

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija bioaktivnih molekula ploda pasjeg trna

Marić, Antea

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:159:355692>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Antea Marić

**ULTRAZVUKOM
POTPOMOŠNUTA EKSTRAKCIJA
BIOAKTIVNIH MOLEKULA
PLODA PASJEG TRNA**

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



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

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Sandri Pedisić na stručnom vodstvu prilikom pisanja diplomskog rada. Zahvaljujem se i mag. ing. techn. aliment. Patriciji Čulini na pomoći i smjernicama prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada te uloženom vremenu, trudu i strpljenju tijekom obrade rezultata.

Hvala i svim djelatnicima Laboratorija za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva koji su svojom toplinom i pristupačnošću učinili da mi rad s njima ostane u divnom sjećanju.

Zahvaljujem se mami Silviji, tati Denisu, sestri Samanti i bratu Domagoju na podršci tijekom cijeloga studija.

Hvala i mojim prijateljima koji su bili uz mene, prolazili samnom sve uspone i padove i gurali me prema naprijed. Osobito hvala mojoj Doris za neizmjereno veliku podršku i vjeru u moj uspjeh.

*I na kraju, najveća hvala Bogu bez kojega ništa od ovoga ne bi bilo ostvareno.
„Sve mogu u Onome koji me jača!“ – Fil 4, 13*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

ULTRAZVUKOM POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH MOLEKULA PLODA PASJEG TRNA

Antea Marić, univ. bacc. nutr. 0058208205

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (UAE) primjenom različitih otapala (30 i 70 %-tna vodena otopina etanola, *n*-heksan i aceton) i vremena ekstrakcije (20, 30 i 40 min) na sadržaj hidrofilnih i lipofilnih bioaktivnih molekula (BM) plodova pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides*) te odrediti njihovu antioksidacijsku aktivnost (AA). Najviši udjeli ukupnih fenolnih spojeva određeni su u sorti „*Ascola*“, a najzastupljeniji spoj bio je flavonol izoramnetin-3-heksozid (69,73 g 100 g⁻¹ s. tv.) te vitamin C (289 mg 100 g⁻¹ s.tv.). Najviši udjeli ukupnih karotenoida određeni su u sorti „*Leikora*“ (73,61 mg 100 g⁻¹ s. tv.), a najzastupljeniji je bio lutein palmitat (21,85 mg 100 g⁻¹ s. tv.). U sorti „*Leikora*“ određena je veća AA (2755,95 μmol TE 100 g⁻¹ s. tv.). Bolja učinkovitost UAE hidrofilnih BM postignuta je primjenom 70 %-tne vodene otopine etanola i vremena od 20 min, a lipofilnih primjenom acetona i vremena od 30 min.

Ključne riječi: *bioaktivne molekule, plod pasjeg trna, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, ORAC antioksidacijska aktivnost*

Rad sadrži: 57 stranica, 9 slika, 15 tablica, 69 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Sandra Pedisić

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Maja Repajić (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Sandra Pedisić (mentor)
3. prof. dr. sc. Sandra Balbino (član)
4. doc. dr. sc. Zoran Zorić (zamjenski član)

Datum obrane: 15. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION OF BIOACTIVE MOLECULES OF SEA-BUCKTHORN FRUIT

Antea Marić, univ. bacc. nutr. 0058208205

Abstract: The aim of this study was to evaluate the influence of ultrasound assisted extraction (UAE) using different solvents (30 and 70% ethanol, *n*-hexane and acetone) and extraction time (20, 30 and 40 min) on the content of hydrophilic and lipophilic bioactive molecules (BM) of sea-buckthorn fruit (*Hippophae rhamnoides*) and to determine the antioxidant activity (AA). The higher total phenolic content was found in the variety “*Ascola*”, and isorhamnetin-3-hexoside (69.73 mg 100 g⁻¹ dm) and vitamin C (289 mg 100 g⁻¹ dm) were the most abundant. The higher carotenoid content was determined in variety “*Leicora*” (73,61 mg 100 g⁻¹ dm) dominated by lutein palmitate (21.85 mg 100 g⁻¹ dm) as well as higher AA (2755.95 μmol TE 100 g⁻¹ dm). Better UAE efficiency for hydrophilic BM was obtained by using 70% ethanol as solvent and extraction time of 20 min and acetone and 30 min for lipophilic BM.

Keywords: *bioactive molecules, sea-buckthorn fruit, ultrasound assisted extraction, ORAC antioxidant activity*

Thesis contains: 57 pages, 9 figures, 15 tables, 69 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *Sandra Pedisić, PhD, Assistant Professor*

Technical support and assistance: *Patricija Čulina, PhD Research Assistant*

Reviewers:

1. Maja Repajić, PhD, Assistant professor (president)
2. Sandra Pedisić, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Sandra Balbino, PhD, Full professor (member)
4. Zoran Zorić, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: July 15th, 2022

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PASJI TRN (<i>Hippophae rhamnoides</i>)	2
2.1.1. Osnovne karakteristike pasjeg trna	2
2.1.2. Bioaktivne molekule pasjeg trna.....	3
2.1.2.1. Fenolni spojevi.....	3
2.1.2.2. Pigmenti	5
2.1.2.3. Vitamin C.....	6
2.1.3. Upotreba pasjeg trna i utjecaj na zdravlje.....	7
2.2. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH MOLEKULA	9
2.2.1. Klasične metode ekstrakcije	10
2.2.2. Napredne metode ekstrakcije.....	10
2.2.2.1. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UAE)	11
2.3. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA BIOAKTIVNIH MOLEKULA	13
2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	13
2.3.2. Vezani sustav tekućinske kromatografije i dvojne spektrometrije masa (LC-MS/MS) 14	
2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST BIOAKTIVNIH MOLEKULA.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. UZORAK PLODA PASJEG TRNA.....	16
3.2. ODREĐIVANJE UKUPNE SUHE TVARI LIOFILIZIRANIH PLODOVA PASJEG TRNA	16
3.2.1. Aparatura i pribor.....	16
3.3. EKSTRAKCIJA PIGMENATA IZ LIOFILIZIRANIH PLODOVA PASJEG TRNA PRIMJENOM ULTRAZVUKA	17
3.3.1. Kemikalije.....	17
3.3.2. Aparatura i pribor.....	17
3.3.3. Postupak ekstrakcije	18
3.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA I VITAMINA C IZ LIOFILIZIRANIH PLODOVA PASJEG TRNA PRIMJENOM ULTRAZVUKA	18
3.4.1. Kemikalije.....	18
3.4.2. Aparatura i pribor.....	18
3.4.3. Postupak ekstrakcije:	18
3.5. ODREĐIVANJE KAROTENOIDA PRIMJENOM HPLC-UV VIS/DAD METODE.....	19

3.5.1.	Kemikalije.....	19
3.5.2.	Aparatura i pribor.....	19
3.5.3.	Kromatografska analiza	19
3.6.	ODREĐIVANJE FENOLNIH SPOJEVA I VITAMINA C PRIMJENOM LC-MS/MS METODE.....	20
3.6.1.	Kemikalije.....	20
3.6.2.	Aparatura i pribor.....	20
3.6.3.	Postupak određivanja	20
3.7.	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ORAC METODOM	24
3.7.1.	Kemikalije.....	24
3.7.2.	Aparatura i pribor.....	25
3.7.3.	Postupak određivanja	25
3.8.	OBRADA REZULTATA.....	26
4.	REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1.	BIOAKIVNI SPOJEVI PLODA PASJEG TRNA	28
4.1.1.	Utjecaj parametara UAE na udio fenolnih spojeva u liofiliziranom plodu pasjeg trna	28
4.1.2.	Utjecaj UAE na udio askorbinske kiseline u liofiliziranom plodu pasjeg trna	38
4.1.3.	Utjecaj parametara UAE na udio ukupnih i pojedinih pigmenata u liofiliziranom plodu pasjeg trna	40
4.1.4.	Utjecaj UAE na antioksidacijsku aktivnost	45
5.	ZAKLJUČCI.....	48
6.	LITERATURA.....	49

1. UVOD

Užurbani način života učinio je da ljudi kuhinje u svojim domovima zamijene lancima brze prehrane, a tjelesnu aktivnost sjedenjem pred računalom. Zbog takvog načina života sve je veća prevalencija kroničnih bolesti u svijetu čijem razvoju doprinosi i svakodnevna izloženost velikoj količini stresa. Upravo iz tog razloga znanstvenici su u posljednje vrijeme okrenuti ka istraživanju bioaktivnih molekula različitih biljaka koje će štititi zdravlje i poboljšati kvalitetu života.

Pasji trn (*Hippophae rhamnoides*) grmolika je zimzelena biljka koja se svakodnevno koristi stoljećima. Posljednjih godina privlači pozornost mnogih znanstvenika kao bogat izvor različitih bioaktivnih molekula koje dokazano blagotvorno djeluju na zdravlje ljudi. Od bioaktivnih molekula sadrži fenolne spojeve, vitamine, karotenoide, organske kiseline, sterole i esencijalne masne kiseline po kojima se ističe od ostalih biljaka obzirom da uz omega-3 i omega-6 masne kiseline sadrži i omega-7 te omega-9 masne kiseline.

Bioaktivni spojevi prisutni u biljkama poput fenolnih spojeva, karotenoida i askorbinske kiseline djeluju antioksidativno te se ekstrahiraju već dulji niz godina klasičnim metodama ekstrakcije i analiziraju. Napretkom tehnologije unaprijeđene su i metode ekstrakcije kojima se nastoji u što kraćem vremenu ekstrahirati što veći udio bioaktivnih spojeva, a da ne dođe do njihove degradacije. Napredne metode ekstrakcije, koje se najčešće primjenjuju te optimiziraju i validiraju s obzirom na bioaktivne spojeve koji se žele ekstrahirati, su ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija hladnom atmosferskom plazmom te ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti udio bioaktivnih molekula u dvije sorte pasjeg trna i utvrditi utjecaj parametara ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (ekstrakcijsko otapalo i vrijeme ekstrakcije) na sadržaj fenolnih spojeva, vitamina C i pigmenata u liofiliziranim plodovima dvije sorte pasjeg trna te odrediti antioksidacijsku aktivnost dobivenih ekstrakata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PASJI TRN (*Hippophae rhamnoides*)

2.1.1. Osnovne karakteristike pasjeg trna

Pasji ili vučji trn (*Hippophae rhamnoides*) zimzeleni je grm koji pripada obitelji *Elaeagnaceae*. Može preživjeti u ekstremnim uvjetima kao što su siromašno tlo i ekstremne temperature u rasponu od -40 do +40 °C (Ciesarová i sur., 2020). Pasji trn je dvodomni bodljikavi grm koji može narasti i do 7 m. Ima duguljaste tanke listove koji su s donje strane prekriveni srebrnim dlačicama. Grm cvate krajem travnja do početka svibnja stvarajući veliki broj sitnih zelenih i smeđih cvjetova koji rastu zajedno u grozdovima. Tijekom rujna dolazi do zrenja plodova te se formiraju bobice okruglog oblika žute, crvene ili narančaste boje (Slika 1) (Jaśniewska i Diowks, 2021). Bobice odlikuje gorki okus popraćen osjećajem trpkosti (Ma i sur., 2017). Iako je podrijetlom iz Kine, grmovi pasjeg trna mogu se naći i u raznim planinskim dijelovima Europe i Azije poput Francuske, Velike Britanije, Rusije, Mongolije i Indije (Jaśniewska i Diowks, 2021).



Slika 1. Plodovi i listovi pasjeg trna (prema Jaśniewska i Diowks, 2021)

U Hrvatskoj grmovi pasjeg trna uzgajaju se na području Međimurja, Podravine i u određenim dijelovima Slavonije (Horvat, 2017).

2.1.2. Bioaktivne molekule pasjeg trna

Bioaktivne molekule nenutritivni su sastojci biljke koji pozitivno utječu na zdravlje (Wang i sur., 2021), a plodovi, listovi i sjemenke pasjeg trna sadrže oko 190 različitih hidrofilnih i lipofilnih bioaktivnih molekula. Ovisno o dijelu biljke (plod, sjemenka, list) u različitim koncentracijama prisutni su različiti bioaktivni spojevi (Sytářová i sur., 2019). U svim dijelovima biljke identificirane i kvantificirane su bioaktivne molekule kao što su vitamini (A, C, E, B skupina, folna kiselina i K), karotenoidi (α , β , γ -karoten i likopen), flavonoidi, organske kiseline, steroli (ergosterol, stigmasterol, lanosterol i amirin) i esencijalne masne kiseline (omega-3, omega-6, omega-7 i omega-9) (Tkacz i sur., 2019; Wani i sur., 2016).

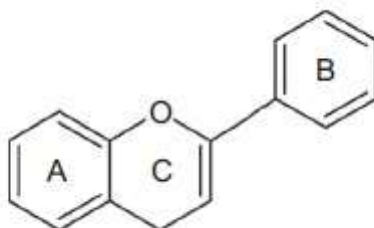
Israživanja su pokazala da su glavne bioaktivne molekule sjemenke pasjeg trna vitamin C, vitamin E, karotenoidi, fenolni spojevi (flavonoidi), masne kiseline, triacilgliceroli, fitosteroli, šećeri, organske kiseline i proantocijanidini. S druge strane, plodovi pasjeg trna navode se kao izvor izuzetno visokog sadržaja vitamina (A, C, E i K), karotenoida, flavonoida i organskih kiselina (Wani i sur., 2016).

2.1.2.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi ili polifenoli sekundarni su biljni metaboliti koji su prisutni u većini biljnih tkiva uključujući i jestive dijelove kao što su sjemenke, plodovi i lišće. Fenolni spojevi najzastupljeniji su antioksidansi u ljudskoj prehrani koji nastaju različitim biosintetskim putevima u biljkama. Imaju važnu ulogu u rastu i razmnožavanju biljaka štiteći ih od patogena i grabežljivaca, a ujedno doprinose boji i senzorskim karakteristikama voća i povrća. Strukturu fenolnih spojeva čine jedan ili više aromatskih prstena koji sadrže jedan ili više hidroksilnih supstituenata. Mogu biti prisutni u biljkama od jednostavnih fenolnih molekula do visoko polimeriziranih spojeva, a većina fenolnih spojeva javljaju se u prirodi kao konjugati s monosaharidima i polisaharidima povezanih s jednom ili više fenolnih skupina. Osim toga, mogu se povezati s esterima i metil esterima. Upravo zbog njihove strukturne raznolikosti u prirodi je prisutan široki raspon fenolnih spojeva s različitim mehanizmima djelovanja (Vuolo i sur., 2019).

Poznato je više od 8000 različitih fenolnih spojeva koji su podijeljeni u dvije velike skupine –

flavonoide i neflavonoide. U skupinu flavonoida ubrajaju se flavonoli, flavanoni, flavani, flavoni, izoflavoni i antocijanidini, dok se u skupinu neflavonoidnih spojeva ubrajaju fenolne kiseline, tanini, kumarini te stilbeni (de la Rosa i sur., 2019). Flavonoidi čine najveću skupinu fenolnih spojeva što potvrđuje činjenica da unutar više od 8000 fenolnih spojeva koji se nalaze u biljnoj hrani, oko 6000 spojeva su flavonoidi. Flavonoidne strukture u osnovi se sastoje od dva aromatska prstena, A i B, spojena mostom od tri ugljika, često u obliku heterocikličkog prstena, C kao što je prikazano na slici 2.



Slika 2. Prikaz strukturne molekule flavonoida (prema Morandi Vuolo i sur., 2019)

Udio flavonoida prisutnih u voću i povrću može varirati ovisno o vrsti, agro-klimatskim uvjetima, dijelu biljke, uzgoju i stupnju zrelosti. Osim toga, kuhanjem i neprikladnim skladištenjem može se promijeniti sadržaj flavonoida u hrani. Flavonoidi u hrani nisu odgovorni samo za boju, već sudjeluju i u okusu, zaštiti od peroksidacije lipida i enzima (Morandi Vuolo i sur., 2019).

Fenolni spojevi u pasjem trnu uglavnom su flavonoidi i fenolne kiseline (slika 3). U pasjem trnu identificirano je 12 fenolnih kiselina. Od hidroksibenzojevih kiselina najzastupljenije su galna kiselina, salicilna kiselina i kafeinska kiselina, a od hidroksicimetnih kiselina ističe se *p*-kumarinska kiselina. Među flavonoidima najzastupljeniji su flavonoli od kojih je najveći udio derivata kampferola, izoramnetina i kvercetina, te flavanoli među kojima se ističu katehin i epikatehin. Svi navedeni fenolni spojevi doprinose antioksidativnom djelovanju pasjeg trna (Wang i sur., 2021; Ciesarová i sur., 2020), a važno je istaknuti kako u plodu pasjeg trna flavonoli čine 98,94 % ukupnih fenolnih spojeva (Tkacz i sur., 2019).

