

Izolacija bioaktivnih spojeva pogače pasjeg trna primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Jukić, Petra

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:159:699242>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

Petra Jukić

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH
SPOJEVA POGAČE PASJEG
TRNA PRIMJENOM
EKSTRAKCIJE POTPOMOŽNUTE
ULTRAZVUKOM**

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 Patricije Čuline, mag. ing. techn. aliment.



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



ZAHVALA

Od srca zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Sandri Pedisić na pomoći, savjetima i uloženom vremenu. Veliko hvala i mag. ing. techn. aliment. Patriciji Čulini na pomoći u izvođenju eksperimentalnog dijela diplomskog rada i tijekom obrade rezultata.

Zahvaljujem i svojim prijateljicama uz koje su studentski dani bili lakši i bolji.

Najveća hvala mojim roditeljima, bratu, sestri i baki na podršci, ohrabrivanju i strpljenju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod 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: Prehrambeno inženjerstvo

IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA POGAČE PASJEG TRNA PRIMJENOM EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM

Petra Jukić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058211410

Sažetak: Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj parametara ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE): temperatura (35, 50 i 65 °C), snaga ultrazvuka (30, 60 i 90 %) i vrijeme ekstrakcije (10, 20 i 30 minuta) na udio fenolnih spojeva pogače pasjeg trna i antioksidacijski kapacitet (AK) dobivenih ekstrakata. Ukupni fenoli u ekstraktima određeni su spektrofotometrijskom, a AK ORAC metodom. Maseni udio ukupnih fenola u ekstraktima određen je u rasponu 983,56-1998,98 mg GAE/100 g s.tv., a AK u rasponu 6000,12-9485,00 μmol TE/100 g s.tv. Ekstrakcijski parametri imaju statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola i AK. Optimalni uvjeti ekstrakcije bili su 50 °C/60%/20 min. UPLC-MS/MS metodom u ekstraktu pogače pasjeg trna dobivenom pri optimalnim uvjetima određeni su flavonoli, hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline, flavoni i vitamin C, a najzastupljeniji spojevi bili su flavonoli izoramnetin-3-rutinozid, izoramnetin-3-heksozid i rutin.

Glavne riječi: *pasji trn, pogača, ultrazvučna ekstrakcija, fenoli, antioksidacijski kapacitet*

Rad sadrži: 52 stranice, 5 slika, 12 tablica, 71 literaturni navod

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. Ivona Elez Garofulić (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Sandra Pedisić (mentor)
3. doc. dr. sc. Zoran Zorić (član)
4. prof. dr. sc. Sandra Balbino (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 Engineering

ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM SEA BUCKTHORN POMACE USING ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION

Petra Jukić, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058211410

Abstract: The aim of this study was to determine the influence of the parameters of ultrasound-assisted extraction (UAE): temperature (35, 50 and 65 °C), ultrasonic power (30, 60 and 90 %) and extraction time (10, 20 and 30 min) on the phenolic content of sea buckthorn pomace and antioxidant capacity (AC) of the obtained extracts. The content of total phenols was determined spectrophotometrically and AC by the ORAC method. The mass fraction of total phenols in the extracts was determined in the range 983.56-1998.98 mg GAE/100 g dm and AC in the range of 6000.12-9485.00 µmol TE/100 g dm. The extraction parameters have a statistically significant effect on the content of total phenols and AC. The optimal extraction conditions were 50°C/60%/20 min. Flavonols, hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, flavones and vitamin C were determined by the UPLC-MS/MS method in extract under optimal conditions and with the flavonols isorhamnetin-3-rutinoside, isorhamnetin-3-hexoside and rutin dominating.

Keywords: *sea buckthorn, pomace, ultrasound assisted extraction, phenols, antioxidant capacity*

Thesis contains: 52 pages, 5 figures, 12 tables, 71 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Sandra Pedisić, PhD, Assistant professor

Technical support and assistance: Patricija Čulina, PhD Research Assistant

Reviewers:

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

Thesis defended: July 15th, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. PASJI TRN	2
2.1.1. Osnovne karakteristike pasjeg trna	2
2.1.2. Kemijski sastav ploda pasjeg trna	3
2.1.3. Bioaktivni spojevi	4
2.1.3.1. Fenolni spojevi	4
2.1.4. Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva	6
2.1.5. Ulje ploda i pogača kao nusproizvod iz proizvodnje ulja ploda pasjeg trna.....	7
2.1.6. Utjecaj na zdravlje	8
2.2. METODE EKSTRAKCIJE	9
2.2.1. Konvencionalne metode ekstrakcije	10
2.2.2. Napredne metode ekstrakcije	10
2.2.2.1. Ekstrakcija pomoću superkritičnog CO ₂	11
2.2.2.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	11
2.3. METODE ODREĐIVANJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA	12
2.3.1. Spektrofotometrijske metode	12
2.3.2. Kromatografske metode	13
2.3.2.1. Tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti (UPLC)	13
2.3.3. Masena spektrometrija	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI.....	16
3.1.1. Uzorak	16
3.1.2. Kemikalije	16
3.1.3. Aparatura i pribor.....	18
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva pogače pasjeg trna potpomognuta ultrazvukom .	19
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola.....	20
3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom	22
3.2.4. Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva i vitamina C primjenom UPLC- MS/MS metode	23

3.2.5. Obrada rezultata	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. UTJECAJ UAE NA UDIO UKUPNIH FENOLA U POGAČI PASJEG TRNA	30
4.2. UTJECAJ UAE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET POGAČE PASJEG TRNA.....	34
4.3. OPTIMALNI UVJETI EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM POGAČE PASJEG TRNA	36
4.3.1. UPLC-MS/MS određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva i vitamina C u ekstraktu pogače pasjeg trna dobivenom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije	38
5. ZAKLJUČCI.....	43
6. LITERATURA.....	44

1. UVOD

Pasji trn je voće čija upotreba datira još u 4.st. pr. Kr. Korišten je u kineskoj i tibetanskoj medicini zbog povoljnog kemijskog sastava. Plodovi pasjeg trna bogati su polifenolima, vitaminima, mineralnim tvarima, pigmentima, esencijalnim aminokiselinama, masnim kiselinama. Upravo zbog svog sastava imaju antioksidacijska, antitumorska, antimikrobna i protuupalna svojstva.

Ulje pasjeg trna može se proizvesti iz sjemenki ili iz ploda pasjeg trna. Ulje ploda pasjeg trna sadrži oko 52 % nezasićenih masnih kiselina, bogato je karotenoidima i tokoferolima, a odlikuje ga i tamnija boja u odnosu na ulje sjemenki. Osim upotrebe klasičnih metoda ekstrakcije kao što je Soxhlet ekstrakcija sve više se u zadnje vrijeme koriste i napredne tehnike za proizvodnju ulja ploda pasjeg trna kao što je ekstrakcija pomoću superkritičnog CO₂. U proizvodnji ulja zaostaje kruti ostatak kojeg nazivamo pogača, a koja je također bogata brojnim bioaktivnim spojevima poput polifenola, vitamina, nezasićenih masnih kiselina pa su današnja istraživanja usmjerena na ekstrakciju, identifikaciju i kvantifikaciju bioaktivnih spojeva u cilju definiranja sastava pogače i moguće primjene u prehrambenoj industriji.

Za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz pogače pasjeg trna često se koristi napredna metoda ekstrakcije tj. ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom. Glavne prednosti ove metode su veći prinosi ekstrakcije, niža temperatura nego kod konvencionalnih metoda te smanjenje količine otapala i niža cijena u odnosu na primjerice ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima.

Cilj ovog rada je bio istražiti utjecaj ekstrakcije potpomognute ultrazvukom na udio fenolnih spojeva, vitamina C i antioksidacijski kapacitet pogače pasjeg trna, a kako bi se odredili optimalni uvjeti, ekstrakcija je provedena pri temperaturama 35, 50 i 65 °C, snazi ultrazvuka 30, 60 i 90 % i vremenu ekstrakcije 10, 20 i 30 minuta uz 70 %-tni etanol kao ekstrakcijsko otapalo. Udio ukupnih fenola određen je spektrofotometrijski, antioksidacijski kapacitet ORAC metodom, a identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva i vitamina C provedena je primjenom UPLC-MS/MS metode.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PASJI TRN

2.1.1. Osnovne karakteristike pasjeg trna

Pasji trn (*Hippophae rhamnoides* L.) je listopadna biljka koja je rasprostranjena u Europi i Aziji. Pripada obitelji zlolesina (*Elaeagnaceae*) i rodu *Hippophae* (tablica 1). Raste u obliku grma ili nižeg stabla, a može postići visinu do šest metara. Ima naizmjenične listove duljine 5-7 centimetara, dvodomne cvjetove, snažno razvijen korijen i crvenosmeđe grane. Cvjeta u razdoblju od ožujka do svibnja (Franjić i sur., 2016). Plod je narančastocrvena bobica (slika 1) duljine 7-8 mm koja je bogata vitaminom C (Nikolić i Topić, 2005). Naziv biljke potječe od grčke riječi *hippophaë* koja označava konjski sjaj jer su plodovi pasjeg trna korišteni kao dodatak hrani za životinje, a prisutni vitamin C pozitivno je utjecao na sjaj konjske dlake (Franjić i sur., 2016). Prvi zapisi o pasjem trnu i njegovim pozitivnim utjecajima na zdravlje potječu iz 4. st. pr. Kr. Plodovi pasjeg trna korišteni su u doba Aleksandra Velikog, a bili su i dio tibetanske i kineske medicine (Zakynthinos i Varzakas, 2015).

