najviša prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ( $1034,76 \pm 7,61 \text{ } \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ s.t.}$ ). Najviši udjeli ukupnih fenola također su izolirani pri  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  što upućuje na to da su upravo fenoli glavni spojevi koji doprinose antioksidacijskoj aktivnosti.

Statičko vrijeme imalo je signifikantan utjecaj na antioksidacijski kapacitet, a dobivene prosječne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta se međusobno statistički značajno razlikuju pri različitim statičkim vremenima. Najvišom prosječnom vrijednošću antioksidacijskog kapaciteta ( $1022,84 \pm 7,61 \text{ } \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ s.t.}$ ) karakterizirani su ekstrakti dobiveni uz statičko vrijeme 15 min te je ova vrijednost za 7, odnosno 3 % viša od vrijednosti dobivenih primjenom

statičkog vremena od 5 i 10 min. Prosječne vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima dobivenim uz statičko vrijeme od 5 i 10 min iznosile su  $947,97 \pm 7,61$  i  $995,78 \pm 7,61$   $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.t. Jaime i sur. (2005) provodili su istraživanje na mikroalgi *Spirulina platensis* te su također ekstrakt najvišeg antioksidacijskog kapaciteta dobili pri višoj temperaturi i duljim vremenom ekstrakcije.

Osim temperature i statičkog vremena, signifikantan utjecaj na antioksidacijski kapacitet imao je i broj ciklusa. U ekstraktima uz primjenu 1 ciklusa dobivena je prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta  $918,57 \pm 7,61$   $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.t., nešto viša prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta karakterizirala je ekstrakte dobivene uz primjenu 2 ciklusa ( $995,66 \pm 7,61$   $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.t.), a najviša prosječna vrijednost antioksidacijskog kapaciteta odnosi se na ekstrakte dobivene primjenom 3 ciklusa ( $1052,36 \pm 7,61$   $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  s.t.), što je za 13, odnosno 5 % više od vrijednosti u ekstraktima dobivenim uz primjenu 1 ili 2 ciklusa.

Sumiranjem svega navedenog može se zaključiti da su najpovoljniji uvjeti koji rezultiraju najvišim antioksidacijskim kapacitetom, temperatura  $120$  °C i statičko vrijeme 15 min uz 3 ciklusa ekstrakcije.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da su uvjeti koji omogućuju najviši prinos fenola te najviši antioksidacijski kapacitet gotovo isti pa se može zaključiti da postoji korelacija između antioksidacijskog kapaciteta i udjela fenola, što upućuje na to da su glavni doprinosi antioksidacijskoj aktivnosti upravo fenoli. Isti su zaključak donijeli i Korekar i sur. (2011) koji su provodili ekstrakciju ploda, sjemena, listova i stabljike pasjeg trna različitim otapalima.

Repajić i sur. (2020) su antioksidacijski kapacitet mjerili ORAC metodom (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*). Kao optimalne parametre za dobivanje ekstrakata listova samonikle koprive s najvišim vrijednostima antioksidacijskog kapaciteta odredili su temperaturu od  $80$  °C, statičko vrijeme 10 min i 4 ciklusa, što je (izuzev ciklusa) niža temperatura i kraće vrijeme ekstrakcije u usporedbi s rezultatima ovog istraživanja.

Sukladno ovom istraživanju, Hossain i sur. (2011) su kao optimalnu temperaturu za dobivanje ekstrakata ružmarina, mažurana i origana s najvišim antioksidacijskim kapacitetom odredili  $129$  °C. Na višim temperaturama zabilježen je pad vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta. Potvrđuju već dokazanu činjenicu da se topljivost mnogih spojeva, pa tako i onih odgovornih za antioksidacijski kapacitet, povećava povišenjem do određene temperature, nakon čega slijedi degradacija tih istih spojeva. Povišenjem temperature veća je i brzina difuzije spojeva, što posljedično rezultira njihovom boljom ekstrakcijom. Navode da ASE tehnika nudi