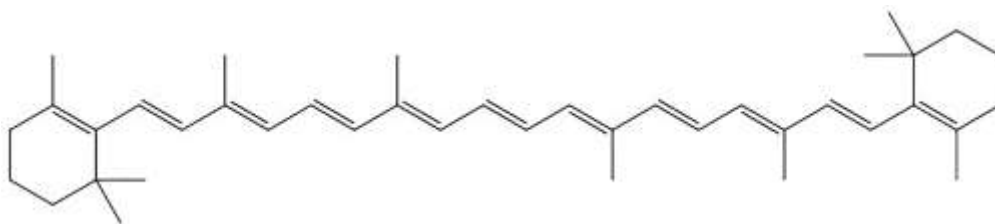


Slika 3. Prikaz struktura glavnih fenolnih spojeva u pasjem trnu (prema Wang i sur., 2021)

Prema istraživanju Criste i sur. (2020) udio ukupnih fenolnih spojeva skoro je četiri puta veći u lišću (48,12 mg GAE g⁻¹), nego u plodu (14,61 mg GAE g⁻¹) pasjeg trna. Tkacz i sur. (2021) u svom su istraživanju utvrdili da plod (604,20 mg 100 g⁻¹ s. tv.) ima najmanji udio ukupnih fenolnih spojeva te su istaknuli kako u odnosu na lišće (2239,15 mg 100 g⁻¹ s. tv.) veći udio ukupnih fenolnih spojeva imaju grane (12197,94 mg 100 g⁻¹ s. tv.) grma pasjeg trna. Provedbom detaljnije analize Tkacz i sur. (2021) utvrdili su da su i pojedini fenolni spojevi (flavonoli, fenolne kiseline, flavan-3-oli i polimerni proantocijanidini) zastupljeniji u granama i lišću u odnosu na plod pasjeg trna.

2.1.2.2. Pigmenti

Pigmenti prisutni u pasjem trnu koji su zaslužni za žutu, crvenu ili narančastu boju njegovog ploda su karotenoidi. Oni su među najčešćim prirodnim pigmentima, a do sada je okarakterizirano 600 različitih spojeva s β-karotenom (slika 4) kao najistaknutijim.



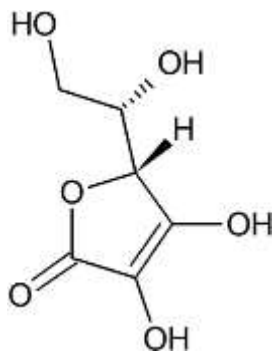
Slika 4. Prikaz kemijske strukture β -karotena (prema Loizzo i sur., 2021)

Samo biljke, bakterije, gljive i alge mogu sintetizirati karotenoide, dok ih ljudi i životinje unose putem hrane. Karotenoidi služe kao antioksidansi, a tzv. karotenoidi provitamina A koriste se kao izvor vitamina A. Niz epidemioloških istraživanja utvrdilo je korelaciju povećanog unosa hrane bogate karotenoidima sa smanjenim rizikom nekoliko degenerativnih poremećaja, uključujući različite vrste raka, kardiovaskularne ili oftalmološke bolesti. Preventivni učinci povezani su s njihovim antioksidativnim djelovanjem obzirom da štite stanice i tkiva od oksidativnog oštećenja (Stahl i Sies, 2003).

U dosadašnjim studijama analizom različitih sorti pasjeg trna identificirano je 41 različitih karotenoida. Najzastupljeniji su β -karoten, zeaksantin i β -kriptoksantin, dok su manje zastupljeni α -karoten, γ -karoten, dihidroksi- β -karoten, likopen i kantaksantin (Pop i sur., 2013). U istraživanju Pop i sur. (2014) od ukupnih karotenoida ploda pasjeg trna više od 50 % činili su β -karoten i zeaksantin dipalmitat. Analizom 8 poljskih sorti pasjeg trna, Teleszko i sur. (2015) utvrdili su da se koncentracija ukupnih karotenoida kreće u rasponu od 6,19 do 23,91 mg 100 g⁻¹ ploda pasjeg trna.

2.1.2.3. Vitamin C

Vitamin C (askorbinska kiselina) (slika 5) esencijalni je mikronutrijent koji u ljudskom tijelu djeluje antioksidativno (Carr i Maggini, 2017). Upravo zbog učinkovitog uklanjanja slobodnih radikala, odnosno reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, nastalih staničnim metabolizmom koristan je za zdravlje ljudi. Antioksidativnim djelovanjem sprječava pojavu oksidativnog stresa koji može dovesti do razvoja kroničnih i degenerativnih bolesti kao što su osteoartritis, ateroskleroza, rak i druge degenerativne bolesti povezane sa starenjem (Ji i sur., 2020). Vitamin C igra važnu ulogu u ljudskoj fiziologiji kao kofaktor nekoliko enzima te kao intracelularni i ekstracelularni antioksidans. Stoga, njegov je udio važan parametar koji ima važnu ulogu prilikom određivanja kvalitete analizirane sorte pasjeg trna (Lougas, 2006).

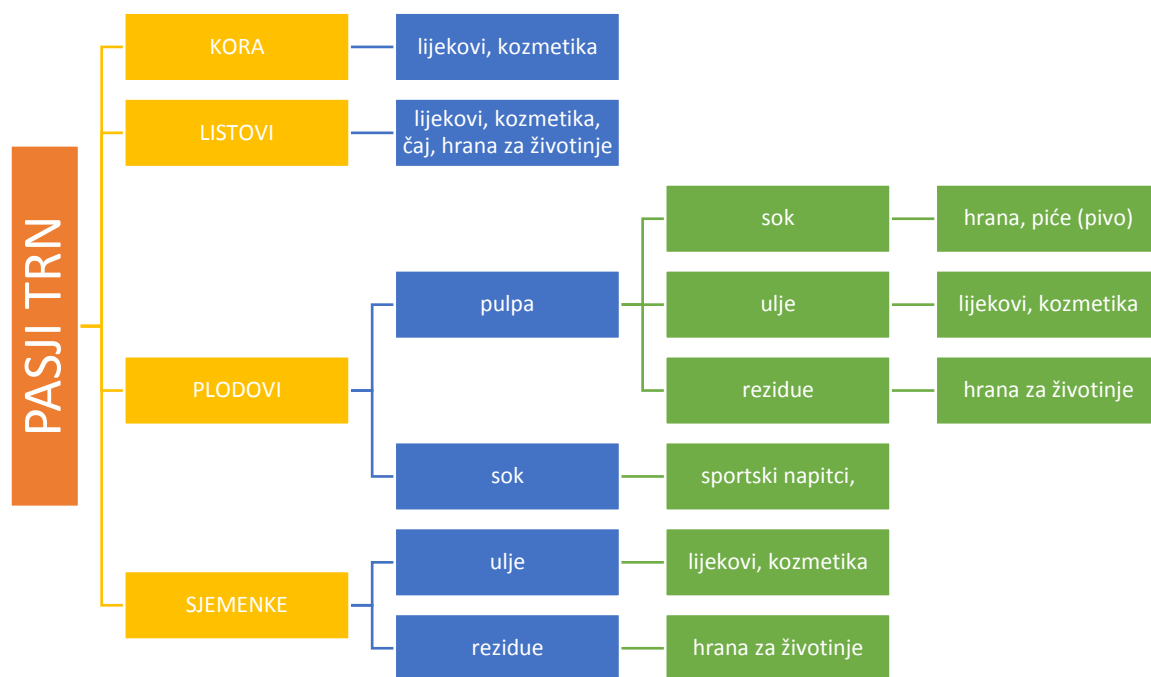


Slika 5. Prikaz kemijske strukture L-askorbinske kiseline (prema Caritá i sur., 2020)

Pasji trn odlikuje se izrazito visokom koncentracijom vitamina C. Teleszco i sur. (2015) istraživali su udio askorbinske kiseline u plodovima ruskih sorti pasjeg trna, a najveći udio sadržavala je sorta „Aromatnaja“ (130,97 mg 100 g⁻¹). Znatno veći udio vitamina C prikazali su Jaśniewska i Diowkszc (2021) u svom istraživanju gdje je količina vitamina C varirala od 360 mg 100 g⁻¹ u plodovima podvrste *ramnoides*, koja raste u Europi, do 2500 mg 100 g⁻¹ u plodovima kineske podvrste *sinensis*. Razlike između koncentracija vitamina C u plodovima pasjeg trna iz različitih regija povezali su s klimatskim uvjetima mikrolokacije koji se javljaju tijekom kratkog reproduktivnog razdoblja. Prikazani rezultati ukazuju da je pasji trn po sadržaju vitamina C bogatiji u odnosu na mnoge popularne vrste voća uključujući jagode (65 mg 100 g⁻¹), maline (29 mg 100 g⁻¹), limun (74,3 mg 100 g⁻¹), mandarine (37,7 mg 100 g⁻¹) i kupine (21 mg 100 g⁻¹) (Teleszco i sur., 2015).

2.1.3. Upotreba pasjeg trna i utjecaj na zdravlje

Jedinstveni kemijski sastav, ljekovita svojstva i atraktivna boja plodova pasjeg trna, čine ga dragocjenim materijalom za farmaceutsku, kozmetičku i prehrambenu industriju. Potencijalne primjene različitih dijelova pasjeg trna prikazane su na slici 4.



Slika 6. Potencijalna primjena različitih dijelova pasjeg trna

Ljekovita svojstva lišća i plodova pasjeg trna bila su poznata još u staroj Grčkoj kao i u tibetanskoj i mongolskoj medicini (Tkacz i sur., 2019). Danas su mnoga provedena istraživanja potvrdila djelotvornost pasjeg trna poznata od prije više stotina godina. Ulje pasjeg trna koristi se u kozmetičkoj industriji za proizvodnju preparata namijenjenih za zrelu kožu. Obzirom da obiluje antioksidansima te učvršćuje kožu i zaglađuje bore, najčešće se koristi u proizvodnji tzv. anti-age proizvoda. Ulje pasjeg trna prikladno je i za njegu suhe, nadražene kože koja se ljušti i svrbi te potiče zacjeljivanje rana, regeneraciju epiderme te sintezu kolagena. Osim u kozmetičke svrhe, ulje pasjeg trna kao i ekstrakti iz njegovog ploda koriste se kao pomoćna terapija u liječenju pojedinih bolesti i tegoba. Umirujuće djelovanje ulja pomaže kod upale probavnog sustava ili kod proljeva. Uspješno se koristi za ublažavanje kronične bolesti želuca, upale rodnice i cerviksa, simptoma reumatoidnih bolesti te snižava razinu kolesterola. Zahvaljujući visokom sadržaju karotenoida i tokoferola ulje pasjeg trna može se koristiti u liječenju opekline, ozeblina te raznih oštećenja kože koja su nastala primjerice kao rezultat prekomjernog izlaganja suncu ili rendgenskim zrakama (Zielińska i Nowak, 2017). Osim navedenog, ulje pasjeg trna koristi se u njezi kose i kao prirodna zaštita od UV-B zračenja. Rezultati *in vitro* i *in vivo* istraživanja potvrdili su učinkovitost ekstrakta pasjeg trna u prevenciji hiperglikemije,

hiperinzulinemije i hiperlipidemije, zajedno s hepatoprotektivnim, antikancerogenim, antibakterijskim i antifungalnim učincima te pozitivan utjecaj na funkcioniranje probavnog sustava i vida (Tkacz i sur., 2019). Antioksidativno i antimikrobno djelovanje pripisuje se pasjem trnu upravo zbog toga što je bogat bioaktivnim molekulama poput fenola, karotenoida i vitamina C (Sytářová i sur., 2019).

2.2. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH MOLEKULA

Ekstrakcija predstavlja tehnološku operaciju djelomičnog ili potpunog odjeljivanja smjese tvari koje su nejednako topive u različitim otapalima. Bioaktivne tvari mogu se ekstrahirati iz krutine ili tekućine koja sadrži željenu tvar uporabom odgovarajućeg otapala (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Probir biljnih ekstrakata na željenu bioaktivnost među najvažnijim je ciljevima u istraživanju ljekovitog bilja, a ekstrakcija je prvi ključni korak procesa. Za potpunu predodžbu o bioaktivnosti pojedinih ekstrakata, potrebno je optimizirati metodu ekstrakcije kako bi se postigla bolja kvaliteta i maksimalna učinkovitost ekstrakcije. Učinkovitost biljnih ekstrakata u nekim slučajevima može ovisiti o učinkovitosti ekstrakcije (Kothari i sur., 2012).

Za ekstrakciju općenito vrijedi:

1. Prilikom ekstrakcije čvrstih tvari potrebno je usitnjavanjem i homogenizacijom povećati površinu uzajamnog djelovanja među fazama.
2. Prilikom ekstrakcije u sredini potrebno je povećati brzinu gibanja faza.
3. Povećanjem količine tvari potrebno je produljiti vrijeme ekstrakcije.

Za vrijeme mirovanja otopljene tvari prelaze iz biljke u otapalo. Prijenos mase odvija se u 3 faze. U prvoj fazi u otapalu se otapa željena komponenta. Potom smjesa otapala i otopljene tvari prelazi iz biljke na površinu te se naposljetku otopljena tvar rasprši u volumenu otapala. Vrijeme trajanja ekstrakcije ovisno je o topivosti komponente u otapalu, površini biljke izloženoj otapalu, temperaturi ekstrakcije, viskoznosti otapala te volumnom protoku otapala. Provođenje ekstrakcije pri višim temperaturama ubrzava proces ekstrakcije obzirom da se povećava brzina otapanja komponente i brzina difuzije komponente u volumen otapala. Međutim, ekstrakcijom pri temperaturi iznad 100 °C dolazi do degradacije sastojka koji želimo ekstrahirati ili se ekstrahiraju nepoželjne tvari. Brzina prijenosa mase direktno je proporcionalna površini biljke pa je važno prije ekstrakcije biljku usitniti do određenog stupnja i homogenizirati. Viskoznost

otapala mora biti dovoljno niska kako bi otapalo lako prošlo kroz sloj krutih čestica. Osim toga, veći protok otapala smanjuje granični sloj između površine čestica i koncentrirane otopine pa se sukladno tome povećava brzina ekstrakcije.

Odabir otapala za ekstrakciju ovisi o svojstvima i vrsti molekula koje se ekstrahiraju. Osim polarnosti, prilikom odabira otapala treba uzeti u obzir točku vrenja koja treba biti što niža kako bi se olakšalo odvajanje otapala od komponente. Važno je da otapalo ne reagira s ekstraktom, niti se razgrađuje te da ima niski viskozitet i stabilnost s obzirom na toplinu, kisik i svjetlo. Ostali parametri važni prilikom odabira otapala su: sigurnost pri upotrebi (nezapaljiv, neškodljiv za analitičara), ekološka prihvatljivost te da je količinski i cjenovno dostupan (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Najčešće korištena otapala u postupcima ekstrakcije su heksan, etanol, kloroform, acetonitril i benzen pomiješani u različitim omjerima s vodom. Ova organska otapala mogu se koristiti za ekstrakciju i polarnih, i nepolarnih organskih spojeva kao što su alkaloidi, organoklorirani pesticidi, fenoli, aromatični ugljikovodici, masne kiseline i ulja (Gil-Chavez i sur., 2013).

Korištenjem klasičnih i naprednih metoda ekstrakcija mogu se ekstrahirati razne lipofilne i hidrofилne bioaktivne molekule iz biljaka koje se u posljednje vrijeme sve više istražuju zbog pozitivnog utjecaja na ljudski organizam.

2.2.1. Klasične metode ekstrakcije

Klasične metode ekstrakcije temelje se na odabiru odgovarajućeg otapala i korištenja topline u svrhu povećanja topljivosti ciljanih spojeva. Iako jednostavne za primjenu, općenito se smatraju metodama niske učinkovitosti koje su dugotrajne (Dragović-Uzelac i sur., 2012) i zahtijevaju velike količine neekoloških organskih otapala kao što su diklormetan i metanol. Klasične kruto-tekuće metode ekstrakcije su maceracija, Soxhlet ekstrakcija, perkolacija te turbo-ekstrakcija (brzo miješanje) (Saha i sur., 2017).