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

Taksonomska kategorija	Naziv
Carstvo	Plantae
Podcarstvo	Tracheobionta
Divizija	Magnoliophyta
Razred	Magnoliopsida
Podrazred	<i>Rosidae</i>
Red	<i>Rhamnales</i>
Obitelj	<i>Elaeagnaceae</i>
Rod	<i>Hippophae</i>
Vrsta	<i>Hippophae rhamnoides</i>

Osim na području Europe i Azije, pasji trn raste i u Kanadi. Najčešće se uzgaja na nadmorskim visinama od 1200 do 2000 m, ali taj raspon može biti i od 2500 do 4300 m nadmorske visine (Yogendra Kumar i sur., 2013). U Hrvatskoj raste na području Podravine i Međimurja, uz rijeke Dravu i Muru, na pjeskovitom i šljunkovitom tlu. Specifičnost ove biljke je otpornost na veliki temperaturni raspon od (-) 43 °C do (+) 40 °C. Također, može rasti na izrazito slanom tlu, a podnosi i duža sušna razdoblja iako je optimalna godišnja količina padalina za rast 400-700 mm (Dong i sur., 2021).



Slika 1. Plodovi pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L.) (Jaśniewska i Diowks, 2021)

2.1.2. Kemijski sastav ploda pasjeg trna

Kemijski sastav ploda pasjeg trna ovisi o veličini i zrelosti ploda, području uzgoja, klimatskim uvjetima, ali i o primijenjenoj metodi ekstrakcije (Suryakumar i Gupta, 2011). Plodovi pasjeg trna sadrže 360-2500 mg/100 g askorbinske kiseline (vitamina C) što je značajno više nego u drugom voću. Tako primjerice naranče sadrže 50 mg/100 g vitamina C dok je taj udio u jagodama oko 64 mg/100 g. Ostale organske kiseline prisutne u pasjem trnu su jabučna, limunska, kininska, a moguća je prisutnost i vinske te oksalne kiseline (Dong i sur., 2021). Udio kiselina ovisi o porijeklu i sorti, a upravo kiseline doprinose karakterističnom kiselom i trpkom okusu ploda. Dominantni šećeri u plodu su glukoza, fruktoza i ksiloza, a plodovi sadrže i šećerne alkohole poput manitola, ksilitola i sorbitola (Dong i sur., 2021; Ciesarová i sur., 2020). Plodovi su bogati i karotenoidima tj. biljnim pigmentima odgovornim za žutu, narančastu ili crvenu boju ploda. Udio karotenoida varira od 15 do 185 mg/100 g što je više nego u borovnicama ili jagodama (Dong i sur., 2021).

Dominantni karotenoidi su zeaksantin, β -kriptoksantin i β -karoten, a prisutni su i lutein, likopen i γ -karoten. Plodovi sadrže i esencijalne aminokiseline (lizin, fenilalanin, leucin, metionin, treonin, izoleucin, valin) važne za izgradnju stanica ili moždane funkcije. U plodovima su prisutne i masne kiseline pri čemu je udio nezasićenih masnih kiselina (86,3 %) značajno viši nego zasićenih (13,7 %). Prisutne su palmitinska, oleinska (omega-9), palmitoleinska, linolna (omega-6) i linolenska (omega-3) masna kiselina (Suryakumar i Gupta, 2011). Važno je spomenuti i sadržaj vitamina E (160 mg/100 g), B₁, B₂ i K. Od mineralnih tvari prisutni su fosfor, željezo, magnezij, kalcij, dušik, mangan pri čemu je najviši udio kalija. Pasji trn sadrži i fitosterole tj. biljne sterole koje odlikuje slična struktura kao kolesterol. Fitosteroli doprinose snižavanju kolesterola u plazmi čime sudjeluju u prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Udio fitosterola u ulju pasjeg trna najčešće iznosi 1,3-2 % pri čemu je dominantan fitosterol β -sitosterol (Bal i sur., 2011).

2.1.3. Bioaktivni spojevi

Bioaktivni spojevi prisutni u pasjem trnu su: fenolni spojevi, esencijalne masne kiseline, karotenoidi, tokoferoli, fitosteroli, vitamin C koji mogu imati povoljan utjecaj na zdravlje (Teleszko i sur., 2015).

2.1.3.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti (Ignat i sur., 2011). Građeni su od aromatskog prstena na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, a do danas je identificirano preko 8000 fenolnih spojeva. D'Archivio i sur. (2007) navode kako se fenolni spojevi dijele na flavonoide, fenolne kiseline, stilbene, lignane i tanine kako je prikazano na slici 2. Flavonoide možemo podijeliti na flavonole, flavanole (flavan-3-ole), flavone, izoflavone, antocijane i flavanone. Imaju 15 ugljikovih atoma i konfiguraciju C6-C3-C6. Građeni su od dva aromatska prstena A i B povezana preko prstena C koji sadrži kisik, a pomažu biljci u zaštiti od UV zračenja, biljojeda, parazita i nametnika (Ignat i sur., 2011). Fenolne kiseline možemo podijeliti u dvije skupine: hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline. Hidroksicimetne kiseline imaju osnovnu strukturu C6-C3. Neke od najzastupljenijih hidroksicimetnih kiselina u voću su *p*-kumarinska, sinapinska, kafeinska i ferulična kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline odlikuje C6-C1 osnovna struktura, a nastaju redukcijom benzojeve kiseline. Važno je spomenuti galnu, protokatehinsku, vanilinsku, *p*-hidroksibenzojevu i siringinsku kiselinu (Ignat i sur., 2011). Glavni predstavnik stilbena je

resveratrol prisutan u grožđu i crnom vinu (D'Archivio i sur., 2007). Lignani mogu biti prisutni u slobodnom obliku ili vezani sa šećerima, a tanine dijelimo na hidrolizirajuće i kondenzirane.

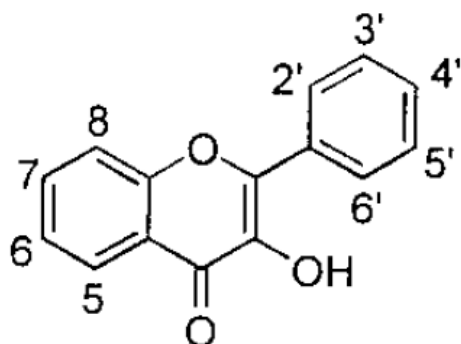
Fenolni spojevi				
Flavonoidi	Fenolne kiseline	Stilbeni	Lignani	Tanini
Flavonoli	Hidroksicimetne kiseline			Hidrolizirajući
Flavanoli	Hidroksibenzojeve kiseline			Kondenzirani
Flavoni				
Izoflavoni				
Antocijani				
Flavanoni				

Slika 2. Podjela fenolnih spojeva (prema Erdman i sur., 2007)

Plodovi, lišće, stabljike, grane i korijenje pasjeg trna bogati su fenolnim spojevima (Ciesarová i sur., 2020). Njihov udio varira ovisno o analiziranom dijelu biljke. Tako je prema istraživanju Khan i sur. (2010) udio flavonoida u plodu pasjeg trna 854 mg/100 g, a u suhom lišću 3888 mg/100 g. Najzastupljeniji fenolni spojevi u plodovima pasjeg trna su flavonoli čije je kemijska struktura prikazana na slici 3. Prisutni su u glikozidnim oblicima kvercetina, kamferola i izoramnetina. Od flavonol glikozida valja izdvojiti prisutnost izoramnetin-3-*O*-rutinozida, izoramnetin-3-*O*-glukozida, kvercetin-3-*O*-glukozida, izoramnetin-3-glukozid-7-ramnozida, kamferol-3-soforozid-7-*O*-ramnozida, izoramnetin-3-*O*-soforozid-7-*O*-ramnozida i rutina (Ciesarová i sur., 2020). U plodovima su zastupljene i fenolne kiseline. Iz skupine hidroksibenzojevih kiselina dominantna je galna kiselina, a od hidroksicimetnih kiselina su prisutne ferulična, *p*-kumarinska i kafeinska kiselina. Sjemenke, korijenje i zelene bobice bogate su i taninima.