jedinstvenu mogućnost korištenja visoke temperature pri vrlo visokom tlaku, dok istovremeno sprječava degradaciju ekstrahiranih spojeva kao posljedica povećanja stabilnosti kovalentnih veza unutar molekula uslijed visokog tlaka.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja te provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Udio ukupnih fenola u liofiliziranom listu pasjeg trna određen je u rasponu od 69,05 do 112,96 mg GAE g<sup>-1</sup> s.t., udio ukupnih klorofila od 0,58 do 2,36 mg g<sup>-1</sup> s.t., klorofila *a* od 0,21 do 0,76 mg g<sup>-1</sup> s.t., klorofila *b* od 0,21 do 2,11 mg g<sup>-1</sup> s.t., dok je antioksidacijski kapacitet određen u rasponu od 766,72 do 1182,02 μmol TE g<sup>-1</sup> s.t.
2. List pasjeg trna korišten u ovom istraživanju sadrži viši udio klorofila *a* (prosječna vrijednost 0,51 mg g<sup>-1</sup> s.t.) u odnosu na klorofil *b* (prosječna vrijednost 0,36 mg g<sup>-1</sup> s.t.).
3. Utvrđeno je da je ASE uz korištenje 70 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala učinkovita metoda za uspješnu ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz liofiliziranog lista pasjeg trna.
4. Sva tri ispitivana parametra ASE (temperatura, statičko vrijeme i broj ciklusa ekstrakcije) imali su statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola, ukupnih klorofila i antioksidacijski kapacitet u ekstraktima lista pasjeg trna.
5. ASE parametri pri kojima je izoliran najviši udio ukupnih fenola bili su 120 °C, 10 min i 3 ciklusa, dok je najviša vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određena u ekstraktima dobivenim pri 120 °C, 15 min i 3 ciklusa ekstrakcije. Najviši udio ukupnih klorofila dobiven je pri 80 °C, 10 min i 2 ciklusa ekstrakcije.



## 6. LITERATURA

Alvarez-Rivera G, Bueno M, Ballesteros-Vivas D, Mendiola JA, Ibanez E (2020) Pressurized Liquid Extraction. U: Poole CF (ured.) Liquid-Phase Extraction, Elsevier Inc., Amsterdam/Oxford/Cambridge, str. 375-394.

Anonymus 1. (1997) Chlorophyll  
<[http://www.chm.bris.ac.uk/motm/chlorophyll/chlorophyll\\_h.htm](http://www.chm.bris.ac.uk/motm/chlorophyll/chlorophyll_h.htm)> Pristupljeno 11. listopada 2021.

Asofiei I, Calinescu I, Trifan A, David IG, Gavrilă AI (2016) Microwave-assisted batch extraction of polyphenols from sea buckthorn leaves. *Chem Eng Commun* **203**(12), 1547–1553. <https://doi.org/10.1080/00986445.2015.1134518>

Benzie IFF (1996) An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clin Biochem* **29**(2), 111-116. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)02013-6)

Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Biochem* **239**(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Biesaga M, Pyrzyńska K (2013) Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chem* **136**, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.095>

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**, 109170. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109170>

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

Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

Dragović S (2020) Optimiranje procesa ekstrakcije i destilacije bioaktivnih spojeva iz lista tršlje (*Pistacia lentiscus L.*) (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