2.2.2. Napredne metode ekstrakcije

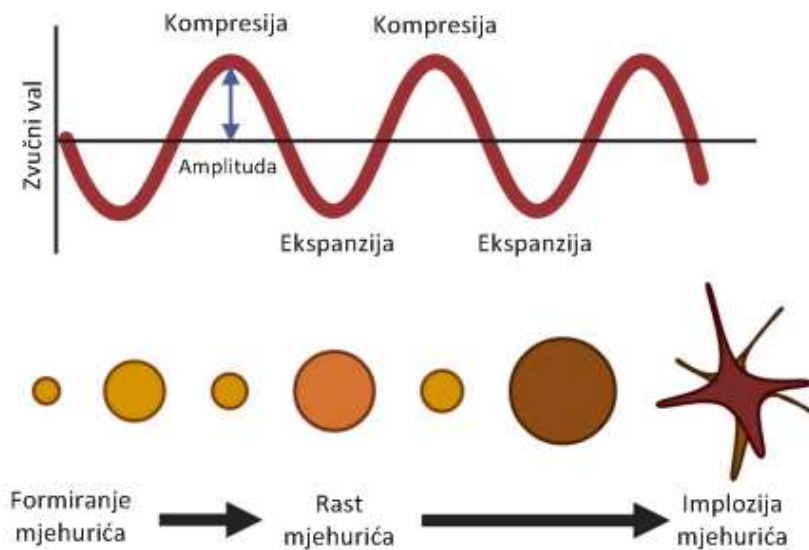
Modifikacijom klasičnih metoda ekstrakcije razvijaju se napredne tehnike ekstrakcije koje se odlikuju brzom obradom uzoraka, lakom automatizacijom, visokom ponovljivosti te korištenjem malih količina organskih otapala koji su u skladu sa zelenom analitičkom kemijom (Saha i sur., 2017). Mnoga istraživanja potvrdila su da etanol posjeduje najveći afinitet prema fenolnim

spojevima, stoga je prvi izbor za ekstrakciju fenolnih spojeva iz voća i povrća. Osim toga, etanol je poželjno otapalo zbog njegove pristupačnosti, podrijetla iz obnovljivog izvora (šećerna trska) te je kategoriziran kao GRAS (eng. *generally recognized as safe*) otapalo (Kumar i sur., 2021). “Zelena ekstrakcija” doprinosi smanjenju potrošnje energije te osigurava siguran i visokokvalitetan ekstrakt. Nadalje, za ekstrakciju osjetljivih i termolabilnih tvari koje se u uzorku nalaze u niskim koncentracijama ne preporučuju se klasične metode ekstrakcije zbog korištenja visokih temperatura što dovodi do vrlo niskog prinosa u odnosu na napredne metode ekstrakcije (Saha i sur., 2017). Međutim, visoka kapitalna ulaganja u potrebnu opremu i visoki tekući troškovi predstavljaju izazov za njihovu implementaciju i primjenu. Napredne metode ekstrakcije uključuju superkritičnu fluidnu ekstrakciju, ekstrakciju potpomognutu visokim tlakom, ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima, ekstrakciju hladnom atmosferskom plazmom te ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (Picot-Allain i sur., 2021).

2.2.2.1. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UAE)

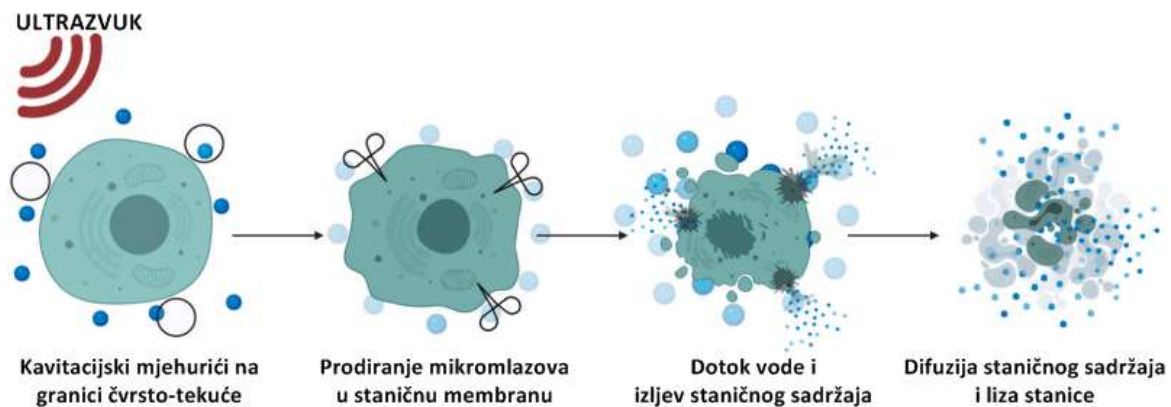
Razvoj ultrazvučne tehnologije nije novost u znanosti, ali u posljednje vrijeme postignuti su veliki pomaci u primjeni snage ultrazvuka u različitim istraživanjima. U usporedbi s klasičnim metodama ekstrakcije kao što je primjerice Soxhlet ekstrakcija, procesi ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (eng. *Ultrasound-Assisted Extraction*, UAE) vremenski traju puno kraće te je smanjena potrošnja otapala i vode. Ponovljivost i čistoća krajnjeg ekstrakta izrazito su visoki, a potrošnja energije je minimalna (Chemat i sur., 2017). U posljednje vrijeme posebna pozornost posvećena je upotrebi UAE kao modernoj tehnici ekstrakcije za izolaciju biljnih bioaktivnih molekula (Dragović-Uzelac i sur., 2012).

Njegova visoka učinkovitost ekstrakcije povezana je s fenomenom koji se zove kavitacija. Kada je intenzitet ultrazvuka dovoljan, ciklus ekspanzije stvara mikromjehuriće u tekućini. Formirani mjehurići apsorbiraju energiju zvučnih valova i rastu tijekom ciklusa ekspanzije i smanjuju se tijekom ciklusa kompresije. Tijekom cijelog procesa dolazi do ekstremnog rasta tlaka (nekoliko stotina atmosfera) i temperature (oko 5000 K). Izmjenom ciklusa ekspanzije i kompresije mjehurić raste dok ne dosegne kritičnu veličinu te potom implodira (slika 7) (Gil-Chavez i sur., 2013).



Slika 7. Shematski prikaz mehanizma ultrazvučne kavitacije (prema Perera i Alzahrani, 2021)

Implozija kavitacijskih mjehurića može pogoditi površinu čvrstog matriksa i razoriti stanice uzrokujući oslobađanje željenih spojeva (slika 8). Difuzija staničnog sadržaja doprinosi procesu ekstrakcije, a liza stanica dovodi do inaktivacije mikroorganizama i enzima što doprinosi sigurnosti hrane.



Slika 8. Shematski prikaz stanične lize uzrokovane kavitacijskim mjehurićima (prema Perera i Alzahrani, 2021)

Osim toga, studije su pokazale da su ovom metodom ekstrakcije fenolni spojevi bili manje degradirani u odnosu na druge (Dobias i sur., 2010). Međutim, Zhao i sur. (2006) navode da

treba biti na oprezu s UAE ako se koristi za ekstrakciju nestabilnih spojeva poput karotenoida obzirom da je uočena velika degradacija u usporedbi s drugim tehnologijama.

2.3. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA BIOAKTIVNIH MOLEKULA

Biljni ekstrakti sadrže kombinaciju različitih vrsta bioaktivnih molekula koji su različitog polariteta i prisutni u niskoj koncentraciji u ispitivanom uzorku te njihovo odvajanje predstavlja veliki izazov za proces identifikacije i kvantifikacije pojedinih bioaktivnih molekula (Sasidharan i sur., 2011). Tekućinska kromatografija vezana s masenom spektrometrijom (MS) ili diodnim nizom detektora (DAD) jedna je od najselektivnijih i najosjetljivijih tehnika u kemijskoj analizi te je izvrsna za detekciju spojeva koji su u uzorku prisutni u niskim koncentracijama (Donno i sur., 2020).

Za identifikaciju i kvantifikaciju bioaktivnih molekula koriste se razne metode, a u ovom istraživanju za određivanje karotenoida korištena je HPLC-UV VIS/DAD metoda te LC-MS/MS metoda za određivanje fenolnih spojeva.

2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija (eng. *Liquid Chromatography*, LC) vrsta je kromatografije koja se koristi za odjeljivanje otopljenih tvari iz smjese. Stacionarna faza nalazi se u koloni kroz koju prolazi uzorak, a kao mobilna faza koristi se tekućina koja se naziva eluens (Sasidharan i sur., 2011).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) svestrana je, robusna i široko korištena tehnika za izolaciju, identifikaciju i kvantifikaciju bioaktivnih molekula (Sasidharan i sur., 2011; Marcillo-Parra i sur., 2021). HPLC uređaj čine pumpa za isporuku otapala, uređaj za uvođenje uzoraka kao što je autosampler ili ventil za ručno ubrizgavanje, analitička kolona, zaštitna kolona, detektor i snimač ili pisač.

Ovisno o tome koje spojeve treba odvojiti i koliko su oni blisko povezani, podešavaju se odgovarajući uvjeti kao što su odgovarajuća mobilna faza, brzina protoka, odgovarajući detektori i kolone kako bi se postiglo optimalno odvajanje željenih komponenti. Odvajanje pojedinih molekula pomoću HPLC-a moguće je zbog činjenice da različite molekule imaju različito vrijeme retencije s obzirom na korištenu kolonu i mobilnu fazu. Retencijsko vrijeme je

vrijeme potrebno da otopljena tvar dođe preko kolone do detektora tj. da se eluira. Općenito, identifikacija i odvajanje bioaktivnih molekula može se postići korištenjem izokratnog sustava eluacije (tijekom eluiranja mobilna faza se ne mijenja). Međutim, ako se proučava više od jedne komponente u uzorku, gradijentno eluiranje, u kojem se udio organskog otapala u vodi mijenja s vremenom, bolji je izbor (Sasidharan i sur., 2011).

U HPLC sustavu detektor je odgovoran za pretvaranje fizičke ili kemijske tvari u mjerljivi signal koji omogućuje identifikaciju i kvantifikaciju željenog spoja (Swartz, 2010). Nedostatak standarda za fenolne spojeve veliki je problem u njihovoj identifikaciji. U odsutnosti standarda, HPLC-DAD omogućuje identifikaciju fenolnih spojeva usporedbom UV-VIS spektra s već objavljenim spektrima pojedinih fenolnih spojeva (Mozetič i Trebše, 2004).

2.3.2. Vezani sustav tekućinske kromatografije i dvojne spektrometrije masa (LC-MS/MS) Kombinacija tekućinske kromatografije i dvojne spektrometrije masa (MS/MS) najučinkovitija je tehnika za strukturnu karakterizaciju i određivanje fenolnih spojeva niske i visoke molekularne mase (Lucci i sur., 2017).

Tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC*) napredni je oblik tekućinske kromatografije u kojoj se koriste kolone napunjene vrlo malim česticama (1,7 µm) na koje se djeluje vrlo visokim tlakovima, znatno višim nego kod HPLC-a. Glavne prednosti UPLC-a u odnosu na konvencionalni HPLC su bolje razlučivanje, kraće retencijsko vrijeme i veća osjetljivost (Gruz i sur., 2008). UPLC u kombinaciji s tandem masenom spektrometrijom (UPLC-MS/MS) sve se više koristi u analizi fenolnih spojeva jer osigurava visoku razlučivost i kratko vrijeme analize (Lopes i sur., 2020).

2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST BIOAKTIVNIH MOLEKULA

Prisutnost antioksidansa u biljci utvrđuje se mjerenjem antioksidacijske aktivnosti (Roidaki i sur., 2015). Antioksidansi su kemijski spojevi koji se mogu vezati na slobodne radikale sprječavajući ih da oštete zdrave stanice (Siddhuraju i sur., 2014) jer svojom prisutnošću značajno odgađaju ili inhibiraju oksidacijske procese u živim bićima. To se događa zbog njihove sposobnosti prijenosa atoma vodika (HAT) i/ili prijenosa pojedinačnih elektrona (SET) kako bi se eliminirali slobodni radikali i kelirani metali koji nastaju u procesu oksidacije (Becker i sur., 2019). Reaktivne vrste kisika (ROS) u ograničenim količinama potrebne su za homeostazu

stanice i redoks signalizaciju. Međutim, prekomjerna proizvodnja reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih vrsta (RNS), koja se suprotstavlja obrambenim sustavima organizma, poznata je kao oksidativni stres (Pisoschi i sur., 2021).

U nedavno provedenim studijama potvrđeno je da oksidativni stres nije ograničen samo na oštećenje biomolekula izazvano slobodnim radikalima, već također uključuje poremećaj staničnog redoks statusa. To je opisano kao "poremećaj u redoks signalizaciji i kontroli" te je zaključeno da antioksidacijski sustav podrazumijeva više od pukog hvatanja slobodnih radikala. Patološka stanja izazvana oksidativnim stresom uključuju rak, kardiovaskularne bolesti, neuralne poremećaje, Alzheimerovu bolest, blaga kognitivna oštećenja, Parkinsonovu bolest, alkoholom izazvanu bolest jetre, ulcerozni kolitis, aterosklerozu i starenje (Pisoschi i sur., 2016). Fenoli, karotenoidi i antocijanidini antioksidansi su biljnog podrijetla te upravo iz tog razloga sve je veći interes znanstvenika za određivanje antioksidacijske aktivnosti biljnih ekstrakata (Quek i sur., 2020).

Metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti prema načinu djelovanja dijelimo u dvije skupine: SET (eng. *Single Electron Transfer*) i HAT (eng. *Hydrogen-Atom Transfer*). SET metode, u koje se ubrajaju FRAP, CUPRAC i ABTS metode, temelje se na mjerenju sposobnosti antioksidansa da reducira oksidans pri čemu dolazi do promjene početne boje. O koncentraciji antioksidansa u uzorku ovisi koliki će biti stupanj promjene boje. S druge strane, HAT metode, u koje se ubrajaju ORAC, DPPH i TRAP metode, temelje se na mjerenju sposobnosti vezanja antioksidansa na slobodne radikale doniranjem vodikovog atoma (Pisoschi i sur., 2016).

U ovom istraživanju za određivanje antioksidacijske aktivnosti korištena je ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda. Prema mehanizmu djelovanja ORAC metoda spada u HAT metodu. Radi na principu mjerenja inhibicije peroksil radikala koji nastaje uslijed raspadanja azo-spoja, 2, 2'-azobis(2-amidinoproionamid)-dihidroklorida (AAPH), pri stalnoj brzini na 37 °C (Prior, 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.UZORAK PLODA PASJEG TRNA

U ovom istraživanju korišten je uzorak liofiliziranog ploda pasjeg trna s područja kontinentalne Hrvatske (Zagreb). Analizirane su dvije sorte: „*Leikora*“ i „*Ascola*“.

3.2.ODREĐIVANJE UKUPNE SUHE TVARI LIOFILIZIRANIH PLODOVA PASJEG TRNA

Cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda koja ne isparava pod definiranim uvjetima čini ukupnu suhu tvar. Svaka sirovina sastavljena je dijelom od vode i dijelom od suhe tvari. Parametri koji čine prehrambenu vrijednost namirnice sadržani su u suhoj tvari. Određivanjem ukupne suhe tvari proizvoda (topljive i netopljive) sušenjem pri 105 °C određuje se ostatak nakon sušenja pri 105 °C do konstantne mase (AOAC, 1984). Ukupna suha tvar određena je u liofiliziranim plodovima pasjeg trna.

3.2.1. Aparatura i pribor

- analitička vaga (Sartorius m-power, Sartorius, Firenca, Italija)
- laboratorijski sušionik (ST-01/02, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- eksikator (LLG-Labware, Meckenheim, Njemačka)
- aluminijske posudice s poklopcem
- kvarcni pijesak
- stakleni štapići

3.2.2. Postupak određivanja suhe tvari

Prije samog mjerenja potrebno je homogenizirati uzorak. U osušenu i izvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem stavi se oko 1 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić te se suši u sušioniku pri 105 °C oko 2 h sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja posudica se zatvori poklopcem te hladi u eksikatoru, a zatim se izvaže s točnošću $\pm 0,0002$ g. U ohlađenu i izvaganu posudicu s kvarcnim pijeskom stavi se 1 g liofiliziranog uzorka. Sve zajedno se važe s točnošću od $\pm 0,0002$ g. Aluminijska posudica s pijeskom i ispitivanom količinom uzorka stavi se u laboratorijski sušionik koji je prethodno zagrijan na $105 \pm 0,5$ °C te se zagrijava 1 h sa zaklopljenim poklopcem. Nakon hlađenja i vaganja sušenje se nastavlja dok razlika između dva uzastopna sušenja u razmaku od 30 min ne bude manja od 0,001 g. Važe se ponovno s točnošću $\pm 0,0002$

g.

Ukupna suha tvar izračuna se prema formuli [1]:

$$\text{ukupna suha tvar (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100 \quad [1]$$

gdje je:

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

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

m_2 – masa posudice s ostatkom nakon sušenja (g).