Prema istraživanju Čulina i sur. (2021) dominantni fenolni spojevi u plodu pasjeg trna su upravo flavonoli čiji je udio $163,24 \pm 4,37$ mg/100 g s.tv određen primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Dokazana je i prisutnost flavona ($3,47 \pm 0,04$ mg/100 g s.tv.), flavanola ($20,64 \pm 0,26$ mg/100 g s.tv.), hidroksibenzojevih ($145,95 \pm 2,33$ mg/100 g s.tv.) i hidroksicimetnih kiselina ($24,11 \pm 0,95$ mg/100 g s.tv.). Slični rezultati su zabilježeni i u

istraživanju Tkacz i sur. (2021) gdje su u plodovima pasjeg trna također dominantni flavonoli odnosno derivati izoramnetina. U najvišim koncentracijama u pokožici ploda pasjeg trna prisutni su izoramnetin-3-*O*-glukozid, izoramnetin-3-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-glukozid i izoramnetin-3-*O*-glukozid-7-*O*-ramnozid. Istraživanjem Tkacz i sur. (2021) je zaključeno kako najviši udio ukupnih flavonola, uspoređujući plodove, lišće, sjemenke i grane, imaju listovi pasjeg trna pri čemu su srednje vrijednosti udjela flavonola između 41,34 i 921,74 mg/100 g s.tv. ovisno o analiziranom dijelu biljke.



Slika 3. Kemijska struktura flavonola (Robards i sur., 1999)

2.1.4. Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva

Antioksidansi su tvari koje sprječavaju ili odgađaju oksidaciju supstrata podložnih oksidaciji. Pri tome su prisutni u niskoj koncentraciji u odnosu na supstrat. Glavni izvori antioksidanasa mogu biti enzimi poput superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze, zatim neki hormoni i niskomolekularni spojevi poput vitamina E, vitamina C i polifenola (Halliwell, 1990). Važnost antioksidanasa očituje se u njihovoj ulozi prevencije različitih bolesti poput tumora, dijabetesa tipa dva i hipertenzije (Pisoschi i Negulescu, 2011). Jedan od izvora antioksidanasa su i fenolni spojevi koji mogu neutralizirati reaktivnost slobodnih radikala doniranjem elektrona ili vodika. Polifenoli, vitamin C i vitamin E pripadaju skupini neenzimskih antioksidanasa koji prekidaju lančane reakcije slobodnih radikala (Nimse i Pal, 2015) koje možemo definirati kao atome, ione ili molekule s nesprenim elektronom ili elektronima zbog čega su izrazito nestabilni i reaktivni.

Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta možemo podijeliti na SET (engl. *Single Electron Transfer*) i HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*) metode. U SET metode ubrajamo

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), TEAC (engl. *Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity*), CUPRAC (engl. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*), DPPH (engl. *2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl*) metodu kao i metodu određivanja ukupnih fenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Navedene metode su spektrofotometrijske i temelje se na promjeni boje uslijed doniranja elektrona slobodnim radikalima od strane antioksidanasa. U HAT metode ubrajamo ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TRAP (engl. *Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Parameter*), TOSC (engl. *Total Oxyradical Scavenging Capacity*) metode koje mjere sposobnost antioksidansa da doniraju proton slobodnom radikalu (Apak i sur., 2013). ORAC metoda se temelji na stvaranju peroksilnih radikala zagrijavanjem *bis-azid* inicijatora tj. kemijskog spoja poput AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropionamid)-dihidroklorid) pri temperaturi od 37 °C. Nastali peroksilni radikali oksidiraju fluorescein i time dolazi do smanjenja fluorescencije koja se mjeri optički. Antioksidacijski kapacitet uzorka se izražava pomoću površine ispod krivulje ovisnosti relativnog intenziteta fluorescencije o vremenu. Konačni rezultati se najčešće izražavaju kao $\mu\text{mol TE/L}$ gdje TE označava trolox ekvivalent budući da je trolox spoj koji se koristi kao standard (Apak i sur., 2013).

Prema istraživanju Guo i sur. (2017) antioksidacijski kapacitet plodova pasjeg trna određen ORAC metodom iznosi 266-369 $\mu\text{mol TE/g}$ s.tv. ovisno o analiziranoj podvrsti (*Sinensis*, *Yunnanensis*, *Mongolica* ili *Turkestanica*). U istraživanju je dokazana i korelacija između antioksidacijskog kapaciteta i udjela ukupnih fenola odnosno flavonoida kao i antiproliferativno djelovanje protiv stanica HepG2 tumora čime su dokazana antitumorska svojstva pasjeg trna.

2.1.5. Ulje ploda i pogača kao nusproizvod iz proizvodnje ulja ploda pasjeg trna

Ulje pasjeg trna može se proizvesti iz sjemenki i iz ploda. Sjemenke pasjeg trna sadrže oko 8-20 % ulja dok pulpa sadrži 4-13 % ulja (Krejcarová i sur., 2015). Ulje ploda pasjeg trna ima oko 48 % zasićenih masnih kiselina od kojih je dominantna palmitinska masna kiselina i 52 % nezasićenih masnih kiselina. Od nezasićenih masnih kiselina prisutne su palmitoleinska, oleinska i linolna masna kiselina (Ciesarová i sur., 2020). Udio palmitoleinske masne kiseline može biti i do 43 % (Krejcarová i sur., 2015). Ulje sjemenki pasjeg trna bogatije je nezasićenim masnim kiselinama, a dominantne su α -linolenska i linolna masna kiselina. Bogato je i oleinskom masnom kiselinom te ga odlikuje omjer omega-3 i omega-6 masnih kiselina približno 1:1 (Bal i sur., 2011). Ulje ploda pasjeg trna sadrži visok udio karotenoida

(180–240 mg/100 g), α -tokoferola i sterola (Krejcarová i sur., 2015). Sadrži i viši udio organskih kiselina i ima tamniju boju u odnosu na ulje sjemenki. Iako postoje različitosti u koncentracijama pojedinih bioaktivnih spojeva, ulja pasjeg trna bogata su karotenoidima, tokoferolima, omega-3 i omega-6 masnim kiselinama (Bal i sur., 2011).

Pogača je kruti ostatak koji zaostaje nakon proizvodnje ulja. Upravo zbog povoljnog kemijskog sastava, današnji cilj prehrambene industrije je iskorištenje nusproizvoda proizvodnje ulja i dobivanje novih funkcionalnih ili proizvoda dodane vrijednosti. Pogača koja zaostaje nakon proizvodnje ulja pasjeg trna bogata je brojnim bioaktivnim spojevima i postaje sve zanimljivija znanstvenicima koji proučavaju njezin sastav i moguću primjenu u prehrambenoj industriji. Prema istraživanju Pavlović i sur. (2016) naglašeno je kako je odmašćena pogača pasjeg trna, koja zaostaje nakon proizvodnje ulja ekstrakcijom pomoću superkritičnog CO₂, bogata celulozom (11, 56 %), sadrži male količine zaostalog ulja (0,58 %), sadržaj vlage je 5,68 % dok je udio proteina 14,78 %. Slično navedenom, u istraživanju Zaporozhskaya i sur. (2021), udio proteina u pogači pasjeg trna je 8 % dok je udio lipida 16 % uz 52 % ugljikohidrata. Terechuk i sur. (2019) navode kako je pogača pasjeg trna bogat izvor mineralnih tvari, vitamina C i nezasićenih masnih kiselina poput palmitoleinske, oleinske i linolenske masne kiseline.

U istraživanju Ivanova i sur. (2019) pogača pasjeg trna korištena je u proizvodnji kruha i tjestenine. Upotrebom pogače u udjelu 3-5 % na masu brašna omogućeno je obogaćivanje tijesta proteinima i aminokiselinama poput glutaminske kiseline, asparaginske kiseline, arginina i lizina. Također, dodatak pogače doprinosi boljem volumenu kruha i poroznosti krušnih mrvica. Zbog istih razloga i visokog udjela prehrambenih vlakana, preporučuje se i primjena pogače pasjeg trna u proizvodnji raznih vrsta tjestenina koje bi bile pogodne za djecu i mlade. Razlog tome je pogodan sastav pasjeg trna, a time i pogače koji se očituje u prisustvu mikronutrijenata i makronutrijenata poput natrija, kalija, željeza i kalcija (Ivanova i sur., 2019).