- Drmić H, Režek Jambrak A (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol* **2(2)**, 22-33.
- Drosou C, Kyriakopoulou K, Bimpilas A, Tsimogiannis D, Krokida M (2015) A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Ind Crop Prod* **75**, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.063>
- Franjić J, Horvat G, Krstonošić D (2016) Novo nalazište i sintaksonomske značajke pasjega trna (*Hippophaë rhamnoides* L., *Elaeagnaceae*) u Hrvatskoj. *Sumar List* **140(3-4)**, 111–115. <https://doi.org/10.31298/sl.140.3-4.1>
- Gan J, Papiernik SK, Koskinen WC, Yates SR (1999) Evaluation of accelerated solvent extraction (ASE) for analysis of pesticide residues in soil. *Environ Sci Technol* **33**, 3249-3253. <https://doi.org/10.1021/es990145+>
- Giergielewicz-Możajska H, Dąbrowski Ł, Namieśnik J (2001) Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples — Some Aspects of Theory and Practice. *Crit Rev Anal Chem* **31(3)**, 149–165. <https://doi.org/10.1080/20014091076712>
- Goncharova NP, Glushenkova AI (1993) Lipids of the leaves of Central Asian forms of sea buckthorn. *Chem Nat Compd* **29(6)**, 797-798. <https://doi.org/10.1007/BF00629656>
- Goncharova NP, Glushenkova AI (1995a) Epicuticular and intracellular lipids of *Hippophae rhamnoides* leaves. *Chem Nat Compd* **31(6)**, 665-671. <https://doi.org/10.1007/BF01386175>
- Goncharova NP, Glushenkova AI (1995b) Polar lipids of *Hippophae rhamnoides* leaves. *Chem Nat Compd* **31(5)**, 562-564. <https://doi.org/10.1007/BF01164879>
- Goncharova NP, Glushenkova AI (1996) Lipids of the leaves of two forms of central Asian sea buckthorn. ). *Chem Nat Compd* **32(4)**, 585-586. <https://doi.org/10.1007/BF01372620>
- Guan TT, Cenkowski S, Hydamaka A (2005) Effect of drying on the nutraceutical quality of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis*) leaves. *J Food Sci* **70(9)**, E514-E518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb08312.x>
- Hossain MB, Barry-Ryan C, Martin-Diana AB, Brunton NP (2011) Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus*

*officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chem* **126(1)**, 339-346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.076>

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje (2021a) Klorofil. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=31988> Pristupljeno 23. veljače 2022.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje (2021b) Karotenoidi. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=30645> Pristupljeno 23. veljače 2022.

Jaime L, Mendiola JA, Herrero M, Soler-Rivas C, Santoyo S, Señorans FJ, i sur. (2005) Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *J Sep Sci* **28(16)**, 2111–2119. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500185>

Korekar G, Stobdan T, Singh H, Chaurasia O, Singh S (2011) Phenolic content and antioxidant capacity of various solvent extracts from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit pulp, seeds, leaves and stem bark. *Acta Aliment Hung* **40(4)**, 449–458. <https://doi.org/10.1556/aalim.40.2011.4.4>

Kumar MY, Dutta R, Prasad D, Misra K (2011) Subcritical water extraction of antioxidant compounds from Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant activity. *Food chem* **127(3)**, 1309-1316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.088>

Lianfu Z, Zelong L (2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason Sonochem* **15(5)**, 731-737. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.12.001>

Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Curr protoc food anal chem* **1(1)**, F4.3.1–F4.3.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>

Michel T, Destandau E, Le Floch G, Lucchesi ME, Elfakir C (2012) Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chem* **131(3)**, 754-760. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.029>

- Mohammedelnour AA, Mirghani MES, Kabbashi, N. A., Alam, M. Z., Musa, K. H., Aminah Abdullah (2017) Effect of solvent types on phenolics content and antioxidant activities of *Acacia polyacantha* gum. *Int Food Res J* **24**, 369-377.
- Mottaleb MA, Sarker SD (2012) Accelerated solvent extraction for natural products isolation. U: Sarker SD, Nahar L (ured.) *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology*, 3. izd., Humana Press, Totowa, str. 75-88.
- Nayak B, Dahmoune F, Moussi K, Remini H, Dairi S, Aoun O, i sur. (2015) Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chem* **187**, 507-516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.081>
- Nikolić T, Topić J (2005) *Crvena knjiga vaskularne flore Hrvatske*, Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, str. 99-101.
- Ozturk M, Hakeem KR, Ashraf M, Ahmad MSA (2018) *Global perspectives on underutilized crops*. Springer, Cham.
- Park MG, Joo SY (2021) Comparison of antioxidant activities of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extracts at different ethanol ratios. *Korean J Food Sci Technol* **53(1)**, 55-62. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2021.53.1.55>
- Pasquet V, Chérouvriera JR, Farhata F, Thiérya V, Piota JM, Bérardb JB, i sur. (2011) Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochem* **46**, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.009>
- Plaza M, Santoyo S, Jaime L, García-Blairsy Reina G, Herrero M, Señoráns FJ, Ibáñez E (2010) Screening for bioactive compounds from algae. *J Pharm Biomed Anal* **51(2)**, 450-455. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.016>
- Raudone L, Puzerytė V, Vilkickyte G, Niekyste A, Lanauskas J, Viskelis J, Viskelis P (2021) Sea buckthorn leaf powders: The impact of cultivar and drying mode on antioxidant, phytochemical, and chromatic profile of valuable resource. *Molecules* **26(16)**, 4765. <https://doi.org/10.3390/molecules26164765>
- Repajić M, Cegledi E, Kruk V, Pedisić S, Çınar F, Bursać Kovačević D, Žutić I, Dragović-Uzelac V (2020) Accelerated Solvent extraction as a green tool for the recovery of