3.3.EKSTRAKCIJA PIGMENATA IZ LIOFILIZIRANIH PLODOVA PASJEG TRNA PRIMJENOM ULTRAZVUKA

3.3.1. Kemikalije

- *n*-hexan
- aceton

3.3.2. Aparatura i pribor

- tehnička vaga Mettler (Mettlet Toledo, Greifensee, Švicarska)
- ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex, Berlin, Njemačka)
- centrifuga (ROTOFIX 32, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)
- Falcon epruvete, volumena 25 mL
- stakleni lijevak
- odmjerne tikvice, volumena 10 mL
- filter papir
- Chromafil Xtra filter (PET-45/25 0,45 μm)
- mikropipeta
- viala s poklopcem

3.3.3. Postupak ekstrakcije

U staklenu epruvetu odvažuje se 1 g uzorka te se doda 10 mL otapala. Za ekstrakciju pigmenta korištene su dvije vrste otapala: *n*-hexan i aceton. Uzorci se ekstrahiraju u ultrazvučnoj kupelji pri 40 °C u trajanju od 20, 30 i 40 min. Dobiveni ekstrakti se centrifugiraju 10 min pri 6000 o/min, a zatim se profiltriraju kroz obični filter papir i prebace u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopune do oznake. Pripremljeni ekstrakti skladište se na +4 °C do daljnje analize.

3.4. EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJEVA I VITAMINA C IZ LIOFILIZIRANIH PLODOVA PASJEG TRNA PRIMJENOM ULTRAZVUKA

3.4.1. Kemikalije

- etanol
- destilirana voda

3.4.2. Aparatura i pribor

- tehnička vaga Mettler (Mettlet Toledo, Greifensee, Švicarska)
- ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex, Berlin, Njemačka)
- centrifuga (ROTOFIX 32, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)
- Falcon epruvete, volumena 25 mL
- stakleni lijevak
- odmjerne tikvice, volumena 10 mL
- filter papir
- Chromafil Xtra filter (PET-45/25 0,45 µm)
- mikropipeta
- viala s poklopcem

3.4.3. Postupak ekstrakcije:

U staklenu epruvetu odvažuje se 1 g uzorka te se doda 10 mL otapala. Za ekstrakciju fenolnih spojeva i vitamina C korištene su dvije vrste otapala: 30 i 70 % EtOH (*v/v*). Uzorak se ekstrahira u ultrazvučnoj kupelji pri 40 °C u trajanju od 20, 30 i 40 min. Dobiveni ekstrakt se centrifugira 10 min pri 6000 o/min, a zatim se profiltrira kroz obični filter papir i prebaci u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopuni do oznake. Pripremljeni ekstrakti skladište se na +4 °C do daljnje analize.

3.5. ODREĐIVANJE KAROTENOIDA PRIMJENOM HPLC-UV VIS/DAD METODE

3.5.1. Kemikalije

- Metanol (Fisher Chemicals, Merelbeke, Belgija)
- Metil tert-butil eter (Lach-ner, Neratovice, Češka)
- Destilirana voda

3.5.2. Aparatura i pribor

- HPLC uređaj (1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- UV-VIS/DAD detektor (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

3.5.3. Kromatografska analiza

Određivanje pojedinačnih karotenoida (β -karotena, cis- γ -karotena, luteina i njegovih derivata, zeaksantina i njegovih derivata) u ekstraktima pulpe pasjeg trna provedeno je prema metodi koju su prethodno opisali Castro-Puyana i sur. (2016) primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Za izvođenje metode korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju Agilent 1260 Infinity sistem (Agilent Technologies, SAD) koji je opremljen s DAD detektorom. Određivanje je provedeno prema kromatografskim uvjetima prikazanim u tablicama 1 i 2.

Tablica 1. Prikaz kromatografskih uvjeta za HPLC-UV/PDA analizu karotenoida (prema Castro-Puyana i sur., 2016)

Kolona:	Develosil 3u RP-Aqueous C30 140A, 5 μ m (250 \times 4,6 mm I.D.)
Pokretna faza:	otapalo A : smjesa metanol (MeOH):metil terc-butil eter (MTBE):voda (90:7:3, v/v/v)
	otapalo B : smjesa MeOH:MTBE (10:90, v/v)
Detektor:	UV/VIS PDA
Eluiranje:	gradijentno – gradijent prikazan u tablici 2.
Injektirani volumen:	10 μ L
Detekcija valne duljine:	450 i 660 nm
• Za DAD detektor	240-770 nm

Tablica 2. Gradijent eluacije za HPLC-UV/PDA analizu karotenoida (prema Castro-Puyana i sur., 2016)

t (min)	otapalo A (%)	otapalo B (%)	protok (mL min ⁻¹)
0	100	0	0,8
20	70	30	0,8
35	50	50	0,8
45	20	80	0,8
50	0	100	0,8
52	100	0	0,8

3.6. ODREĐIVANJE FENOLNIH SPOJEVA I VITAMINA C PRIMJENOM LC-MS/MS METODE

3.6.1. Kemikalije

- Mravlja kiselina (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Acetonitril (Fisher Chemicals, Merelbeke, Belgija)
- Destilirana voda

3.6.2. Aparatura i pribor

- UPLC sustav (1290 RRLC, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- 6430 maseni spektrometar Agilent Technologies (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

3.6.3. Postupak određivanja

Za određivanje sadržaja pojedinih fenolnih spojeva i vitamina C u analiziranim ekstraktima ploda pasjeg trna korišten je UPLC-MS/MS ESI u pozitivnom i negativnom modu prema metodi koju su prethodno opisali Garofulić i sur. (2018). Kromatografski uvjeti i parametri masenog detektora navedeni su u tablicama 3 i 4. Program Agilent MassHunter Workstation (ver. B.04.01) korišten je za kontrolu uređaja i obradu podataka.

Tablica 3. Prikaz kromatografskih uvjeta za LC-MS/MS analizu (prema Garofulić i sur., 2018)

Kolona:	Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 μm (100 \times 2,1 mm I.D.)
Pokretna faza:	otapalo A: 0,1 % mravlja kiselina u redestiliranoj vodi otapalo B: 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu
Detektor:	MS/MS trostruki kvadropol (Agilent 6430 QqQ)
Ionski izvor:	ESI
MS parametri:	temperatura plina: 300 $^{\circ}\text{C}$ protok plina (N ₂): 11 L min ⁻¹ nebulizer: 40 psi napon na kapilari: +4000 V; -3500 V maseni detektor: MRM mode (m/z od 50 do 1000)
Eluiranje:	gradijentno – gradijent prikazan u tablici 4
Temperatura:	35 $^{\circ}\text{C}$
Vrijeme trajanja:	12,5 min
Injektirani volumen:	2,5 μL

Tablica 4. Gradijent eluacije za LC-MS/MS analizu (prema Garofulić i sur., 2018)

t (min)	otapalo A (%)	otapalo B (%)	protok (mL min⁻¹)
0	95	5	0,3
10	65	35	0,3
10,1	20	80	0,3
11	20	80	0,3
11,1	95	5	0,3
12,5	95	5	0,3

Identifikacija fenolnih spojeva na UPLC MS/MS-u provedena je usporedbom spektra masa i fragmentacijskih uzoraka autentičnih standarda, a za spojeve za koje ne postoje standardi, prekursor i produkt ioni te polaritet određeni su prema literaturnim podacima (Sharma i sur.,

2020; Maldini i sur., 2016; Carochi i sur., 2014; Barros i sur., 2013; Pop i sur., 2013; Pinheiro i Justino, 2012; Hossain i sur., 2010; Montoro i sur., 2006; March i Miao, 2004) (tablica 5). Kvantifikacija pojedinih fenolnih spojeva u uzorcima izračunata je prema baždarnim jednadžbama standardnih spojeva, a za kvantifikaciju spojeva za koje ne postoje standardi korištene su jednadžbe pravaca spojeva iz iste grupe fenolnih spojeva. Standardi polifenola za izradu kalibracijskih krivulja otopljeni su u metanolu u koncentraciji od 100 mg mL⁻¹, a točke kalibracije bile su u rasponu od 0,10 do 50 mg mL⁻¹. Dobivene koncentracije izražene su u mg 100 g⁻¹ s.tv. uzorka, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja.

Tablica 5. Podaci masene spektrometrije i identifikacija fenolnih spojeva

Naziv spoja	Prekursor ion	Produkt ion	Fragmentor	Kolizijska energija	Polarnost
FLAVONOLI					
Izorarnetin-3-sinapoilglukozid-glukozid-7-ramnozid	993	463	100	5	pozitivan
Izorarnetin-3-soforozid-7-ramnozide	787	463	100	5	pozitivan
Izorarnetin-3-rutinozide-7-glukozid	787	625	100	5	pozitivan
Kvercetin-3-soforozid-7-ramnozid	773	303	100	5	pozitivan
Kvercetin-3-ramnoglukozid-7-ramnozid	757	303	100	5	pozitivan
Kamferol-soforozide-ramnozid	757	287	120	15	pozitivan
Izorarnetin-3,7-diheksozid	641	479	100	5	pozitivan
Izorarnetin-3-rutinozid	625	317	100	5	pozitivan
Rutin	611	465	120	5	pozitivan
Rutin	611	303	120	15	pozitivan
Kamferol-heksozid-ramnozid	595	153	120	15	pozitivan
Kamferol-3-rutinozid	595	287	120	15	pozitivan

Tablica 5. Podaci masene spektrometrije i identifikacija fenolnih spojeva - nastavak

Izoramnetin-3-heksozid	479	317	100	5	pozitivan
Kvercetin-3-glukozid	465	303	100	5	pozitivan
Izoramnetin-3-ramnozid	463	317	100	5	pozitivan
Kvercetin-3-ramnozid	449	303	100	5	pozitivan
Kvercetin-3-pentozide	435	303	100	5	pozitivan
Kamferol-ramnozid	433	287	120	15	pozitivan
Izoramnetin	317	201	100	5	pozitivan
Kamferol	287	145	120	15	pozitivan
<i>FLAVAN-3-OLI</i>					
Katehin	291	139	100	10	pozitivan
Katehin	291	165	100	10	pozitivan
Epikatehin	291	139	100	10	pozitivan
<i>FLAVONI</i>					
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	449	287	100	35	pozitivan
Luteolin	287	153	140	35	pozitivan
Apigenin	271	153	80	30	pozitivan
<i>HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE</i>					
Vanilinska kiselina	169,1	125,1	100	10	pozitivan
Elaginska kiselina heksozid	436	303	100	10	negativan
Galna kiselina	169	125	100	10	negativan
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	137	93	100	10	negativan

Tablica 5. Podaci masene spektrometrije i identifikacija fenolnih spojeva - nastavak

Siringinska kiselina	199,1	140,1	90	10	pozitivan
Protokatehinska kiselina	153	109	100	10	negativan
HIDROKSICIMETNE KISELINE					
Kafeinska kiselina	179	135	80	10	negativan
Klorogenska kiselina	353	191	80	10	negativan
<i>p</i> -kumarinska kiselina	163	119	80	10	negativan
Ferulinska kiselina	193	178	80	5	negativan
Ferulinska kiselina	193	134	80	10	negativan
Ružmarinska kiselina	359	161	110	10	negativan
Cimetna kiselina	147	103	80	10	negativan
VITAMINI					
Askorbinska kiselina	175	115	100	5	negativan

3.7. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI ORAC METODOM

3.7.1. Kemikalije

- 75 mM fosfatni pufer (pH 7,0)
- Natrijev fluorescein (70,3 nM)
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), (SigmaAldrich, Njemačka)
- AAPH (2,2'-azobis(2-amidinoproionamid)- dihidroklorid), (SigmaAldrich, Njemačka)
- Fosfatni pufer (75 mM, pH 7,0)

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

tikvicu od 100 mL se doda 37,5 mL 0,2M otopine fosfatnog pufera te se ista nadopuni destiliranom vodom do oznake. Svaki dan je potrebno pripremiti svježu otopinu.

- Fluorescein (70,3 nM)
- Otopina 1

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

- Otopina 2

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

- AAPH (240 mM)

Priprema: Otopi se 0,651 g AAPH u 10 mL 75 mM fosfatnog pufera. Svaki dan se priprema svježi reagens.

- Otopina standarda - Trolox

Priprema: Početna ("stock") otopina trolox, početne koncentracije 103,99 μ M se priprema otapanjem 2,6 mg trolox u 100 mL 75 mM fosfatnog pufera. Iz pripremljene početne otopine trolox pripremi se 6 razrjeđenja (3,12 – 103,99 μ M).

3.7.2. Aparatura i pribor

- Vortex (MS2 Minishaker, IKA, SAD)
- Clariostar spektrofotometar, (BMG LABTECH, Offenburg, Njemačka)
- Mikrolitarska pločica sa 96 jažica (Greiner, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Chromafil Xtra filter (PET-45/25 0,45 μ m)

3.7.3. Postupak određivanja

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka ORAC metodom pripreme se odgovarajuća razrjeđenja uzoraka. U jažicu mikrolitarske pločice otpipetira se 150 μ L otopine fluoresceina i 25 μ L uzorka (75 mM fosfatnog pufera za slijepu probu ili otopine standarda Troloxa za izradu baždarnog pravca). Pločica s jažicama inkubira se u čitaču mikroploča 30 min/37 °C prije početka mjerenja. Nakon inkubacije mjeri se fluorescencija (λ eks. 485 nm i λ em. 520 nm) svakih 90 s kako bi se odredio pozadinski signal. Nakon 3 ciklusa, 25 μ L svježe pripremljenog 240 mM AAPH injektira se softverski pomoću unutarnjeg ubrizgavača. Mjerenje intenziteta fluorescencije traje do 120 min. Mjerenje se provodi spektrofotometrijski pri temperaturi od 37 °C uz λ eks. 485 nm i λ em. 520 nm. Trolox

(6–hidroksi–2,5,7,8–tetrametilkroman–2–ugljična kiselina) služi kao standard i za izradu baždarnog pravca te se ispituje antioksidacijska aktivnost otopine trolox različitih koncentracija (3,12 – 103,99 μM).

MARS softver (MARS 2.0 software, BMG LABTECH, Offenburg, Germany) za analizu podataka omogućuje automatsku evaluaciju. Mjerenje je provedeno u duplikatu te su rezultati prosječne vrijednosti dvaju mjerenja iskazani zajedno sa standardnom devijacijom. ORAC vrijednosti izražavaju se kao μmol trolox ekvivalenta po litri ($\mu\text{mol TE L}^{-1}$), odnosno preračunato na 100 g suhe tvari ekstrakta kao μmol trolox ekvivalenta na 100 g suhe tvari ekstrakta ($\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s.tv.e.}$).

3.8. OBRADA REZULTATA

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na izolaciju fenolnih spojeva, vitamina C i pigmenata iz liofiliziranih plodova dvije sorte pasjeg trna primjenom različitih otapala i vremena ekstrakcije (20, 30 i 40 min) te je određena antioksidacijska aktivnost ORAC metodom. Za ekstrakciju fenolnih spojeva i askorbinske kiseline korišteni su 30 i 70 %-tni etanol, a za ekstrakciju pigmenata *n*-heksan i aceton.

Dobiveni ekstrakti podvrgnuti su kromatografskoj analizi te su fenolni spojevi i askorbinska kiselina identificirani i kvantificirani pomoću UPLC-MS/MS metode, a pigmenti primjenom HPLC-UV-VIS/DAD metode.

Maseni udjeli identificiranih i kvantificiranih fenolnih spojeva i karotenoida prikazani su kao mg 100 g⁻¹ s.tv. uzorka. Antioksidacijska aktivnost izražena je kao μmol TE 100 g⁻¹ s.tv. uzorka.