2.1.6. Utjecaj na zdravlje

Pasji trn se već stoljećima koristi u kineskoj i ruskoj medicini zbog svog povoljnog kemijskog sastava. Zbog prisutnih flavonoida, pasji trn može značajno doprinijeti smanjenju rizika od razvoja kardiovaskularnih bolesti (Jaśniewska i Diowks, 2021). Tako je prema istraživanju provedenom u Kini skupina pacijenata konzumirala 10 mg ekstrakta flavonoida pasjeg trna tri puta dnevno u razdoblju od šest tjedana pri čemu je uočeno smanjenje razine

kolesterola u plazmi i poboljšanje kardiovaskularnih funkcija bez utjecaja na jetru ili bubrege (Zakynthinos i Varzakas, 2015). Također, zbog flavonoida može doći do smanjene mogućnosti agregacije trombocita inhibicijom aktivnosti enzima tirozin kinaze (Patel i sur., 2012). Pasji trn može imati i pozitivan utjecaj na pacijente oboljele od dijabetesa. Prema istraživanju kojeg su proveli Zhang i sur. (2010) primjenom vodenog ekstrakta sjemenki pasjeg trna na štakorima, uočeno je smanjenje razine glukoze i triglicerida te povećanje aktivnosti superoksid dismutaze i razine glutaciona. Time je dokazana mogućnost prevencije hiperlipidemije i oksidativnog stresa koji se javljaju kao komplikacije kod oboljelih od dijabetesa (Zhang i sur., 2010). Ulje pasjeg trna koristi se pri liječenju opekline zbog prisutnosti palmitinske kiseline, karotenoida, tokoferola, ali i omega-3 te omega-6 masnih kiselina (Rafalska i sur., 2017). Dodatno, zbog prisutnosti β -karotena i nezasićenih masnih kiselina štiti stanice jetre od hepatotoksina poput etanola i ugljikovog tetraklorida čime djeluje hepatoprotektivno (Krejcarová i sur., 2015). Može pomoći i pri oboljenjima poput dermatitisa i psorijaze, a koristi se i kao sastojak krema u kozmetičkoj industriji budući da zbog sadržaja karotenoida koji apsorbiraju UV-B zrake pri valnim duljinama 290-320 nm ne dolazi do opekline. Također, kreme koje sadrže ulje pasjeg trna mogu spriječiti pigmentaciju i suhoću kože (Rafalska i sur., 2017).

Antimikrobna svojstva pokazuju listovi, sjemenke i plodovi pasjeg trna. Tako je dokazano kako ekstrakti listova pasjeg trna mogu inhibirati bakterije poput *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Yersinia enterocolitica* dok je ulje pasjeg trna dobiveno prešanjem i ulje sjemenki učinkovit inhibitor rasta bakterije *Escherichia coli*. Također, pasji trn doprinosi zaštiti od virusa gripe i HIV infekcije. Kako pasji trn sadrži kvercetin, epigalokatehin i katehin pokazuje i antitumorska svojstva jer kvercetin može inducirati apoptozu stanica raka. Pozitivno djelovanje dokazano je kod pacijenata oboljelih od leukemije, raka debelog crijeva i raka prostate (Krejcarová i sur., 2015).

2.2. METODE EKSTRAKCIJE

Ekstrakcija je postupak izdvajanja određenih spojeva iz biljnih tkiva s obzirom na različitu topljivost spojeva u primijenjenim otapalima (Azwanida, 2015). Temelji se na postizanju molekulske difuzije tj. dolazi do izjednačavanja koncentracija otopljenih tvari u sustavima koji su u međusobnom dodiru, a idealan postupak ekstrakcije je nedestruktivan, kvantitativan i kratkog trajanja (Yang i sur., 2011; Lovrić, 2003). Metode ekstrakcije možemo podijeliti na konvencionalne i napredne metode. Izbor metode ovisi o više faktora od kojih su

značajni: priroda biljnog materijala, temperatura pri kojoj se provodi ekstrakcija, vrsta i pH otapala, omjer otapala i uzorka, trajanje ekstrakcije, primjena konačnih proizvoda. Važan je i odabir pravilnog otapala pa se za ekstrakciju polarnih spojeva koriste polarna otapala poput vode i etanola dok se za ekstrakciju nepolarnih spojeva mogu koristiti nepolarni heksan ili diklormetan (Abubakar i Haque, 2020).

2.2.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

Konvencionalne metode ekstrakcije možemo podijeliti na Soxhlet ekstrakciju, maceraciju i hidrodestilaciju (Azmir i sur., 2013). Soxhlet ekstrakcija prvotno je bila namijenjena ekstrakciji lipida, a danas se koristi i za ekstrakciju drugih spojeva. Metoda uključuje stavljanje suhog uzorka u čahuru i nakon toga u ekstraktor. Uslijed zagrijavanja, organsko otapalo stvara paru koja se prolazeći kroz hladilo kondenzira. Nastali kondenzat kapa preko uzorka, a postupak se provodi sve dok se ne ekstrahiraju željeni spojevi (Abubakar i Haque, 2020). Maceracija je postupak ekstrakcije spojeva iz aromatskog, ljekovitog bilja ili iz voća koji uključuje usitnjavanje uzorka zbog povećanja aktivne površine i dodatak otapala u spremnike s miješalicama. Traje minimalno tri dana, a miješanjem se osigurava bolja difuzija i kontakt otapala s uzorkom. Hidrodestilacija je metoda koja se može podijeliti na destilaciju vodom, destilaciju vodom i vodenom parom i na destilaciju vodenom parom. Ova metoda nije pogodna za ekstrakciju termolabilnih spojeva (Azmir i sur., 2013).

Konvencionalne metode ekstrakcije se koriste zbog niskih troškova i jednostavnosti izvođenja iako zahtijevaju dulje vrijeme ekstrakcije, visok utrošak energije i otapala, a u konačnici rezultiraju niskim prinosima ekstrakcije (Yang i sur., 2011).

2.2.2. Napredne metode ekstrakcije

Današnja istraživanja usmjerena su na sve veću primjenu tzv. naprednih metoda ekstrakcije čije su glavne prednosti smanjenje količine otapala, kraće vrijeme ekstrakcije, veći prinosi i bolja kvaliteta konačnih ekstrakata (Wang i Weller, 2006). U napredne metode ekstrakcije ubrajamo: ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima, ekstrakciju potpomognutu visokim tlakom, ekstrakciju potpomognutu pulsirajućim električnim poljem, ekstrakciju potpomognutu enzimima, ubranu ekstrakciju otapalima uz povišeni tlak, ekstrakciju pomoću superkritičnih fluida i ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (Azmir i sur., 2013).

2.2.2.1. Ekstrakcija pomoću superkritičnog CO₂

Ekstrakcija pomoću superkritičnog CO₂ pripada naprednim metodama ekstrakcije. Koristi se zbog brojnih prednosti koje superkritični fluidi imaju u odnosu na tekućine. Superkritični fluidi pokazuju svojstva plinova i tekućina nakon što temperatura i tlak fluida prijeđu kritičnu točku. Njihova moć otapanja ovisi o gustoći, imaju viši difuzijski koeficijent, nižu viskoznost i površinsku napetost u usporedbi s tekućinama. Zbog tih svojstava primjenom ekstrakcije pomoću superkritičnih fluida, ostvaruje se bolji prijenos mase (Wang i Weller, 2006). Kao superkritični fluid se najčešće koristi CO₂ koji je dobro otapalo za nepolarne spojeve, a osim nepolarnih spojeva, dodatkom drugih otapala poput etanola ili metanola može se koristiti i za ekstrakciju polarnih spojeva (Azwanida, 2015). Radi se o kemijski stabilnom, nepolarnom, netoksičnom, nezapaljivom i visoko selektivnom otapalu bez boje i mirisa (Mandal i sur., 2015). Idealno je otapalo za ekstrakciju superkritičnim fluidima zbog niske kritične temperature (31 °C) i tlaka (7,3 MPa). Za uspješnu ekstrakciju pomoću superkritičnog CO₂ važna je pravilna priprema uzoraka tj. praćenje udjela vlage u uzorcima i veličine čestica jer veće čestice mogu produljiti proces ekstrakcije. Uz to, važna je topljivost spoja u primijenjenom superkritičnom fluidu (Wang i Weller, 2006). Glavne prednosti primjene ovog tipa ekstrakcije očituju se u selektivnoj ekstrakciji jer je moguće mijenjati topljivost spoja u superkritičnom fluidu promjenom temperature i/ili tlaka fluida, ekstrakcija se provodi pri niskim temperaturama čime se izbjegava oštećenje ili razgradnja bioaktivnih spojeva, a ova metoda je i ekološki prihvatljiva (Wang i Weller, 2006).