polyphenols and pigments from wild nettle leaves. *Processes* **8(7)**, 803. <https://doi.org/10.3390/pr8070803>

Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porter NL, Avdalovic N, Pohl C (1996) Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Anal Chem* **68(6)**, 1033-1039. <https://doi.org/10.1021/ac9508199>

Rubinskienė M, Viškelis P, Dambrauskienė E, Viškelis J, Karklelienė R (2015) Effect of drying methods on the chemical composition and colour of peppermint (*Mentha× piperita* L.) leaves. *Zemdirbyste* **102(2)**, 223-228 <https://doi.org/10.13080/z-a.2015.102.029>

Santos DT, Veggi PC, Angela M, Meireles A (2012) Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. *J Food Eng* **108**, 444-452. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.022>

Shipulina LD, Tolkachev ON, Krepkova LV, Bortnikova VV, Shkarenkov AA (2006) Anti-viral, anti-microbial and toxicological studies on seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) U: Singh V, Yang B, Kallio H, Bala M, Sawhney RC, Gupta RK, Mörsel JT, Lu RongSen, Tolkachev ON (ured.) Seabuckthorn (*Hippophae* L.). A multipurpose wonder plant. Daya Publishing House, Delhi, 471-483.

Shortle E, O'Grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP, (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98(4)**, 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>

Stobdan 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 Altitudes. *Def Sci J* **60**, 226-230.

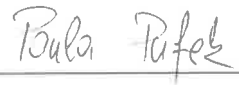
Tandon S, Rane S (2008) Decoction and Hot Continuous Extraction Techniques U: Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD (ured.) Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, International Centre for Science and High Technolog, Trst, str. 93-96.

Taucher J, Baer S, Schwerna P, Hofmann D, Hümmer M, Buchholz R, Becker A (2016) Cell disruption and pressurized liquid extraction of carotenoids from microalgae. *J Thermodyn Catal* **7**, 1-7.

- Thomas SCL, Schroeder WR, (1996) Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A Multipurpose Plant. *HortTechnology* **6(4)**, 370-380. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.6.4.370>
- Tigong C, Ni MK, Li R, Ji F (1991) Investigation of the biological properties of central Asian sea buckthorn growing in the province of Kansu (China). *Chem. Nat Compd* **27(1)**, 119-121. <https://doi.org/10.1007/BF00629848>
- Tkacz K, Gil-Izquierdo Á, Medina S, Turkiewicz IP, Domínguez-Perles R, Nowicka P, Wojdyło A (2022) Phytoprostanes, phytofurans, tocopherols, tocotrienols, carotenoids and free amino acids and biological potential of sea buckthorn juices. *J Sci Food Agr* **102(1)**, 185-197. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11345>
- Upadhyay NK, Kumar MY, Gupta A (2010) Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food Chem Toxicol* **48(12)**, 3443-3448. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.019>
- Valíček P, Havelka EV (2008) *Hippophae rhamnoides* (in Czech). Start, Benešov.
- Wang L, Weller CL (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol* **17**, 300-312. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- 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(4)**, 1939-1947. <https://doi.org/10.1021/jf001059s>
- Zadernowski R, Naczek M, Czaplicki S, Rubinskiene M, Szałkiewicz M (2005) Composition of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries. *J am oil chem soc* **82(3)**, 175-179. <https://doi.org/10.1007/s11746-005-5169-1>
- Zhan Y, Ta W, Tang W, Hua R, Wang J, Wang C, Lu W (2021) Potential antiviral activity of isorhamnetin against SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus in vitro. *Drug Develop Res* **82(8)**, 1124-1130. <https://doi.org/10.1002/ddr.21815>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja PAULA PUFEK 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