4.1.BIOAKIVNI SPOJEVI PLODA PASJEG TRNA

4.1.1. Utjecaj parametara UAE na udio fenolnih spojeva u liofiliziranom plodu pasjeg trna

Tablica 6. Maseni udjeli fenolnih spojeva (mg 100 g⁻¹ s. tv.) ekstrahiranih iz ploda pasjeg trna (A – sorta „Leikora“, B – sorta „Ascola“) primjenom UAE

UZORAK	FLAVONOLI (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)	FLAVAN-3-OLI (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)	FLAVONI (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)	HBK (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)	HCK (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)	UKUPNO (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)
A1 20	81,83±0,83	0,46±0,04	0,72±0,05	18,95±0,43	13,63±0,69	115,58±0,30
A1 30	83,85±2,22	0,53±0,04	1,06±0,08	24,18±1,34	13,52±1,41	123,15± 5,10
A1 40	63,70±0,77	0,39±0,03	0,92±0,08	21,08±2,04	14,88±0,76	100,97±3,69
A2 20	100,81±2,31	0,46±0,02	1,11±0,03	28,56±1,42	10,03±0,04	140,97±3,83
A2 30	99,32±1,14	0,40±0,03	1,10±0,02	32,36±1,42	9,32±0,04	142,51±0,37
A2 40	82,43±1,45	0,45±0,01	0,95±0,04	23,70±0,60	14,50±0,85	122,03±2,95
B1 20	132,97±0,68	0,83±0,03	1,42±0,01	22,30±1,73	12,42±1,39	169,95±3,84
B1 30	126,74±0,94	0,96±0,01	1,15±0,04	26,92±0,75	18,28±1,76	174,05±3,50
B1 40	88,26±1,39	0,40±0,03	0,38±0,09	27,12±1,48	13,10±1,43	129,25±4,42
B2 20	154,10±1,47	1,36±0,01	1,12±0,04	17,21±1,69	7,98±0,39	181,78±3,52
B2 30	142,37±1,11	1,44±0,11	0,90±0,12	28,32±1,54	11,21±1,70	184,23±4,57
B2 40	93,73±1,44	1,10±0,07	0,71±0,14	23,76±2,34	12,04±2,02	131,34±6,01

*Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ± standardna devijacija; ekstrakt 1- vodena otopina etanola (30 %, v/v), ekstrakt 2 - vodena otopina etanola (70 %, v/v); vrijeme trajanja ekstrakcije u min: 20, 30 i 40; HBK – hidrosibenzojeve kiseline; HCK – hidrosicimne kiseline.

Tablica 6 prikazuje masene udjele pojedinih identificiranih skupina fenolnih spojeva ekstrahiranih iz liofiliziranih plodova dvije sorte pasjeg trna primjenom UAE.

Najviši udio ukupnih fenolnih spojeva (kao zbroj pojedinih skupina fenolnih spojeva) određen je u sorti „*Ascola*“ (184,23 mg 100 g⁻¹ s. tv.) pri UAE u trajanju 30 min uz 70 %-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo, a najniži udio određen je u sorti „*Leikora*“ (100,97 mg 100 g⁻¹ s. tv.) kada je kao ekstrakcijsko otapalo korišten 30 %-tni etanol tijekom UAE od 40 min. U obje sorte uočen je trend rasta ukupnih fenolnih spojeva do 30 min UAE te značajan pad istih nakon 30 min UAE bez obzira na korišteno ekstrakcijsko otapalo.

U svim analiziranim uzorcima najzastupljeniji fenolni spojevi bili su flavonoli (63,70-154,10 mg 100 g⁻¹ s. tv.), zatim slijede hidroksibenzojeve kiseline (HBK) (17,21-32,36 mg 100 g⁻¹ s. tv.) i hidroksicimetne kiseline (HCK) (7,98-18,28 mg 100 g⁻¹ s. tv.) te u znatno manjim udjelima identificirani su flavan-3-oli (0,39-1,44 mg 100 g⁻¹ s. tv.) i flavoni (0,38-1,42 mg 100 g⁻¹ s. tv.). Najviši udio flavonola ekstrahiran je iz obje sorte kada je kao otapalo korišten 70 %-tni etanol te vrijeme ekstrakcije u trajanju od 20 min („*Ascola*“ (154,10 mg 100 g⁻¹ s. tv.), „*Leikora*“ (100,81 mg 100 g⁻¹ s. tv.)), a najniži udio flavonola ekstrahiran je također kod obje sorte kada je kao otapalo korišten 30 %-tni etanol te vrijeme ekstrakcije od 40 min. U radu Ciesarova i sur. (2020) u plodu pasjeg trna najzastupljeniji su bili flavonoli i fenolne kiseline što je u skladu s rezultatima u ovom istraživanju. Statistički značajna razlika utvrđena je u udjelu flavonola i flavan-3-ola u ovisnosti o sortimentu (tablica 7). Dvostruko viši maseni udio flavonola određen je u sorti „*Ascola*“ (123,03 mg 100 g⁻¹ s. tv.) u odnosu na sortu „*Leikora*“ (85,33 mg 100 g⁻¹ s. tv.). Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem koje su proveli Rentsendavaa i sur. (2018), a velike razlike u udjelu fenolnih spojeva između sorti uzgajanih u jednakim agro-klimatskim uvjetima prisutne su zbog različitosti genetskog materijala (Ficzek i sur., 2019).

Iz priloženih rezultata u tablici 6 vidljivo je da se povećanjem vremena trajanja UAE udio flavonola smanjuje te da je općenito udio flavonola u sorti „*Ascola*“ otprilike 50 % viši u odnosu na sortu „*Leikora*“. Vrsta otapala statistički je značajno utjecala na udjele gotovo svih fenolnih spojeva osim na udio flavona (tablica 7). Veći maseni udjeli flavonola, flavan-3-ola i HBK određeni su u uzorcima kada je za ekstrakciju korišten 70 %-tni etanol, odnosno kod HCK kada je kao otapalo korišten 30 %-tni etanol.

Čulina i sur. (2021) u svom istraživanju koristili su 80 %-tni aceton kao otapalo prilikom UAE što je rezultiralo značajno višim masenim udjelima svih fenolnih spojeva naročito flavan-3-ola

(20.64 mg 100 g⁻¹ s. tv.) i HBK (145,95 mg 100 g⁻¹ s. tv.). Prema Zhou i sur. (2018), za ekstrahiranje fenolnih spojeva UAE-om najučinkovitija su duboka eutektička otapala.

Prema rezultatima statističke analize prikazanim u tablici 7, flavan-3-oli i flavoni jednako su ekstrahirani s 20 i 30 min. Budući da nema statistički značajne razlike između ekstrakcije u trajanju 20 i 30 min, UAE u trajanju od 20 min smatra se dovoljno dugom za ekstrakciju navedenih spojeva. Daljnjim povećanjem vremena ekstrakcije udio fenolnih spojeva se smanjuje.

Statistički značajna razlika nije uočena kod ekstrakcije HBK i HCK prilikom UAE u trajanju od 30 i 40 min. Stoga je ekstrakcija u trajanju 30 min dovoljna za ekstrahiranje HBK i HCK. Kraćom duljinom trajanja UAE doprinosi se uštedi energije.

Kod ukupnih vrijenosti fenolnih spojeva statistički značajna razlika utvrđena je u ovisnosti o sortimentu gdje je udio ukupnih fenolnih spojeva znatno viši u sorti „*Ascola*“ (161,77±1,12 mg 100 g⁻¹ s. tv.) u odnosu na sortu „*Leikora*“ (124,20±1,12 mg 100 g⁻¹ s. tv.). Isto tako, statistički značajna razlika utvrđena je u ovisnosti o korištenom otapalu i vremenu. Znatno viši udio ukupnih fenolnih spojeva ekstrahiran je korištenjem 70 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala, a najviši udio ekstrahiran je tijekom UAE u trajanju od 30 min.

Tablica 7. Rezultati statističke analize utjecaja parametara UAE na masene udjele fenolnih spojeva u uzorcima ploda pasjeg trna.

PARAMETR EKSTRAKCIJE	FLAVONOLI (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)	FLAVAN-3-OLI (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)	FLAVONI (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)	HBK (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)	HCK (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)	UKUPNO (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)
SORTA	p ≤ 0,05					
<i>Leikora</i>	85,33±0,41 ^a	0,45±0,01 ^a	0,98±0,02 ^a	24,80±0,43 ^a	12,65±0,35 ^a	124,20±1,12 ^a
<i>Ascola</i>	123,03±0,41 ^b	1,01±0,01 ^b	0,95±0,02 ^a	24,27±0,43 ^a	12,50±0,35 ^a	161,77±1,12 ^b
OTAPALO	p ≤ 0,05					
30 % EtOH	96,23±0,41 ^a	0,59±0,01 ^a	0,94±0,02 ^a	23,42±0,43 ^a	14,31±0,35 ^b	135,49±1,12 ^a
70 % EtOH	112,13±0,41 ^b	0,87±0,01 ^b	0,98±0,02 ^a	25,65±0,43 ^b	10,85±0,35 ^a	150,48±1,12 ^b
VRIJEME (min)	p ≤ 0,05					
20	117,43±0,50 ^c	0,78±0,02 ^b	1,09±0,03 ^b	21,76±0,53 ^a	11,01±0,43 ^a	152,07±1,37 ^b
30	113,07±0,50 ^b	0,83±0,02 ^b	1,05±0,03 ^b	27,95±0,53 ^c	13,08±0,43 ^b	155,98±1,37 ^b
40	82,03±0,50 ^a	0,59±0,02 ^a	0,74±0,03 ^a	23,91±0,53 ^b	13,63±0,43 ^b	120,90±1,37 ^a

*Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju određivanja ± standardna pogreška. Statistički značajna varijacija kod $p \leq 0,05$. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$. HBK – hidroksibenzojeve kiseline; HCK – hidroksicimne kiseline.

Roman i sur. (2020) u svom istraživanju definirali su ekstrakcijske uvjete za maksimalan prinos fenolnih spojeva iz ploda pasjeg trna pomoću UAE: vrijeme trajanja 45 min; temperatura 40 °C; frekvencija 40 kHz; snaga 100 W. Visok udio ukupnih fenolnih spojeva i flavonoida te veća antioksidacijska aktivnost određeni su u ekstraktima dobivenim pri optimalnim uvjetima UAE uz upotrebu smjese otapala etanol:aceton (4:3).

Tablica 8. Maseni udjeli pojedinih fenolnih spojeva (mg 100 g⁻¹ s. tv.) ekstrahiranih iz ploda pasjeg trna primjenom UAE (sorta A – „Leikora“).

	A1 20	A1 30	A1 40	A2 20	A2 30	A2 40
FLAVONOLI (mg 100 g⁻¹ s.tv.)						
Izorametin-3-sinapoglukozid-glukoza-7-ramnozid	0,10±0,02	0,10±0,01	0,35±0,02	0,13±0,01	0,08±0,02	0,04±0,02
Izorametin-3-soforozid-7-ramnozid	0,60±0,02	0,62±0,05	1,18±0,02	0,90±0,01	0,58±0,21	0,40±0,02
Izorametin-3-rutinozid-7-glukozid	0,93±0,01	0,78±0,01	0,33±0,01	1,01±0,01	0,83±0,01	0,59±0,02
Kvercetin-3-soforozid-7-ramnozid	0,73±0,02	0,71±0,01	0,06±0,02	0,23±0,02	0,55±0,02	0,537±0,01
Kvercetin-3-ramglukozid-7-ramnozid	0,49±0,01	0,41±0,01	0,28±0,02	0,53±0,01	0,39±0,02	0,15±0,01
Kamferol-soforozid-ramnozid	0,81±0,01	2,20±0,02	0,39±0,01	0,77±0,01	0,81±0,01	0,49±0,01
Izorametin-3,7-diheksozid	1,34±0,03	0,53±0,01	0,44±0,01	1,48±0,01	1,19±0,01	0,34±0,01
Izorametin-3-rutinozid	15,28±0,01	12,62±0,02	13,12±0,01	16,55±0,02	13,36±0,02	9,48±0,02
Rutin	15,93±0,01	15,71±2,80	11,81±0,05	16,39±0,03	15,40±0,01	14,23±0,02
Kamferol-heksozid-ramnozid	2,28±0,02	2,21±0,02	1,83±0,01	1,98±0,03	2,18±0,02	1,85±0,02
Kamferol-3-rutinozid	0,75±0,01	1,64±0,01	5,86±0,01	0,97±0,03	7,47±0,01	5,69±0,03
Izorametin-3-heksozid	28,53±0,01	32,37±0,06	20,73±0,09	43,95±0,04	42,52±0,01	34,40±0,03
Kvercetin-3-glukozid	3,82±0,02	3,19±0,05	1,10±0,08	5,07±0,01	3,91±0,02	4,21±0,03
Izorametin-3-ramnozid	2,04±0,03	2,34±0,01	1,44±0,04	2,43±0,03	2,37±0,02	1,57±0,02
Kvercetin-3-ramnozid	0,93±0,01	0,81±0,01	0,53±0,06	0,90±0,02	0,70±0,02	0,63±0,01
Kvercetin-3-pentozid	0,08±0,02	0,07±0,02	0,05±0,02	0,79±0,01	0,07±0,00	0,18±0,01
Kamferol-ramnozid	2,06±0,02	1,87±0,02	1,92±0,01	1,59±0,02	1,89±0,02	1,30±0,02

Tablica 8. Maseni udjeli pojedinih fenolnih spojeva (mg 100 g⁻¹ s. tv.) ekstrahiranih iz ploda pasjeg trna primjenom UAE (sorta A – „Leikora“) - nastavak

Izoramnetin	0,35±0,01	0,35±0,02	0,24±0,03	0,63±0,01	0,40±0,00	0,27±0,02
Kamferol	4,78±0,02	5,33±0,02	2,05±0,04	4,52±0,01	4,64±0,01	6,09±0,01
UKUPNO:	81,83±0,03	83,85±0,03	63,70±0,03	100,81±0,2	99,33±0,02	82,42±0,03
FLAVAN-3-OLI (mg 100 g⁻¹ s.tv.)						
Epikatehin	0,16±0,02	0,27±0,01	0,18±0,01	0,24±0,01	0,19±0,01	0,24±0,01
Katehin	0,30±0,02	0,26±0,01	0,21±0,02	0,22±0,02	0,21±0,01	0,21±0,01
UKUPNO:	0,46±0,02	0,53±0,01	0,39±0,01	0,46±0,02	0,40±0,01	0,45±0,01
FLAVONI (mg 100 g⁻¹ s.tv.)						
Luteolin	0,25±0,01	0,72±0,02	0,54±0,01	0,70±0,01	0,76±0,00	0,54±0,02
Apigenin	0,47±0,02	0,34±0,02	0,38±0,01	0,42±0,01	0,34±0,02	0,41±0,01
UKUPNO:	0,72±0,02	1,06±0,02	0,92±0,01	1,11±0,01	1,10±0,02	0,95±0,02
HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE (mg 100 g⁻¹ s.tv.)						
Siringinska kiselina	0,20±0,02	0,16±0,03	0,04±0,01	0,14±0,02	0,32±0,02	0,08±0,01
Vanilinska kiselina	2,20±0,02	2,23±0,03	7,36±0,01	6,45±0,01	6,79±0,01	8,89±0,01
Elaginska kiselina- heksozid	2,44±0,02	2,16±0,01	1,00±0,02	2,90±0,03	2,31±0,02	1,97±0,02
Galna kiselina	1,86±0,03	1,93±0,01	1,28±0,01	1,23±0,01	0,89±0,01	2,17±0,01
Protokatehuinska kiselina	1,56±0,02	0,51±0,01	0,66±0,01	1,67±0,02	0,63±0,01	0,74±0,01
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	3,48±0,03	2,49±0,01	5,67±0,03	4,28±0,02	8,44±0,01	5,56±0,01
Ružmarinska kiselina	0,29±0,04	0,28±0,01	0,22±0,02	0,23±0,01	0,24±0,02	0,14±0,02
Klorogenska kiselina	0,04±0,02	0,06±0,01	0,04±0,01	0,05±0,02	0,08±0,01	0,03±0,01
Ferulinska kiselina	2,72±0,01	3,31±0,02	0,53±0,01	1,43±0,01	3,14±0,02	2,78±0,02

Tablica 8. Maseni udjeli pojedinih fenolnih spojeva (mg 100 g⁻¹ s. tv.) ekstrahiranih iz ploda pasjeg trna primjenom UAE (sorta A – „Leikora“) - nastavak

Kafeinska kiselina	4,16±0,01	11,06±0,01	4,26±0,02	10,19±0,02	9,53±0,01	1,34±0,03
UKUPNO:	18,95±0,02	24,18±0,02	21,08±0,02	28,57±0,02	32,36±0,01	23,70±0,02
HIDROKSICIMETNE KISELINE (mg 100 g⁻¹ s.tv.)						
<i>p</i> -kumarinska kiselina	1,71±0,04	4,59±0,03	3,81±0,01	1,82±0,01	nd	4,29±0,01
Cimetna kiselina	11,92±0,01	8,93±0,01	11,07±0,01	8,21±0,01	9,32±0,01	10,22±0,02
UKUPNO:	13,63±0,02	13,52±0,02	14,88±0,01	10,03±0,01	9,32±0,01	14,50±0,02

1 – 30 %-tni etanol, 2 – 70 %-tni etanol, 20 – vrijeme UAE 20 minuta, 30 – vrijeme UAE 30 minuta, 40 – vrijeme UAE 40 min

Tablica 9. Maseni udjeli pojedinih fenolnih spojeva (mg 100 g⁻¹ s. tv.) ekstrahiranih iz ploda pasjeg trna primjenom UAE (sorta B – „Ascola“).