2.2.2.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound assisted extraction, UAE*) se sve više koristi u prehrambenoj industriji jer može povećati ekstrakciju polifenola, antocijana i aromatskih tvari (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Provodi se u ultrazvučnoj kupelji ili pomoću sonde na frekvencijama od 20 kHz do 2000 kHz (Azwanida, 2015). Prije početka ekstrakcije potrebno je odrediti veličinu čestica, sadržaj vlage u uzorcima i odabrati pogodno otapalo. Na ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom utječu frekvencija, temperatura, snaga i vrijeme ekstrakcije pri čemu je učinak ultrazvuka bolji pri nižim frekvencijama koje se kreću u rasponu 18–40 kHz (Drmić i Režek Jambrak, 2010; Wang i Weller, 2006). Osnovni princip UAE je formiranje longitudinalnih valova prolaskom ultrazvučnih valova kroz tekući medij koji rezultiraju kontrakcijom i ekspanzijom tlaka. Time se javlja fenomen kavitacije koji uzrokuje pucanje staničnih stijenki i prodiranje otapala u biljno tkivo. Prednosti primjene

UAE su veći prinosi ekstrakcije, niža temperatura nego kod konvencionalnih metoda, smanjenje količine otapala, kraće vrijeme ekstrakcije i niža cijena u odnosu na ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (Drmić i Režek Jambrak, 2010; Wang i Weller, 2006). Veći prinosi ekstrakcije posljedica su kavitacije zbog koje dolazi do oštećenja stanične stijenke i olakšanog pristupa otapala staničnom sadržaju što rezultira povećanjem prijenosa mase (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Prednosti primjene UAE vidljive su u istraživanju Teh i Birch (2014) u kojem je provedena usporedba ekstrakcije fenolnih spojeva iz odmašćenih pogača konoplje, lana i uljane repice konvencionalnom ekstrakcijom i UAE. Zaključeno je kako je udio ukupnih fenola primjenom UAE 123,7 %, 117,96 % i 112,18 % viši u odnosu na kontrolni uzorak. Nedostatak ove metode je mogućnost nastanka slobodnih radikala koji uzrokuju degradaciju fitokemikalija (Abubakar i Haque, 2020).

2.3. METODE ODREĐIVANJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA

2.3.1. Spektrofotometrijske metode

Spektrometrija je grana analitičke kemije koja definira kemijski sastav i strukturu tvari pomoću separacije, detekcije i mjerenja energetske promjene u jezgrama ili elektronskim omotačima atoma odnosno u molekulama uslijed interakcije s elektromagnetskim zračenjem (Horvat, 2015). Jedna od najčešće korištenih spektrometrijskih metoda je UV/Vis spektrofotometrija koja koristi raspon elektromagnetskog zračenja od 200 do 700 nm. Valne duljine UV (ultraljubičastog) dijela spektra kreću se od 200 do 350 nm dok su valne duljine Vis (vidljivog) dijela spektra od 350 do 700 nm. Osnovni cilj spektrometrijskih metoda je odrediti koncentraciju analita u uzorku na temelju razlike u apsorpciji svjetlosti. Pri tome je važan Lambert-Beerov zakon:

$$A = \epsilon b c$$

gdje je A - apsorbanca, ϵ - molarni apsorpcijski koeficijent (L/cm²*mol), b - duljina puta svjetlosti kroz uzorak (debljina kivete) (cm), c - množinska koncentracija (mol/L).

Primjenom Lambert-Beerova zakona moguće je na temelju izmjerene apsorbancaje odrediti koncentraciju analita u uzorku pomoću jednadžbe pravca standarda. UV/Vis spektrofotometrija provodi se primjenom spektrofotometra koji se sastoji od izvora zračenja, monokromatora, kiveta za uzorak i referentni uzorak te detektora. Kao izvor zračenja se

koriste volframove lampe koje emitiraju potrebno zračenje pri valnim duljinama 350-2500 nm ili deuterijeve lampe pri nižim valnim duljinama (Penner, 2017). Za izbor valnih duljina potreban je monokromator, a kivete su najčešće izrađene od kvarcnog stakla koji propušta UV/Vis zračenje. Detektori mjere intenzitet zraka svjetlosti.

Glavne prednosti primjene UV/Vis spektrofotometrije su očuvanost uzoraka i mjerenje pri niskim koncentracijama analita. Uz to je jednostavna, brza i robusna metoda, s manje fizikalno-kemijskih interferencija u odnosu na kromatografske metode (Atole i Rajput, 2018). Upravo zbog navedenih prednosti, UV/Vis spektrofotometrija je metoda koja je odabrana za određivanje ukupnih fenola u uzorcima pogače pasjeg trna.

2.3.2. Kromatografske metode

Kromatografske metode se često koriste u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, a temelje se na razdvajanju komponenti iz uzorka između stacionarne i mobilne faze. Mobilna faza, koja može biti tekuća ili plinovita, prenosi sastojke kroz stacionarnu fazu koji se ovisno o svojim svojstvima raspodjele na stacionarnoj fazi uslijed interakcija poput površinske adsorpcije ili naboja. Rezultat kromatografskih metoda je kromatogram tj. dijagram koji na apscisi prikazuje vrijeme ili volumen mobilne faze, a na ordinati signal detektora. Na kromatogramu su vidljivi tzv. pikovi, a površina ili visina dobivenog pika proporcionalna je koncentraciji određenog spoja (Poole, 2003). Za identifikaciju sastojaka važno je retencijsko vrijeme tj. vrijeme od trenutka injektiranja uzorka do pojave pika na kromatogramu. Usporedbom retencijskog vremena standarda i analita provodi se identifikacija spoja. Kromatografske metode dijelimo na plošnu kromatografiju u kojoj je stacionarna faza u obliku ravnog sloja i kolonsku kromatografiju u kojoj je stacionarna faza u obliku kolona. Kolonska kromatografija se dijeli na plinsku, tekućinsku i fluidnu pri superkritičnim uvjetima.

2.3.2.1. Tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti (UPLC)

Tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) je kromatografska metoda koja se sve češće koristi. Za razliku od tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), UPLC metodu odlikuje rad pri višim tlakovima. Tako se provodi pri tlaku višem od 1000 bara čime su osigurane prednosti kao što su kraće vrijeme analize, poboljšano razdvajanje i detekcija. Zbog upotrebe višeg tlaka, kolone su punjene materijalima s česticama veličine manje od 2 μm dok su kod HPLC metode veličine čestice u kolonama 3-5 μm (Taleuzzaman i sur., 2015). Uobičajeno trajanje UPLC

analize je 3-10 minuta što je kraće nego za HPLC metodu. Ključan korak UPLC metode je injektiranje uzorka u malim volumenima čime se doprinosi poboljšanju osjetljivosti. Važan je i pravilan odabir kolone kao i detektora, pri čemu se najčešće koristi UV/Vis detektor zbog visoke osjetljivosti. Time je osigurana manja potrošnja otapala, niži troškovi, očuvanje uzoraka i selektivnost. Glavni nedostatak UPLC metode je ograničen vijek trajanja kolone zbog upotrebe visokih tlakova (Taleuzzaman i sur., 2015).

Unatrag nekoliko godina često se koristi kombinacija tekućinske kromatografije vrlo visoke djelotvornosti i dvojne spektrometrije masa (engl. *Tandem Mass Spectrometry, MS/MS*).

2.3.3. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je metoda koja se temelji na prevođenju molekula analita u ionizirano stanje, a nastali ioni se identificiraju pomoću omjera mase i naboja (m/z). Koristi se u kvalitativne i kvantitativne svrhe. Osnovni dijelovi masenog spektrometra su sustav za uvođenje uzorka, izvor iona, maseni analizator i detektor. Ionizator je dio masenog spektrometra koji prevodi uzorak u plinovito i ionizirano stanje. Najčešće korištene ionizacijske tehnike su elektrosprej ionizacija (engl. *Electrosprey Ionization, ESI*), kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*) i ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Ionisation, API*) (Pitt, 2009). Elektrosprej ionizacija se temelji na principu uvođenja mobilne faze i analita iz kromatografa u metalnu kapilaru koja je smještena izvan osi od ulaza u spektrometar masa. Time je osigurana minimalna mogućnost kontaminacije. U kapilari dolazi do nastanka nabijenih kapljica otapala, zatim se otapalo otpari pod utjecajem topline, struje dušika ili električnog potencijala, a naboj se prenosi na molekule analita. Nastali ioni se prenose u spektrometar masa pod visokim vakuumom (Pitt, 2009). Analizator služi za razdvajanje iona prema omjeru mase i naboja (m/z). Najčešće se koriste trostruki kvadrupol (engl. *Triple Quadrupol*) filter masa, TOF (engl. *Time of Flight*) analizator i ionska zamka (engl. *Ion Trap*). Trostruki kvadrupol (engl. *Triple Quadrupol, QQQ*) filter masa ili dvojni maseni spektrometar (engl. *Tandem Mass Spectrometers, MS/MS*) sastoji se od dva kvadrupola i kolizijske ćelije. Sadrži i dvije pozitivno i dvije negativno nabijene elektrode, a promjenom električnog polja i frekvencije između elektroda postiže se filtriranje iona određenog omjera m/z . Prvi kvadrupol (Q1) služi kao filter masa za propuštanje iona specifičnog omjera m/z do kolizijske ćelije (Q2) koja služi za kontroliranu fragmentaciju iona i može sadržavati niskotlačne plinove