	B1 20	B1 30	B1 40	B2 20	B2 30	B2 40
FLAVONOLI (mg 100 g⁻¹ s.tv.)						
Izoramnetin-3-sinapoglukozid-glukoza-7-ramnozid	0,39±0,01	0,20±0,02	0,09±0,01	0,18±0,01	0,41±0,02	0,48±0,01
Izoramnetin-3-soforozid-7-ramnozid	0,98±0,02	0,79±0,01	0,56±0,01	1,01±0,03	0,91±0,01	0,95±0,02
Izoramnetin-3-rutinozid-7-glukozid	1,14±0,02	0,88±0,02	1,01±0,02	1,06±0,02	1,03±0,02	0,17±0,00
Kvercetin-3-soforozid-7-ramnozid	0,19±0,01	0,16±0,02	0,82±0,77	0,24±0,01	0,20±0,01	0,74±0,02
Kvercetin-3-ramglukozid-7-ramnozid	0,54±0,01	0,48±0,02	0,25±0,01	0,60±0,01	0,45±0,01	0,83±0,02
Kamferol-soforozid-ramnozid	0,13±0,02	0,09±0,0	0,84±0,01	1,35±0,02	1,23±0,01	0,40±0,00
Izoramnetin-3,7-diheksozid	0,73±0,01	0,61±0,01	0,46±0,00	1,98±0,02	0,63±0,00	0,35±0,01

Tablica 9. Maseni udjeli pojedinih fenolnih spojeva (mg 100 g⁻¹ s. tv.) ekstrahiranih iz ploda pasjeg trna primjenom UAE (sorta B – „Ascola“) - nastavak

Izoramnetin-3-rutinozid	21,84±0,02	25,22±0,02	15,89±0,01	27,87±0,06	22,43±0,00	15,76±0,01
Rutin	21,26±0,02	20,99±0,01	17,09±0,06	23,75±0,08	21,12±0,01	11,46±0,01
Kamferol-heksozid-ramnozid	1,66±0,02	1,63±0,02	1,66±0,01	1,80±0,02	1,99±0,01	1,86±0,02
Kamferol-3-rutinozid	2,33±0,03	1,62±0,01	1,74±0,01	3,87±0,01	4,59±0,02	4,52±0,02
Izoramnetin-3-heksozid	62,55±0,03	51,12±0,01	32,56±0,04	69,73±0,05	62,78±0,03	46,22±0,01
Kvercetin-3-glukozid	8,36±0,03	8,77±0,01	5,33±0,02	10,85±0,03	10,63±0,03	2,48±0,01
Izoramnetin-3-ramnozid	3,15±0,02	3,48±0,02	2,33±0,02	3,96±0,00	2,96±0,02	1,00±0,01
Kvercetin-3-ramnozid	1,22±0,02	2,66±0,02	0,99±0,01	1,14±0,01	1,16±0,01	0,63±0,00
Kvercetin-3-pentozid	0,13±0,01	0,21±0,02	0,47±0,01	0,18±0,02	0,33±0,00	0,33±0,01
Kamferol-ramnozid	1,46±0,02	2,35±0,02	1,65±0,02	0,32±0,01	4,40±0,00	0,99±0,01
Izoramnetin	0,26±0,02	0,31±0,01	0,23±0,01	0,37±0,02	0,60±0,04	0,25±0,02
Kamferol	4,65±0,01	5,18±0,01	4,27±0,01	3,84±0,04	4,54±0,01	4,31±0,01
UKUPNO:	132,97±0,02	126,74±0,02	88,26±0,02	154,10±0,02	142,37±0,03	93,73±0,01
FLAVAN-3-OLI (mg 100 g⁻¹ s.tv.)						
Epikatehin	0,35±0,01	0,41±0,02	0,22±0,01	0,66±0,02	0,72±0,05	0,55±0,02
Katehin	0,48±0,01	0,55±0,01	0,17±0,16	0,70±0,01	0,71±0,06	0,55±0,02
UKUPNO:	0,83±0,01	0,96±0,02	0,39±0,05	1,36±0,02	1,44±0,05	1,10±0,02
FLAVONI (mg 100 g⁻¹ s.tv.)						
Luteolin	0,66±0,02	0,39±0,01	0,17±0,00	0,66±0,01	0,46±0,01	0,29±0,01
Apigenin	0,76±0,02	0,76±0,01	0,21±0,01	0,47±0,01	0,44±0,02	0,42±0,03

Tablica 9. Maseni udjeli pojedinih fenolnih spojeva (mg 100 g⁻¹ s. tv.) ekstrahiranih iz ploda pasjeg trna primjenom UAE (sorta B – „Ascola“) - nastavak

UKUPNO:	1,42±0,02	1,15±0,01	0,38±0,01	1,13±0,01	0,90±0,02	0,71±0,02
HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE (mg 100 g⁻¹ s.tv.)						
Siringinska kiselina	0,14±0,02	0,06±0,01	0,23±0,02	0,12±0,01	0,25±0,04	0,53±0,03
Vanilinska kiselina	5,59±0,01	1,48±0,02	10,00±0,02	0,54±0,02	2,77±0,02	10,11±0,03
Elaginska kiselina- heksozid	4,59±0,03	4,12±0,03	1,96±0,01	5,23±0,01	5,65±0,02	2,97±0,03
Galna kiselina	1,21±0,01	2,51±0,02	2,12±0,03	2,07±0,01	2,15±0,01	2,63±0,01
Protokatehuinska kiselina	1,52±0,02	1,05±0,01	0,69±0,03	1,24±0,03	1,15±0,03	0,95±0,02
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	4,25±0,03	3,61±0,02	4,97±0,03	2,36±0,01	4,24±0,01	5,26±0,09
Ružmarinska kiselina	0,45±0,02	0,39±0,02	0,38±0,02	0,41±0,01	0,37±0,02	0,30±0,01
Klorogenska kiselina	0,07±0,01	0,09±0,02	0,05±0,02	0,12±0,02	0,09±0,03	0,08±0,02
Ferulinska kiselina	0,67±0,02	1,26±0,02	2,99±0,01	1,83±0,02	0,76±0,01	0,23±0,03
Kafeinska kiselina	3,82±0,03	12,36±0,01	3,75±0,03	3,31±0,02	10,89±0,01	0,70±0,01
UKUPNO:	22,30±0,03	26,92±0,02	27,12±0,03	17,21±0,02	28,32±0,02	23,76±0,03
HIDROKSICIMETNE KISELINE (mg 100 g⁻¹ s.tv.)						
<i>p</i> -kumarinska kiselina	2,24±0,03	3,55±0,01	0,18±0,01	1,42±0,01	1,88±0,02	1,20±0,05
Cimetna kiselina	10,18±0,01	14,73±0,02	12,92±0,01	6,56±0,02	9,33±0,02	10,838±0,011
UKUPNO:	12,42±0,02	18,28±0,02	13,10±0,01	7,98±0,02	11,21±0,02	12,04±0,07

U tablicama 8 i 9 prikazani su rezultati udjela pojedinačnih fenolnih spojeva analiziranih ekstrakata plodova pasjeg trna sorti „Leikora“ i „Ascola“.

U analiziranim ekstraktima u najvećem udjelu određeni su flavonoli i to uglavnom glikozidi izoramnetina, kvercetina i kamferola što je u skladu s istraživanjem Teleszko i sur. (2015). Najzastupljeniji flavonoli su izoramnetin-3-heksozid (20,73-69,73 mg 100 g⁻¹ s. tv.), rutin (11,460-23,754 mg 100 g⁻¹ s. tv.) te izoramnetin-3-rutinozid (9,475-27,871 mg 100 g⁻¹ s. tv.) što je u skladu s istraživanjem Yang i sur. (2009). U ovom istraživanju u većem udjelu određen je izoramnetin-3-heksozid (27,76–45,16 mg 100 g⁻¹ s. tv.), a u manjem kamferol (2,051-6,092 mg 100 g⁻¹ s. tv.) u usporedbi s rezultatima istraživanja Čulina i sur. (2021).

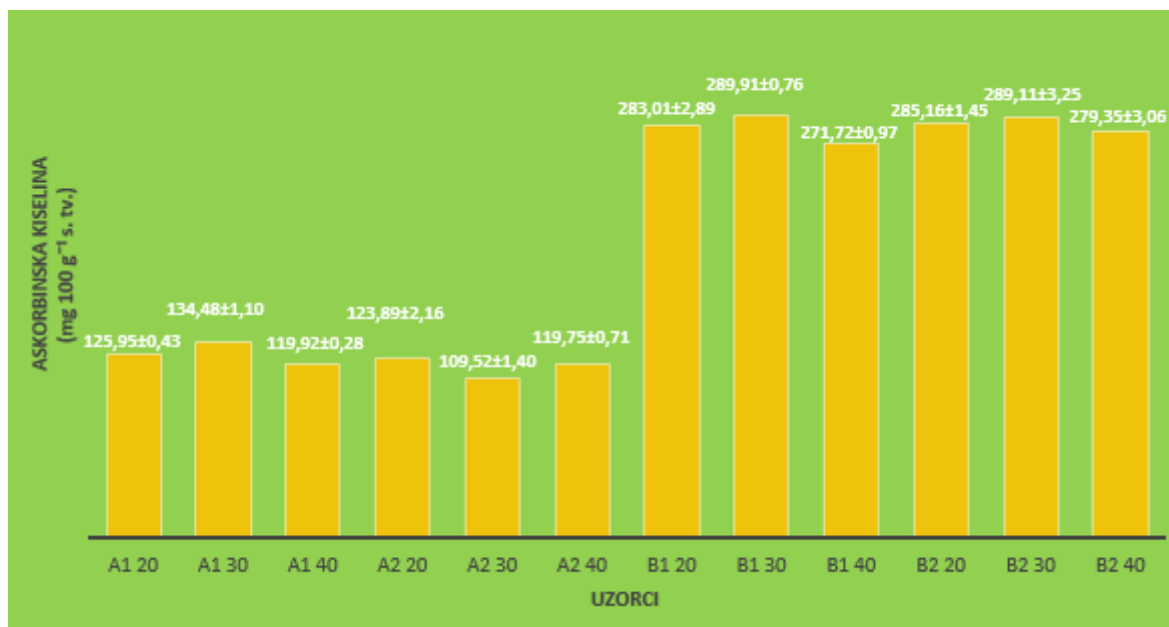
Najviši udjeli (tablica 9) izoramnetin-3-heksozida, rutina, izoramnetin-3-rutinozida određeni su u uzorcima sorte „Ascola“ kada je za ekstrakciju korišteno otapalo 70 %-tni etanol te vrijeme ekstrakcije od 20 min.

Najzastupljenije fenolne kiseline u ekstraktima plodova pasjeg trna u ovom istraživanju su cimetna (6,557-14,727 mg 100 g⁻¹ s. tv.) i kafeinska (0,704-12,362 mg 100 g⁻¹ s. tv.), dok je galna kiselina prisutna u znatno manjem udjelu (0,887-2,633 mg 100 g⁻¹ s. tv.). U znatnim udjelima prisutne su i vanilinska (1,48-10,108 mg 100 g⁻¹ s. tv.) te *p*-hidroksibenzojeva kiselina (2,356-8,436 mg 100 g⁻¹ s. tv.). Ekstrakti sorte „Ascola“ sadrže znatno manji udio fenolnih kiselina u odnosu na ekstrakte sorte „Leikora“ što je u skladu sa rezultatima istraživanja Sytařová i sur. (2019). Bittova i sur. (2014) su u svom radu utvrdili kako je najzastupljenija fenolna kiselina u pasjem trnu galna kiselina, a Zadernowski i sur. (2005) istaknuli su salicilnu kiselinu kao najzastupljeniju. Najveći udio fenolnih kiselina određen je u uzorcima ekstrahiranim 30 min (tablice 8 i 9).

Maseni udjeli epikatehina i katehina u obje sorte pasjeg trna određeni su u vrijednostima manjim od 1 mg 100 g⁻¹ s. tv. što je značajno manje nego u radu Čulina i sur. (2021) gdje je udio epikatehina u ekstraktima ploda pasjeg trna bio u rasponu od 4,89 do 14,67 mg 100 g⁻¹ s. tv., a katehina od 1,84 do 5,97 mg 100 g⁻¹ s. tv. Razlog tomu može biti utjecaj ekstrakcijskog otapala i metode ekstrakcije.

4.1.2. Utjecaj UAE na udio askorbinske kiseline u liofiliziranom plodu pasjeg trna

Slika 9 prikazuje rezultate masenog udjela askorbinske kiseline u ekstraktima sorte „Ascola“ i „Leikora“.



Slika 9. Prikaz masenog udjela askorbinske kiseline u sortama „Leikora“ i „Ascola“ (mg 100 g⁻¹ s.tv.). A = „Leikora“, B = „Ascola“, 1 = 30 % EtOH, 2 = 70 % EtOH, 20 = vrijeme ekstrakcije 20 min, 30 = vrijeme ekstrakcije 30 min, 40 = vrijeme ekstrakcije 40 min

U odnosu na sortu „Leikora“ znatno viši udio askorbinske kiseline određen je u ekstraktima sorte „Ascola“. U uzorcima je uočen trend rasta udjela askorbinske kiseline do 30 min UAE nakon čega slijedi pad. Najviši udjeli askorbinske kiseline određeni su u uzorcima ploda „Ascola“ (≈ 289 mg 100 g⁻¹ s.tv.) kada je UAE provedena u trajanju od 30 min. Najviši udjeli askorbinske kiseline u sorti „Leikora“ (134,48 mg 100 g⁻¹ s.tv.) određeni su u ekstraktima s 30 %-tnim etanolom, a najniži u ekstraktima sa 70 %-tnim etanolom (109,52 mg 100 g⁻¹ s.tv.) i vremenu UAE od 30 min. Statistička analiza pokazala je da sortiment ima statistički značajan utjecaj na udio askorbinske kiseline (tablica 10) što je u skladu s istraživanjem Teleszko i sur. (2015). U istraživanju Teleszko i sur. (2015) maseni udjeli askorbinske kiseline između različitih sorti pasjeg trna bili su u rasponu od 28 do 2500 mg 100 g⁻¹, a značajan utjecaj na udio askorbinske kiseline imali su sortiment i sezonski uvjeti.

Tablica 10. Rezultati statističke analize utjecaja parametara UAE na masene udjele askorbinske kiseline u uzorcima ploda pasjeg trna

PARAMETR EKSTRAKCIJE	ASKORBINSKA KISELINA (mg 100 g⁻¹ s.tv.)
SORTA	p ≤ 0,05
<i>Leikora</i>	122,25±0,53 ^a
<i>Ascola</i>	283,04±0,53 ^b
OTAPALO	p ≤ 0,05
30% EtOH	204,17±0,53 ^b
70% EtOH	201,13±0,53 ^a
VRIJEME (min)	p ≤ 0,05
20	204,50±0,65 ^b
30	205,76±0,65 ^b
40	197,69±0,65 ^a

*Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju određivanja ± standardna pogreška. Statistički značajna varijacija kod $p \leq 0,05$. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

4.1.3. Utjecaj parametara UAE na udio ukupnih i pojedinih pigmenata u liofiliziranom plodu pasjeg trna

Tablica 11. Maseni udjeli ukupnih pigmenata (mg 100 g⁻¹ s. tv.) ekstrahiranih iz ploda pasjeg trna (A – sorta „Leikora“, B – sorta „Ascola“) primjenom UAE

UZORAK	UKUPNI PIGMENTI (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)
A3 20	52,36±3,28
A3 30	55,59±2,55
A3 40	53,43±1,48
A4 20	70,59±0,81
A4 30	73,61±2,08
A4 40	58,55±2,42
B3 20	58,67±0,92
B3 30	61,94±0,23
B3 40	60,68±0,76
B4 20	69,52±0,78
B4 30	61,20±0,88
B4 40	71,59±2,14

*Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja ± standardna devijacija; ekstrakt 3-otopina *n*-heksana, ekstrakt 4 - otopina acetona; vrijeme trajanja ekstrakcije u min: 20, 30 i 40.

Udio ukupnih pigmenata u analiziranim ekstraktima plodova pasjeg trna određen je u rasponu od 52,36 do 73,61 mg 100 g⁻¹ s. tv. (tablica 11). Najveći udio ukupnih pigmenata određen je u uzorku sorte „Leikora“ koji je ekstrahiran 30 min uz aceton kao ekstrakcijsko otapalo, a najmanji udio u uzorku sorte „Leikora“ ekstrahiranom 20 min uz *n*-hexan kao ekstrakcijsko otapalo.

U istraživanju Pop i sur. (2014) udio ukupnih pigmenata u analiziranim uzorcima pasjeg trna kretao se u rasponu od 53 do 97 mg 100 g⁻¹ s. tv.

Tablica 12. Rezultati statističke analize utjecaja parametara UAE na masene udjele ukupnih pigmentata u uzorcima ploda pasjeg trna.