argon ili dušik. Kolizijska ćelija naziva se još i sudarna stanica jer se u njoj ioni sudaraju s molekulama inertnog plina i fragmentiraju do produkt iona. Treći kvadrupol (Q3) kao i prvi služi kao filter masa odnosno za odabir produkt iona koji idu do detektora (Harris, 2010). Detektori služe za određivanje količine molekularnih iona za svaki omjer mase i naboja (m/z). U konačnici se dobiva maseni spektar koji prikazuje mase iona u odnosu na njihove koncentracije.

Za uspješno provođenje analize važno je odrediti izvor iona tj. ionizacijsku tehniku, polarnost, temperaturu, tlak, kolizijsku energiju, vrijeme analize. Primjena UPLC-MS/MS metode osigurava mogućnost analize malih molekula u vrlo niskim koncentracijama, a odlikuje je osjetljivost, točnost i visoka selektivnost (Pitt, 2009).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak

Kao uzorak je korištena pogača pasjeg trna, dobivena kao nusproizvod proizvodnje ulja ploda pasjeg trna ekstrakcijom pomoću superkritičnog CO₂. Plod pasjeg trna je sorte *Leikora* i uzgojen je na području Hrvatske (okolica Zagreba).

3.1.2. Kemikalije

- Destilirana voda (MilliQ-Plus, Millipore)
- Etanol (96 %, Lach-Ner s.r.o., Češka)
- Mravlja kiselina (Lach-Ner, Prag, Češka)
- Acetonitril (Lach-Ner, Prag, Češka)

Reagensi za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

- Folin-Ciocalteu reagens (Fisher Scientific, Velika Britanija)
- Zasićena otopina natrijevog karbonata (20 %-tna otopina)

Priprema: 100 g anhidrida natrijevog karbonata otopi se u 400 mL vruće destilirane vode i potom ohladi na sobnu temperaturu. Nakon toga se doda nekoliko kristalića natrijevog karbonata, nadopuni u odmjerne tikvici od 500 mL i filtrira nakon 24 sata.

- Standard galne kiseline

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

Reagensi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) (Acros Organics, SAD)
- AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropionamid)-dihidroklorid, 98 %) (Acros Organics, Belgija)
- Fosfatni pufer (75 mM, pH= 7,5)

Priprema: U 1000 mL destilirane vode otopi se 5,0943 g dinatrijevog hidrogenfosfata dihidrata ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) i 6,3175 g kalijevog dihidrogenfosfata (KH_2PO_4) miješanjem na magnetskoj miješalici uz mjerenje pH vrijednosti. Kako bi se postigao pH=7,5 potrebno je dodati pelete NaOH. Svježa otopina priprema se svaki dan.

- Fluorescein (70,3 nM)
- Otopina 1

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

- Otopina 2

Priprema: 24,5 μL se uzme od otopine 1 te se nadopuni s 250 mL 75 mM fosfatnog pufera. Svaki dan se pripravlja svježa razrijeđenja otopina fluoresceina.

- Otopina AAPH (240 mM)

Priprema: U 10 mL 75 mM fosfatnog pufera se otopi 0,6508 g AAPH.

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

Priprema: Početna („stock“) otopina trolox se pripremi otapanjem 3,3 mg trolox u 100 mL 75 mM fosfatnog pufera. Iz pripremljene početne otopine trolox pripreme se odgovarajuća razrijeđenja.

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura

- Tehnička vaga (točnost $\pm 0,01$ g) (Kern & Sohn, Njemačka)
- Analitička vaga (točnost $\pm 0,0001$ g) (Sartorius AG, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Elmasonic P, Njemačka)
- Centrifuga (Hermle Z 206A, Njemačka)
- Vortex miješalica (Velp Scientifica, Italija)
- Kupelj rotavapora (IKA HB 10 basic, Njemačka)
- Spektrofotometar (UV-VIS UviLine 9400, Secomam, Francuska)
- CLARIOstar fluorespektrometar (BMG LabTech, Offenburg, Njemačka)
- Magnetska miješalica (Velp Scientifica, Italija)
- pH-metar (inoLab pH 7110, Njemačka)
- UPLC sustav (1290 RRLC, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- 6430 maseni spektrometar Agilent Technologies (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

Pribor

- Falcon kivete (14 mL i 50 mL)
- Plastična žličica
- Laboratorijske čaše (150 mL, 300 mL, 600 mL, 1000 mL, 2000 mL)
- Filter papir
- Stakleni lijevak
- Odmjerne tikvice (50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL i 1000 mL)
- Menzura (1000 mL)
- Automatske mikropipete (10-100 μ L, 100-1000 μ L)
- Pipeta (10 mL)
- Propipeta
- Stakleni štapić
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Kiveta
- Magneti
- Eppendorf epruvete (2,0 mL)

- Mikrotitarska pločica s 96 jažica (Greiner, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Vijale (1,5 mL)
- 0,45 µm filter Chromafil Xtra Pet (Macherey-Nagel GmbH & Co, Njemačka)
- Medicinska šprica i igla

3.2. METODE RADA

3.2.1. Ekstrakcija bioaktivnih spojeva pogače pasjeg trna potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva provedena je primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE). Kako bi se odredili optimalni uvjeti, varirani su sljedeći parametri: temperatura (35, 50 i 65 °C), snaga ultrazvuka (30, 60 i 90 %) i vrijeme ekstrakcije (10, 20 i 30 minuta), a kao ekstrakcijsko otapalo je korišten 70 %-tni etanol. Detaljan plan provedbe eksperimenta prikazan je u tablici 2.

Postupak rada

U Falcon kivetu se odvaži $1 \pm 0,01$ g uzorka pogače pasjeg trna i doda se 40 mL 70 %-tnog etanola. Uzorci se ekstrahiraju u ultrazvučnoj kupelji (slika 4) prema navedenim parametrima temperature, snage i vremena. Dobiveni ekstrakti se centrifugiraju 15 minuta pri 4500 o/min. Slijedi filtracija (Whatman filter papir) u odmjerne tikvice od 50 mL koje se do oznake nadopune otapalom. Pripremljeni ekstrakti se skladište na +4 °C do daljnje analize.



Slika 4. Ultrazvučna kupelj (Elma, Elmasonic P, Njemačka) (*vlastita fotografija*)

Tablica 2. Plan optimizacije uvjeta UAE

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (%)	Vrijeme (min)
1	35	30	10
2			20
3			30
4		60	10
5			20
6			30
7		90	10
8			20
9			30
10	50	30	10
11			20
12			30
13		60	10
14			20
15			30
16		90	10
17			20
18			30
19	65	30	10
20			20
21			30
22		60	10
23			20
24			30
25		90	10
26			20
27			30

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

Princip metode

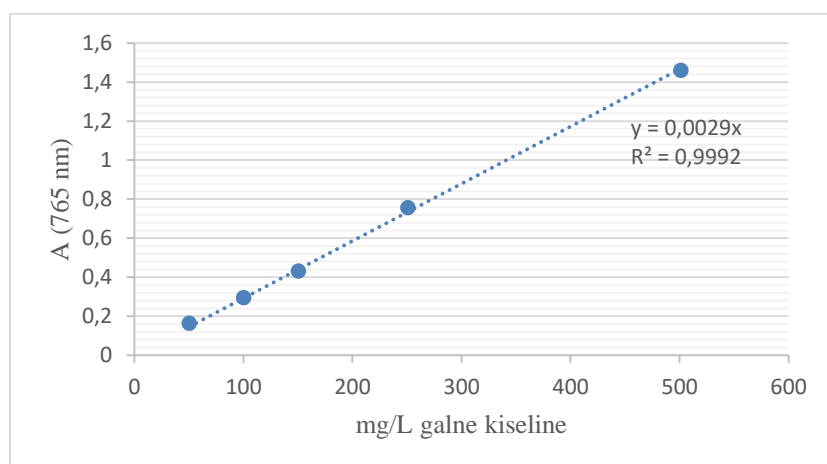
Koncentracija ukupnih fenola određena je primjenom spektrofotometrijske metode temeljene na kolorimetrijskoj reakciji Folin – Ciocalteu reagensa i polifenola pri čemu dolazi do nastanka plavo obojenog kompleksa. Jači intenzitet obojenja javlja se pri većem udjelu fenolnih spojeva, a mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm (Shortle i sur., 2014).