PARAMETAR EKSTRAKCIJE	UKUPNI PIGMENTI (mg 100 g ⁻¹ s. tv.)
SORTA	p ≤ 0,05
<i>Leikora</i>	60,69±0,51 ^a
<i>Ascola</i>	63,93±0,51 ^b
OTAPALO	p ≤ 0,05
<i>n</i> -heksan	57,11±0,51 ^a
acetone	67,51±0,51 ^b
VRIJEME (min)	p ≤ 0,05
20 min	62,79±0,63 ^a
30 min	63,09±0,63 ^a
40 min	61,06±0,63 ^a

*Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju određivanja ± standardna pogreška. Statistički značajna varijacija kod $p \leq 0,05$. Srednje vrijednosti unutar kolone označene različitim slovima međusobno se statistički razlikuju na $p \leq 0,05$.

Statistička analiza pokazala je da su sortiment i ekstrakcijsko otapalo značajno utjecali na udio ukupnih pigmentata dok vrijeme ekstrakcije nije imalo statistički značajan utjecaj (tablica 12). Veći udjeli pigmentata određeni su u acetonskim ekstraktima sorte „*Ascola*“.

U tablici 13 prikazani su maseni udjeli pojedinačnih pigmentata (mg 100 g⁻¹ s. tv.) izolirani iz plodova pasjeg trna primjenom UAE te zbroj pojedinačnih karotenoida izražen kao ukupni karotenoidi.

Tablica 13. Maseni udjeli pojedinačnih karotenoida (mg 100 g⁻¹ s. tv.) izoliranih iz ploda pasjeg trna primjenom STD

	A3 20	A3 30	A3 40	A4 20	A4 30	A4 40	B3 20	B3 30	B3 40	B4 20	B4 30	B4 40
	mg 100 g ⁻¹ s. tv.	mg 100 g ⁻¹ s. tv.	mg 100 g ⁻¹ s.tv.	mg 100 g ⁻¹ s.tv.	mg 100 g ⁻¹ s.tv.	mg 100 g ⁻¹ s.tv.	mg 100 g ⁻¹ s.tv.	mg 100 g ⁻¹ s.tv.	mg 100 g ⁻¹ s.tv.	mg 100 g ⁻¹ s.tv.	mg 100 g ⁻¹ s.tv.	mg 100 g ⁻¹ s.tv.
zeaksantin	0,68±0,03	0,73±0,02	0,87±0,02	2,80±0,91	2,95±0,61	3,48±0,05	0,34±0,01	0,46±0,04	0,48±0,02	1,51±0,12	1,88±0,00	1,85±0,14
β-kriptoksantin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,79±0,00	1,12±0,01	1,12±0,19	1,87±0,10	1,07±0,03	2,24±0,07
zeaksantin miristat	1,12±0,06	1,22±0,02	1,34±0,02	1,33±0,10	1,56±0,05	1,58±0,10	4,02±0,00	5,07±0,03	5,27±0,42	4,63±0,55	4,83±0,03	5,62±0,63
δ-karoten	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,85±0,04	1,02±0,01	1,29±0,03	1,06±0,05	0,97±0,02	1,31±0,5
β-karoten	0,95±0,03	1,04±0,02	1,08±0,07	0,95±0,07	1,02±0,04	1,13±0,04	5,31±0,01	6,79±0,37	6,93±0,62	5,88±0,64	6,47±0,31	7,02±0,34
cis-γ-karoten	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,10±0,15	1,46±0,14	1,47±0,09	0,95±0,02	1,39±0,00	1,10±0,34
derivat likopena	nd	nd	nd	nd	nd	0,29±0,01	5,56±0,63	6,98±0,00	7,08±0,47	5,87±0,59	6,65±0,27	7,86±1,37
lutein palmitat	20,60±0,07	21,85±0,90	19,67±1,62	17,43±1,28	17,17±0,91	18,49±1,47	15,16±0,90	18,81±1,81	18,38±0,61	17,22±0,45	17,92±1,55	18,13±0,23
zeaksantin palmitat	3,51±0,14	3,79±0,47	3,85±0,60	3,95±0,41	4,07±0,08	4,51±0,36	2,93±0,02	3,80±0,11	3,80±0,91	3,54±0,56	3,62±0,01	4,07±0,03
cis-β-karoten	0,48±0,01	0,49±0,02	0,44±0,01	0,67±0,02	0,68±0,27	0,74±0,03	0,26±0,06	0,31±0,02	0,29±0,01	0,44±0,06	0,51±0,07	0,49±0,00
derivat β-kriptoksantina	0,98±0,01	1,09±0,09	1,07±0,09	0,88±0,01	0,91±0,01	0,80±0,06	0,74±0,02	0,97±0,02	0,99±0,11	0,75±0,05	0,17±0,03	0,78±0,03
lutein dimiristat	2,43±0,01	2,33±0,02	1,97±0,07	6,93±0,95	7,37±0,22	3,24±0,11	2,91±0,54	1,32±0,03	1,30±0,02	4,83±0,01	6,40±0,03	3,07±0,08
zeaksantin-palmitat-miristat	1,39±0,01	1,47±0,03	1,47±0,02	3,57±0,20	3,78±0,04	2,37±0,01	1,71±0,25	0,93±0,01	0,94±0,02	2,20±0,01	0,48±0,08	1,66±0,02
lutein dipalmitat	10,52±0,06	10,84±0,10	10,22±0,29	19,89±1,41	21,20±1,00	8,08±0,88	10,95±1,53	5,86±0,20	3,88±0,50	11,52±0,55	2,12±0,05	7,71±0,20
zeaksantin dipalmitat	9,70±0,25	10,75±1,10	11,44±0,64	12,21±0,22	12,90±2,10	13,84±1,91	6,04±0,06	7,06±1,13	7,45±1,31	7,25±0,50	6,72±0,09	8,69±0,05
UKUPNO:	52,36±0,40	55,59±0,67	53,43±3,41	70,59±5,57	73,61±4,70	58,55±4,96	58,67±4,09	61,94±3,80	60,68±4,93	69,52±4,27	61,20±2,11	71,59±3,22

*nd – nije detektirano

A – sorta „Leikora“, B – sorta „Ascola“, 3 – n-hexan, 4 – aceton, 20 – UAE 20 min, 30 – UAE 30 min, 40 – UAE 40 min

Ukupni karotenoidi određeni su u rasponu od 52,36 do 71,59 mg 100 g⁻¹ s. tv., a najmanji udio određen je u heksanskim ekstraktima ploda sorte „*Leikora*“ nakon ekstrakcije od 20 min te najveći u acetonskim ekstraktima sorte „*Leikora*“ nakon ekstrakcije od 40 min.

Prema istraživanju Roman i sur. (2020) ukupna koncentracija karotenoida u plodovima bila je 42,43 mg 100 g⁻¹ s. tv. U ovom istraživanju maseni udio ukupnih karotenoida u ekstraktima ploda niži je nego u istraživanju Andersson i sur. (2009) gdje je udio karotenoida ovisno o sorti (Ljubiteljskaja, BHi 727102, 72587, BHi 72588) bio u rasponu od 12-142,5 mg 100 g⁻¹ s. tv. Vjerojatno je UAE utjecala na veću degradaciju karotenoida u odnosu na maceraciju koju su koristili Andersson i sur. (2009) te različito ekstrakcijsko otapalo [etanol 99,7%/n-heksan, u omjeru 4:3, uključujući 0,01 % butilirani hidroksitoluen (BHT)]. Prema Saini i Keum (2018) optimalan raspon intenziteta ultrazvuka prilikom UAE ključan je parametar za postizanje najvećeg prinosa karotenoida i za njihovu stabilnost, a iznad optimalnog raspona može doći do značajne degradacije antioksidativnih spojeva, uključujući i karotenoida. Najviši prinos zeaksantina i β-karotena iz zelene mikroalge *Chlorella saccharophila* bio je kada se za ekstrakciju koristio aceton i vrijeme UAE od 13,48 min (Saini i Keum, 2018).

Bekker i Glushenkova (2001) u svojoj studiji zaključili su da toplo i sunčano vrijeme s umjerenim oborinama pogoduje koncentriranju karotenoida u bobicama pasjeg trna te da sadržaj karotenoida uvelike varira ovisno o klimi tijekom vegetativnog razdoblja. Međutim, Andersson i sur. (2009) u svom su istraživanju zaključili kako udio karotenoida u većoj mjeri ovisi o sorti tj. genetskom materijalu, nego o agro-klimatskim utjecajima.

U analiziranim ekstraktima identificirano je 15 karotenoidnih pigmenata, a najzastupljeniji spojevi bili su lutein palmitat (15,16-21,85 mg 100 g⁻¹ s. tv.), lutein dipalmitat (2,12-21,20 mg 100 g⁻¹ s. tv.), zeaksantin dipalmitat (6,04-13,84 mg 100 g⁻¹ s. tv.) i lutein dimiristat (1,30-7,37 mg 100 g⁻¹ s. tv.). Drugi identificirani pigmenati bili su određeni u znatno manjim udjelima. U sorti „*Leikora*“ u izrazito niskim udjelima određeni su β-karoten (0,95-1,13 mg 100 g⁻¹ s. tv.) i *cis*-β-karoten (0,44-0,74 mg 100 g⁻¹ s. tv.), dok δ-karoten i *cis*-γ-karoten nisu detektirani. U odnosu na sortu „*Leikora*“, u sorti „*Ascola*“ u višim udjelima određen je β-karoten (5,31-7,02 mg 100 g⁻¹ s. tv.), a u nižim *cis*-β-karoten (0,26-0,51 mg 100 g⁻¹ s. tv.). U sorti „*Ascola*“ u niskim udjelima određeni su δ-karoten (0,85-1,31 mg 100 g⁻¹ s. tv.) i *cis*-γ-karoten (0,95-1,47 mg 100 g⁻¹ s. tv.).

Udio zeaksantin dipalmitata određen je u sorti „*Ascola*“ (6,04-8,69 mg 100 g⁻¹ s. tv.) u gotovo dva puta manjem udjelu nego u sorti „*Leikora*“ (9,70-13,84 mg 100 g⁻¹ s. tv.), a veći maseni udio ekstrahiran je kada se aceton koristio kao ekstrakcijsko otapalo te povećanjem vremena ekstrakcije.

Korištenjem heksana kao ekstrakcijskog otapala tijekom UAE u trajanju od 30 min ekstrahiran je najviši maseni udio lutein palmitata i iz sorte „*Leikora*“ (21,85 mg 100 g⁻¹ s. tv.), i iz sorte „*Ascola*“ (18,81 mg 100 g⁻¹ s. tv.). Najviši maseni udjeli lutein dipalmitata u obje sorte ekstrahirani su korištenjem acetona kao ekstrakcijskog otapala tijekom UAE u trajanju od 20 min kod sorte „*Ascola*“ (11,52 mg 100 g⁻¹ s. tv.), odnosno 30 min kod sorte „*Leikora*“ (21,20 mg 100 g⁻¹ s. tv.).

Za razliku od sorte „*Leikora*“, derivat likopena određen je u sorti „*Ascola*“ u rasponu od 5,56 do 7,86 mg 100 g⁻¹ s. tv., a udio derivata likopena bio je veći u acetonskim ekstraktima te se povećavao produljenjem vremena ekstrakcije.

Maseni udio β-karotena značajno se razlikuje između sorti te je u sorti „*Ascola*“ određeno oko sedam puta više β-karotena nego u sorti „*Leikora*“, a maseni udio se u obje sorte povećavao s vremenom ekstrakcije i kada je aceton korišten kao ekstrakcijsko otapalo.

Prema literaturnim podacima u plodu pasjeg trna najzastupljeniji karotenoidi bili su zeaksantin dipalmitat i β-karoten, a najmanje zastupljeni likopen i lutein (Criste i sur. 2020; Telezko i sur. 2015; Pop i sur. 2014). Međutim, u istraživanju Madawala i sur. (2018) određen je visoki udio luteina u plodu pasjeg trna, a niski udio zeaksantina. Sastav i maseni udio karotenoida u pasjem trnu ovisi o sortimentu, uvjetima uzgoja, lokaciji, klimi i vremenu berbe (Raffo i sur., 2004). Roman i sur. (2020) su u svom istraživanju definirali ekstrakcijske uvjete za maksimalan prinos fitokemikalija iz ploda pasjeg trna pomoću UAE: vrijeme trajanja 45 min; temperatura 40 °C; frekvencija 40 kHz; snaga ultrazvuka 100 W. Optimiziranom UAE i korištenjem ekstrakcijskog otapala etil acetat:heksan (2:1) ekstrahirani su veći udjeli ukupnih karotenoida, β-karotena te likopena.

4.1.4. Utjecaj UAE na antioksidacijsku aktivnost

Tablica 14. Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s. tv.}$) ekstrakata ploda pasjeg trna primjenom ORAC metode

UZORAK	ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST ($\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s. tv.}$)
A1 20	1324,20 \pm 3,18
A1 30	1325,04 \pm 3,10
A1 40	1001,66 \pm 2,62
A2 20	2755,95 \pm 3,23
A2 30	2706,07 \pm 4,88
A2 40	2667,77 \pm 5,31
B1 20	1290,89 \pm 6,16
B1 30	1300,99 \pm 6,00
B1 40	1257,45 \pm 8,42
B2 20	2583,47 \pm 4,39
B2 30	2491,55 \pm 5,25
B2 40	2575,72 \pm 6,26

*Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja \pm standardna devijacija ; ekstrakt 1 - vodena otopina etanola (30 %, v/v), ekstrakt 2 - vodena otopina etanola (70 %, v/v); vrijeme trajanja ekstrakcije u minutama: 20, 30 i 40.

Antioksidacijska aktivnost u ekstraktima plodova pasjeg trna određena je u rasponu od 1001,66-2755,95 $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s. tv.}$ Najviša antioksidacijska aktivnost određena je u uzorku sorte „Leikora“ ekstrahiranim sa 70 %-tnim etanolom kao ekstrakcijskim otapalom i u trajanju UAE od 20 min, a najniža u uzorku iste sorte ekstrahiranim s 30 %-tnim etanolom i trajanju UAE od 40 min. Općenito možemo reći da je antioksidacijska aktivnost veća kada se kao ekstrakcijsko otapalo koristio 70 %-tni etanol te UAE u trajanju od 20 min (tablica 14).

U istraživanju Ficzek i sur. (2019) antioksidacijska aktivnost sorte „Ascola“ također je bila niža u odnosu na sortu „Leikora“ što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja, a zaključili su da antioksidacijska aktivnost osim o genotipu ovisi i o agro-klimatskim uvjetima uzgoja ploda.

Prema Criste i sur. (2020) antioksidativna svojstva bioaktivnih molekula variraju ovisno o sortimentu, vremenu berbe, uvjetima skladištenja itd.

Statistička analiza pokazala je da su sortiment, ekstrakcijsko otapalo i vrijeme ekstrakcije značajno utjecali na antioksidacijsku aktivnost (tablica 15).

Tablica 15. Rezultati statističke analize utjecaja parametara UAE na antioksidacijsku aktivnost uzoraka ploda pasjeg trna

PARAMETAR EKSTRAKCIJE	ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST ($\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ s. tv.}$)
SORTA	$p \leq 0,05$
<i>Leikora</i>	1963,45 \pm 1,5 ^b
<i>Ascola</i>	1916,68 \pm 1,5 ^a
OTAPALO	$p \leq 0,05$
30 % EtOH	1250,04 \pm 1,5 ^a
70 % EtOH	2630,09 \pm 1,5 ^b
VRIJEME (min)	$p \leq 0,05$
20 min	1988,63 \pm 1,83 ^c
30 min	1955,91 \pm 1,83 ^b
40 min	1875,65 \pm 1,83 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška.

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

Kod sorte „*Leikora*“ određena je veća vrijednost antioksidacijske aktivnosti iako je određen niži udio fenolnih spojeva i vitamina C u odnosu na sortu „*Ascola*“ (tablica 6) što sugerira kako antioksidacijska aktivnost nije u korelaciji sa sadržajem polifenola te da na antioksidacijsku aktivnost osim fenolnih spojeva utječu i ostale bioaktivne molekule prisutne u biljci kao što su primjerice karotenoidi (Sulaiman i sur., 2011; Rentsendavaa i sur., 2018). I druga istraživanja utvrdila su da na antioksidacijsku aktivnost značajno utječu genotip, klimatski uvjeti uzgoja, vrijeme berbe, uvjeti skladištenja. Izbor metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti može

utjecati na rezultate te istraživanja pokazuju da je veća antioksidacijska aktivnost ekstrakata listova pasjeg trna nego plodova (Bittová i sur., 2014).

5. ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata dobivenih provedenim istraživanjem može se zaključiti:

1. U analiziranim ekstraktima flavonoli su najzastupljeniji fenolni spojevi, a najveći udio određen je u sorti „*Ascola*“ (154,10 mg 100 g⁻¹ s. tv.) nakon UAE u trajanju od 20 min te uz 70 %-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo. Izoramnetin-3-heksozid (69,73 mg 100 g⁻¹ s. tv) je dominantan flavonol.
2. Najviši udio ukupnih pigmenata određen je u uzorku sorte „*Leikora*“ (73,61 mg 100 g⁻¹ s. tv.) nakon UAE od 30 min uz aceton kao ekstrakcijsko otapalo, a lutein palmitat najzastupljeniji je pigment (21,85 mg 100 g⁻¹ s. tv.).
3. Najviši udio askorbinske kiseline određen je u uzorku sorte „*Ascola*“ (289,91 mg 100 g⁻¹ s.tv.) nakon UAE od 30 min i s 30 %-tnim etanolom kao ekstrakcijskim otapalom.
4. Visoka antioksidacijska aktivnosti utvrđena je u svim analiziranim uzorcima, a najviša antioksidacijska aktivnost određena je u uzorku sorte „*Leikora*“ (2755,95 μmol TE 100 g⁻¹ s. tv.) nakon UAE u trajanju od 20 min te uz 70 %-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo.
5. Bolja učinkovitost UAE hidrofilnih bioaktivnih molekula plodova pasjeg trna postignuta je primjenom 70 %-tnog etanola i vremenu trajanja ekstrakcije od 20 min, a za lipofilne bioaktivne molekule primjenom acetona kao ekstrakcijskog otapala i vremenu trajanja ekstrakcije od 30 min.

6. LITERATURA

Andersson SC, Olsson ME, Hohansson E, Rumpunen K (2009) Carotenoids in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries during Ripening and Use of Pheophytin a as a Maturity Marker. *J Agr Food Chem* **57**, 250-258. <https://doi.org/10.1021/jf802599f>

Becker MM., Nunes GS, Ribeiro DB (2019) Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. *J Braz Chem Soc* **30**, 1108-1114. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190003>

Bekker NP, Glushenkova AI (2001) Components of Certain Species of the Elaeagnaceae Family. *Chem Nat Compd* **37**, 97–116. <https://doi.org/10.1023/A:1012395332284>

Carocho M, Barros L, Bento A, Santos-Buelga C, Morales P, Ferreira IC (2014) Castanea sativa Mill. Flowers amongst the Most Powerful Antioxidant Matrices: A Phytochemical Approach in Decoctions and Infusions. *Biomed Res Int* **2014**, 232956.

Carr A, Maggini, S (2017) Vitamin C and Immune Function. *Nutrients* **9**, 1211. <https://doi.org/10.3390/nu9111211>

Castro-Puyana M, Perez-Sanchez A, Valdes A, Ibrahim OHM., Suarez-Alvarez S, Ferragut JA, Micol V, Cifuentes A, Ibanez E, Garcia-Canas V (2017) Pressurized liquid extraction of Neochloris oleoabundans for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells. *Food Res Int* **99**, 1048-1055.

Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem* **34**, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

Ciesarová Z, Murkovic M, Cejpek K, Kreps F, Tobolková B, Koplík R, Belajová E, Kukurová K, Daško L, Panovská Z, Revenco D, Burčová Z (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>

Criste A, Urcan AC, Bunea A, Pripon Furtuna ER, Kinga ON, Madden RH, Corcionivoschi N (2020) Phytochemical Composition and Biological Activity of Berries and Leaves from Four Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Varieties. *Molecules* **25**, 1170 <https://doi.org/10.3390/molecules25051170>

Čulina P, Cvitković D, Pfeifer D, Zorić Z, Repajić M, Elez Garofulić I, Balbino S, Pedisić S (2021). Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Selected Medicinal and Aromatic Plants: Diversity upon Plant Species and Extraction Technique. *Processes* **9**, 2207. <https://doi.org/10.3390/pr9122207>

Donno D, Mellano MG, Gamba G, Riondato I, Beccaro GL (2020) Analytical Strategies for Fingerprinting of Antioxidants, Nutritional Substances, and Bioactive Compounds in Foodstuffs Based on High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: An Overview. *Foods* **9**, 1734. <https://doi.org/10.3390/foods9121734>

de la Rosa LA, Moreno-Escamilla JO, Rodrigo-García J, Alvarez-Parrilla E (2019) Phenolic Compounds. U: Yahia EM (ured.) Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables, Woodhead Publishing, str. 253–271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>

Dobiáš P, Pavlíková P, Adam M, Eisner A, Beňová B, Ventura K (2010) Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity. *Open Chem* **8**, 87–95. <https://doi.org/10.2478/s11532-009-0125-9>

Donno D, Mellano MG, Gamba G, Riondato I, Beccaro GL (2020) Analytical Strategies for Fingerprinting of Antioxidants, Nutritional Substances, and Bioactive Compounds in Foodstuffs Based on High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry: An Overview. *Foods* **9**, 1734. <https://doi.org/10.3390/foods9121734>

Dragović-Uzelac V, Elez Garofulić I, Jukić M, Penić M, Dent M (2012) Microwave- Assisted Extraction of Sage Polyphenols. *Food Technol. Biotechnol.* **50**, 377–383.

Drmić H, Režek Jambrak A (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat J Food Sci Technol* **2**, 22-33.

Ficzek G, Mátravölgyi G, Furulyás D, Rentsendavaa C, Jócsák I, Papp D i sur. (2019) Analysis of bioactive compounds of three sea buckthorn cultivars (*Hippophaë rhamnoides* L. ‘Askola’, ‘Leikora’, and ‘Orangeveja’) with HPLC and spectrophotometric methods. *Eur J Hortic Sci* **84**, 31–38.

Garofulić IE, Zorić Z, Pedisić S, Brnčić M, Dragović-Uzelac V (2018) UPLC-MS2 Profiling of Blackthorn Flower Polyphenols Isolated by Ultrasound-Assisted Extraction. *J Food Sci* **83**, 2782-2789.

Gil-Chávez GJ, Villa JA, Ayala-Zavala JF, Basilio Heredia J, Sepulveda D, Yahia EM, González-Aguilar GA (2013) Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **12**, 5-23.

Harris DC (2010) Quantitative Chemical Analysis, 8.izd., W.H. Freeman and Company, New York, SAD, str. 519, 525, 595-615.

Horvat G (2017) Pašji trn (*Hippophaë rhamnoides* L., *Elaeagnaceae*) u Podravini, Podravski zbornik **43**, 207-209.

Hossain MB, Rai DK, Brunton NP, Martin-Diana AB, Barry-Ryan C (2010) Characterization of Phenolic Composition in *Lamiaceae* Spices by LC-ESI-MS/MS. *J Agr Food Chem* **58**, 10576-10581. <https://doi.org/10.1021/jf102042g>

Jaśniewska A, Diowksz A (2021) Wide Spectrum of Active Compounds in Sea Buckthorn

(*Hippophae rhamnoides*) for Disease Prevention and Food Production. *Antioxidants* **10**, 1279. <https://doi.org/10.3390/antiox10081279>

Ji M, Gong X, Li X, Wang C, Li M (2020) Advanced Research on the Antioxidant Activity and Mechanism of Polyphenols from *Hippophae* Species—A Review. *Molecules* **25**, 917. <https://doi.org/10.3390/molecules25040917>

Kothari V., Gupta A., Naraniwal M. (2012) Comparative study of various methods for extraction of antioxidant and antibacterial compounds from plant seeds. *J Nat Rem* **12**, 162. – 173.

Kumar K, Srivastav S, Sharanagat VS (2021) Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrason Sonochem* **70**, 105325.

Loizzo MR, Malfa GA, Acquaviva R, Tundis R, Bonesi M (2021) Chapter 6 - Carotenoids as Tools in Breast Cancer Therapy . U: Goutam Brahmachari (ured.) Natural Product Drug Discovery. Discovery and Development of Anti-Breast Cancer Agents from Natural Products. Elsevier.

Lopes AP, Galuch MB, Petenuci ME, Oliveira JH, Canesin EA, Schneider VVA, Visentainer JV (2020) Quantification of phenolic compounds in ripe and unripe bitter melons (*Momordica charantia*) and evaluation of the distribution of phenolic compounds in different parts of the fruit by UPLC–MS/MS. *Chem Pap* **74**, 2613–2625. <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01094-5>

Lõugas T (2006). Study on physico-chemical properties and some bioactive compounds of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). TUT Press, Tallin, str. 14.

Lucci P, Saurina J, Núñez O (2017) Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *Trends Anal Chem* **88**, 1-24.

Ma X, Yang W, Laaksonen O, Nylander M, Kallio H, Yang B (2017) Role of Flavonols and

Proanthocyanidins in the Sensory Quality of Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) Berries. *J Agr Food Chem* **65**, 9871-9879. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04156>

Madawala SRP, Brunius C, Adholeya A, Tripathi SB, Hanhineva K, Hajazimi E i sur. (2018) Impact of location on composition of selected phytochemicals in wild sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). *J Food Compos Anal* **72**, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.06.011>

Maldini M, Chessa M, Petretto GL, Montoro P, Rourke JP, Foddai M, Nicoletti M, Pintore G (2016) Profiling and Simultaneous Quantitative Determination of Anthocyanins in Wild *Myrtus communis* L. Berries from Different Geographical Areas in Sardinia and their Comparative Evaluation. *Phytochem Anal* **27**, 249-256. <https://doi.org/10.1002/pca.2623>

March RE, Miao XS (2004) A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *Int J Mass Spectrom* **231**, 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2003.10.008>

Marcillo-Parra V, Anaguano M, Molina M, Tupuna-Yerovi DS, Ruales, J (2021) Characterization and quantification of bioactive compounds and antioxidant activity in three different varieties of mango (*Mangifera indica* L.) peel from the Ecuadorian region using HPLC-UV/VIS and UPLC-PDA. *NFS Journal* **23**, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2021.02.001>

Montoro P, Tuberoso CI, Perrone A, Piacente S, Cabras P, Pizza C (2006) Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J Chromatogr A* **1112**, 232-240.

Moracelli AV, Andrade WS, Frankenberg CLC., Rech R, Marcílio NR (2021) Extraction of Chlorophylls and Carotenoids from Microalgae: COSMO-SAC-Assisted Solvent Screening. *Chem Eng Technol* **44**, 1227-1232 <https://doi.org/10.1002/ceat.202100008>

Mozetič B, Trebše P (2004) Identification of sweet cherry anthocyanins and hydroxycinnamic

acids using HPLC coupled with DAD and MS detector. *Acta Chim Slov* **51**, 151–158.

Perera CO, Alzahrani MAJ (2021) Ultrasound as a pre-treatment for extraction of bioactive compounds and food safety: A review. *LWT* **142**, 111114. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111114>

Picot-Allain C, Mahomoodally MF, Ak G, Zengin, G (2021) Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective. *Current Opinion in Food Science* **40**, 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>

Pinheiro PF, Justino GC (2012) Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds-A Review of Spectroscopic Applications. U: Rao V (ured.) *Phytochemicals-A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, InTech, Rijeka, str. 33-56.

Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G (2016) Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. *Med Cell Longev* **2016**, 1–36. <https://doi.org/10.1155/2016/9130976>

Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI (2021) Oxidative stress mitigation by antioxidants - an overview on their chemistry and influences on health status, *Eur J Med Chem.* **209**, 112891 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>

Pop RM, Socaciu C, Pinteana A, Buzoianu AD, Sanders MG, Gruppen H, Vincken JP (2013) UHPLC/PDA–ESI/MS Analysis of the Main Berry and Leaf Flavonol Glycosides from Different Carpathian *Hippophae rhamnoides* L. Varieties. *Phytochem Anal* **24**, 484-492.

Pop RM, Weesepeel Y, Socaciu C, Pinteana A, Vincken JP, Gruppen H (2014) Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chem* **147**, 1-9.

Prior, RL (2015) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Func Foods* **18**, 797– 810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>

Quek A, Mohd Zaini H, Kassim NK, Sulaiman F, Rukayadi Y, Ismail A, Zainal Abidin Z, Awang K (2021) Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) and antibacterial properties of *Melicope glabra* bark extracts and isolated compounds. *Plos One* **16**, 251534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251534>

Rentsendavaa C, Szána M, Ficzek G, Szalóki-Dorkó L, Stéger-Máté M, Furulyás D (2018) Investigation of nutritional parameters in different parts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries. *Journal on Processing and Energy in Agriculture* **22**, 10–13. doi: 10.5937/JPEA1801010R

Roidaki A, Zoumpoulakis PG, Proestos C (2015) Comparison of extraction methods for the determination of antioxidant activity in extracts of *Hippophae rhamnoides* L. and *Lippia citriodora*. The effect of seasonal collection. *Austin J Nutr Food Sci* **3**, 1057.

Roman D, Constantin OE, Stănciuc N, Râpeanu G (2020) Bioactive compounds and antioxidant activity in different extracts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L) berries. *Food Tech* **44**, 178-192. <https://doi.org/10.35219/foodtechnology.2020.1.11>

Saha S, Singh AK, Keshari AK, Raj V, Rai A, Maity S (2018) Modern Extraction Techniques for Drugs and Medicinal Agents. U: Grumezescu AM i Holban AM (ured.) *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food*, Academic Press, str. 65–106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811521-3.00002-8>

Saini RK, Keum YS (2018) Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem* **240**, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>

Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L (2011) Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med* **8**, 1-10. DOI: [10.4314/ajtcam.v8i1.60483](https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i1.60483)

Sharma Y, Velamuri R, Fagan J, Schaefer J, Streicher C, Stimson J (2020) Identification and

Characterization of Polyphenols and Volatile Terpenoid Compounds in Different Extracts of Garden Sage (*Salvia officinalis* L.). *Pharmacogn Res* **12**, 149-157. DOI: [10.4103/pr.pr_92_19](https://doi.org/10.4103/pr.pr_92_19)

Siddhuraju P, Abirami A, Nagarani G, Sangeethapriya M (2014) Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of Aqueous Acetone and Ethanol Extract of Edible Parts of *Moringa oleifera* and *Sesbania grandiflora*. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* **8**, 1090-1098.

Stahl W, Sies H (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med* **24**, 345–351. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)

Swartz M (2010) HPLC detectors: a brief review. *J Liq Chromatogr R T* **33**, 1130–1150. <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>

Sytařová, I, Orsavová J, Snopek L, Mlček J, Byczyński L, Mišurcová L (2019) Impact of phenolic compounds and vitamins C and E on antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries and leaves of diverse ripening times. *Food Chem* **310**, 125784. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125784>

Teleszko M, Wojdyło A, Rudzinska M, Oszmianski J, Golis T (2015) Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Bioactive Compounds Content in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries. *J Agr Food Chem* **63**, 4120–4129. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00564>

Tkacz K, Wojdyło A, Turkiewicz IP, Bobak Ł, Nowicka P (2019) Anti-Oxidant and Anti-Enzymatic Activities of Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) Fruits Modulated by Chemical Components. *Antioxidants* **8**, 618. <https://doi.org/10.3390/antiox8120618>

Tkacz K, Wojdyło A, Turkiewicz IP, Nowicka P (2021) Triterpenoids, phenolic compounds, macro- and microelements in anatomical parts of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries, branches and leaves. *J Food Compos Anal* **103**, 104107. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104107>

Vuolo MM, Lima VS, Maróstica Junior MR (2019) Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. U: Segura Campos MR (ured) Bioactive Compounds, Woodhead Publishing, str.33–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>

Wang K, Xu Z, Liao X (2021) Bioactive compounds, health benefits and functional food products of sea buckthorn: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1905605>

Wani TA, Wani SM, Ahmad M, Ahmad M, Gani A, Masoodi FA (2016) Bioactive profile, health benefits and safety evaluation of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A review. *Cogent Food Agric* **2**, 1128519. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1128519>

Yang B, Halttunen T, Raimo O, Price K, Kallio H (2009) Flavonol glycosides in wild and cultivated berries of three major subspecies of *Hippophaë rhamnoides* and changes during harvesting period. *Food Chem* **115**, 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.073>

Zadernowski R, Naczka M, Czaplicki S, Rubinskiene M, Szalkiewicz M (2005) Composition of Phenolic Acids in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries. *J Am Oil Chem Soc* **82**, 175-179.


Zielińska A, Nowak I (2017) Abundance of active ingredients in sea-buckthorn oil. *Lipids Health Dis* **16**, 95. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0469-7>

Zhao L, Zhao G, Chen F, Wang Z, Wu J, Hu X (2006) Different Effects of Microwave and Ultrasound on the Stability of (*all-E*)-Astaxanthin. *J Agr Food Chem* **54**, 8346–8351. <https://doi.org/10.1021/jf061876d>

Zhou P, Wang X, Liu P, Huang J, Wang C, Pan M, Kuang Z (2018) Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction. *Ind Crop Prod* **120**, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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



Vlastoručni potpis