Postupak određivanja ukupnih fenola

U staklene epruvete otpipetira se 100 μL ekstrakta, 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute dodaje se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Slijedi miješanje pomoću Vortex miješalice i termostatiranje uzoraka 25 minuta pri 50 $^{\circ}\text{C}$ (u kupelji od rotavapora). Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Za pripremu slijepa probe, umjesto ekstrakta se koristi ekstrakcijsko otapalo (70 %-tni etanol).

Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca potrebno je odvagati 0,5 g galne kiseline i odvagu otopiti u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjerne tikvici od 100 mL. Nakon toga se tikvica nadopuni do oznake destiliranom vodom. Od otopine galne kiseline pripreme se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu koje se nadopune do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tikvicama su 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. U staklene epruvete se iz svake tikvice otpipetira 100 μL otopine standarda, a zatim se doda 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Slijedi miješanje pomoću Vortex miješalice i termostatiranje uzoraka 25 minuta na 50 $^{\circ}\text{C}$ (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu se koristi 100 μL destilirane vode. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini 765 nm, a iz dobivenih vrijednosti se prikaže baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu se na apscisi nalaze koncentracije galne kiseline (mg/L) dok je na ordinati prikaz izmjerenih apsorbancija pri 765 nm (slika 5). Prema jednadžbi pravca moguće je izračunati koncentraciju ukupnih fenola.



Slika 5. Prikaz ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o koncentraciji galne kiseline (mg/L)

Dobivena jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0029 \times x \quad (R^2=0,9992)$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg/L)

R^2 – koeficijent determinacije

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

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

Princip metode

ORAC metoda (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) je standardizirana metoda određivanja antioksidacijskog kapaciteta. Pripada skupini HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*) metoda baziranih na prijenosu atoma vodika, a mjeri inhibiciju peroksil radikala koji nastaje pri raspadu azo-spoja, 2,2'-azobis (2-amidinopropionamid)-dihidroklorid (AAPH). Reakcija se provodi pri temperaturi od 37 °C i primjer je antioksidacijske aktivnosti sprječavanja lančanih reakcija radikala (Prior, 2015).

Postupak rada

Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta pripreme se odgovarajuća razrjeđenja uzoraka (uzorci 2 i 4 razrijeđeni su 8, a ostali uzorci 10 puta) fosfatnim puferom (75 mM, pH=7,5). U jažice mikrotitarske pločice se otpipetira 150 µL otopine fluoresceina i 25 µL uzorka (75 mM fosfatnog pufera za slijepu probu ili otopine standarda troloxa za izradu baždarnog pravca). Pločica s jažicama se inkubira u čitaču mikroploča (30 minuta pri 37 °C) prije početka mjerenja i nakon se toga mjeri fluorescencija (λ eks. 485 nm i λ em. 520 nm) svakih 90 sekundi kako bi se odredio pozadinski signal. Nakon tri ciklusa, 25 µL svježe pripremljenog 240 mM AAPH se softverski injektira uz pomoć unutarnjeg ubrizgivača, a mjerenje intenziteta fluorescencije traje do 120 minuta. Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-

tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) služi kao standard za izradu baždarnog pravca preko kojeg se izražavaju ORAC vrijednost analiziranih uzoraka. Za analizu podataka koristi se MARS softver (MARS 2.0 software, BMG LABTECH, Offenburg, Njemačka) koji omogućuje automatsku evaluaciju. Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost dvaju mjerenja iskazanih sa standardnom devijacijom, a ORAC vrijednosti se prikazuju kao mikromol trolox ekvivalenta po litri ($\mu\text{mol TE/L}$) odnosno preračunato na 100 g suhe tvari ekstrakta kao mikromol trolox ekvivalenta na 100 g suhe tvari ekstrakta ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g s.tv.e.}$).

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

Princip metode

Za određivanje sadržaja pojedinačnih fenolnih spojeva i vitamina C u analiziranom ekstraktu pogače pasjeg trna pri optimalnim uvjetima korišten je UPLC-MS/MS ESI u pozitivnom i negativnom modu prema metodi koju se prethodno opisali Elez Garofulić i sur. (2018). Za kontrolu uređaja i obradu podataka korišten je program Agilent MassHunter Workstation (ver. B.04.01).

Postupak rada

Uzorak je prije injektiranja profiltriran kroz $0,45\ \mu\text{m}$ filter (Macherey-Nagel, Gmbh & Co, Njemačka). Uvjeti kromatografskog određivanja pojedinačnih fenolnih spojeva i vitamina C prikazani su u tablici 3, a gradijent otapala u tablici 4. Mobilne (pokretne) faze su: A (0,1 % mravlja kiselina u redestiliranoj vodi) i B (0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu).

Tablica 3. Uvjeti kromatografskog određivanja pojedinačnih fenolnih spojeva i vitamina C

Kolona	Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 µm (100 × 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 kvadrupol (Agilent 6430 QqQ)
Ionski izvor	ESI
MS parametri	temperatura plina: 300 °C protok plina (N ₂): 11 L/min nebulizer: 40 psi napon na kapilari: +4000 V; -3500 V maseni detektor: MRM mode (<i>m/z</i> 50 - 1000)
Eluiranje	gradijentno – gradijent prikazan u tablici 4
Temperatura	35 °C
Vrijeme analize	12,5 min
Injektirani volumen	2,5 µL

Tablica 4. Gradijent otapala za UPLC-MS/MS analizu (Elez Garofulić i sur., 2018)

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

Identifikacija fenolnih spojeva UPLC-MS/MS metodom provedena je usporedbom spektra masa i fragmentacijskih uzoraka autentičnih standarda, a za spojeve za koje ne postoje

standardi, prekursor, produkt ioni i polarnost određeni su prema literaturnim podacima (tablica 5).

Tablica 5. Podaci masene spektrometrije i identifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva i vitamina C

Naziv spoja	Prekursor ion (<i>m/z</i>)	Produkt ion (<i>m/z</i>)	Fragmentor (V)	Kolizijska energija (V)	Polarnost
FLAVONOLI					
Izoramnetin-3-sinapoilglukozid-glukozid-7-ramnozid	993	463	100	5	pozitivan
Izoramnetin-3-soforozid-7-ramnozid	787	463	100	5	pozitivan
Izoramnetin-3-rutinozid-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-soforozid-ramnozid	757	287	120	15	pozitivan
Izoramnetin-3,7-diheksozid	641	479	100	5	pozitivan
Izoramnetin-3-rutinozid	625	317	100	5	pozitivan
Rutin*	611	465;303	120	5;15	pozitivan
Kamferol-3-rutinozid*	595	287	120	15	pozitivan
Izoramnetin-3-heksozid	479	317	100	5	pozitivan
Kvercetin-3-glukozid*	465	303	100	5	pozitivan
Izoramnetin-3-ramnozid	463	317	100	5	pozitivan

* Identifikacija je potvrđena korištenjem autentičnih standarda.

Tablica 5. Podaci masene spektrometrije i identifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva i vitamina C-*nastavak*

Kamferol-heksozid-ramnozid	595	153	120	15	pozitivan
Kvercetin-3-ramnozid	449	303	100	5	pozitivan
Kvercetin-3-pentozid	435	303	100	5	pozitivan
Kamferol-ramnozid	433	287	120	15	pozitivan
Izoramnetin	317	201	100	5	pozitivan
Kvercetin	303	275	100	5	pozitivan
Kamferol	287	145	120	15	pozitivan
FLAVONI					
Luteolin*	287	153	140	35	pozitivan
Apigenin*	271	153	80	30	pozitivan
HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE					
Vanilinska kiselina*	169,1	125,1	100	10	pozitivan
Elaginska kiselina heksozid	436	303	100	10	negativan
Galna kiselina*	169	125	100	10	negativan
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	137	93	100	10	negativan
Siringinska kiselina*	199,1	140,1	90	10	pozitivan
Protokatehinska kiselina	153	109	100	10	negativan
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
Ferulična kiselina*	193	178;134	80	5;10	negativan
Cinamična kiselina*	147	103	80	10	negativan
VITAMINI					
Askorbinska kiselina*	175	115	100	5	negativan

* Identifikacija je potvrđena korištenjem autentičnih standarda.

Kvantifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva u uzorku izračunata je prema baždarnim jednadžbama standardnih spojeva (tablica 6), a za kvantifikaciju spojeva za koje ne postoje standardi korištene su jednadžbe pravaca spojeva iz iste grupe fenolnih spojeva. Standardi polifenola za izradu kalibracijskih krivulja otopljeni su u metanolu u koncentraciji od 100

mg/mL, a točke kalibracije bile su u rasponu od 0,10 do 50 mg/mL. Dobivene koncentracije izražene su u mg/100 g s.tv.

Tablica 6. Baždarne jednadžbe standardnih spojeva

Spoj	Baždarna jednadžba
Rutin	$y = 15217 x$
Kamferol-3- <i>O</i> -glukozid	$y = 57116 x$
Kvercetin-3-glukozid	$y = 33404 x$
Luteolin	$y = 34839 x$
Vanilinska kiselina	$y = 2958 x$
Cinamična kiselina	$y = 11327 x$
Klorogenska kiselina	$y = 21704 x$
Siringinska kiselina	$y = 405,59 x$
Ferulična kiselina	$y = 14367 x$
Kafeinska kiselina	$y = 56012 x$
Galna kiselina	$y = 42373 x$
<i>p</i> -kumarinska kiselina	$y = 98481 x$
Askorbinska kiselina	$y = 271,46 x$

Izoramnetin i derivati izoramnetina (izoramnetin-3-sinapoilglukozid-glukozid-7-ramnozid, izoramnetin-3-soforozid-7-ramnozid, izoramnetin-3-rutinozid-7-glukozid, izoramnetin-3,7-diheksozid, izoramnetin-3-rutinozid, izoramnetin-3-heksozid, izoramnetin-3-ramnozid) kao i kvercetin i derivati kvercetina (kvercetin-3-soforozid-7-ramnozid, kvercetin-3-ramnoglukozid-7-ramnozid, kvercetin-3-ramnozid, kvercetin-3-pentozid) izračunati su kao ekvivalenti kvercetin-3-glukozida. Kamferol i derivati kamferola (kamferol-soforozid-ramnozid, kamferol-3-rutinozid, kamferol-heksozid-ramnozid, kamferol-ramnozid) izračunati su kao ekvivalenti kamferol-3-*O*-glukozida. Apigenin je izračunat kao ekvivalent luteolina. Kao derivati galne kiseline izračunati su: elaginska kiselina heksozid, protokatehinska kiselina i *p*-hidroksibenzojeva kiselina.

3.2.5. Obrada rezultata

Programski sustav Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD) korišten je za eksperimentalni dizajn pokusa i statističku obradu podataka. Eksperiment je dizajniran kao puni faktorijalni dizajn. Kako bi se utvrdila važnost utjecaja variranih parametara ekstrakcije (temperatura, snaga ultrazvuka, vrijeme ekstrakcije) na promatrane parametre te kako bi se odredili optimalni uvjeti ekstrakcije korištena je multifaktorska analiza varijance (ANOVA). Statistički značajna razlika razmatrana je na razini $p \leq 0,05$ (95 %-tni interval pouzdanosti), a srednje vrijednosti rezultata uspoređene su s Tukey HSD testom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je provedena ekstrakcija fenolnih spojeva i vitamina C te određivanje antioksidacijskog kapaciteta pogače pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L.) primjenom UAE. Ulje ploda pasjeg trna (sorta *Leikora*) je dobiveno ekstrakcijom pomoću superkritičnog CO₂. Za UAE je kao ekstrakcijsko otapalo korišten 70 %-tni etanol.

S ciljem optimizacije uvjeta ekstrakcije, varirani su sljedeći parametri: temperatura (35, 50 i 65 °C), snaga ultrazvuka (30, 60 i 90 %) i vrijeme ekstrakcije (10, 20 i 30 minuta). Nakon UAE, u dobivenim ekstraktima je provedeno spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom i određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva i vitamina C pomoću UPLC-MS/MS metode.

Rezultati su obrađeni u Microsoft Excel programu i prikazani tablično kao srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja ± standardna devijacija. Statistička obrada podataka provedena je u programskom sustavu Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD), a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

4.1. UTJECAJ UAE NA UDIO UKUPNIH FENOLA U POGAČI PASJEG TRNA

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja masenih udjela fenolnih spojeva ekstrahiranih iz pogače pasjeg trna primjenom UAE prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Udio ukupnih fenola (mg GAE/100 g s.tv.) ekstrahiranih iz pogače pasjeg trna primjenom UAE

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (%)	Vrijeme (min)	Ukupni fenoli (mg GAE/100 g s.tv.)
1	35	30	10	1123,25 ± 11,30
2			20	983,56 ± 14,04
3			30	1499,83 ± 13,92
4		60	10	1054,77 ± 0,42
5			20	1196,75 ± 4,49
6			30	1366,05 ± 3,39
7		90	10	1142,03 ± 4,27
8			20	1591,90 ± 10,79
9			30	1637,08 ± 8,06
10	50	30	10	1572,21 ± 11,21
11			20	1695,40 ± 7,06
12			30	1735,74 ± 10,19
13		60	10	1351,72 ± 7,70
14			20	1998,98 ± 8,82
15			30	1965,86 ± 10,77
16		90	10	1749,01 ± 10,56
17			20	1792,11 ± 6,65
18			30	1846,55 ± 8,26
19	65	30	10	1303,05 ± 10,72
20			20	1453,91 ± 9,01
21			30	1808,65 ± 9,57
22		60	10	1381,00 ± 7,89
23			20	1853,88 ± 5,88
24			30	1493,14 ± 2,67
25		90	10	1781,03 ± 7,94
26			20	1729,31 ± 6,45
27			30	1761,33 ± 9,96

Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija.

Udio ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima bio je u rasponu od $983,56 \pm 14,04$ do $1998,98 \pm 8,82$ mg GAE/100 g s.tv. s prosječnom vrijednošću od $1550,67$ mg GAE/100 g s.tv. Najviši udio ukupnih fenola određen je u uzorku ekstrahiranom pri temperaturi $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, snazi ultrazvuka 60 % i vremenu ekstrakcije od 20 minuta (uzorak 14), a najmanji u uzorku ekstrahiranom pri temperaturi $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, snazi ultrazvuka 30 % i vremenu ekstrakcije od 20 minuta (uzorak 2).

Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Zardo i sur. (2019) gdje je udio ukupnih fenola u pogači suncokreta bio u rasponu od 751 do 1851 mg GAE/100 g primjenom UAE uz etanol kao ekstrakcijsko otapalo. I u istraživanju Teh i Birch (2014) prosječni udio ukupnih fenola u odmašćenoj pogači konoplje bio je u rasponu 911,30-1542,03 mg GAE/100 g, a u odmašćenoj pogači lana 873,97-1257,37 mg GAE/100 g. Prosječna vrijednost udjela ukupnih fenola u odmašćenoj pogači uljane repice bila je 2276,83-2563,5 mg GAE/100 g pri temperaturama $40\text{-}70\text{ }^{\circ}\text{C}$ što je više nego u pogači pasjeg trna, a kao ekstrakcijsko otapalo je korištena smjesa metanola i acetona (Teh i Birch, 2014). Razlike u masenim udjelima ukupnih fenola zabilježene su zbog različitog sastava početnih sirovina kao i odabira ekstrakcijskog otapala.

Suprotno tome, najniži udio fenolnih spojeva u pogači pasjeg trna približno odgovara istraživanju Terpinč i sur. (2012) gdje je udio ukupnih fenola u pročišćenim ekstraktima pogače sjetvenog podlanka (*Camelina sativa* L.) ekstrakcijom u metanolu iznosio 866 ± 20 mg/100 g izraženo kao ekvivalent klorogenske kiseline (CA). Pročišćavanje je provedeno zato što šećeri i organske kiseline mogu utjecati na određivanje udjela ukupnih fenola ili se taložiti što otežava HPLC analizu. Udio ukupnih fenola u sirovim ekstraktima pogače sjetvenog podlanka iznosio je 1666 ± 40 mg CA/100 g što približno odgovara prosječnoj vrijednosti udjela ukupnih fenola u ovom istraživanju.

Rezultati statističke analize utjecaja parametara UAE na udio ukupnih fenola pogače pasjeg trna prikazani su u tablici 8. Statistička analiza je pokazala da na udio ukupnih fenola pogače pasjeg trna značajno utječu temperatura, vrijeme ekstrakcije te snaga ultrazvuka.

Tablica 8. Rezultati statističke analize utjecaja pojedinačnih parametara UAE na udio ukupnih fenola pogače pasjeg trna

Parametar ekstrakcije	Ukupni fenoli (mg GAE/100 g s.tv.)
Temperatura (°C)	p < 0,05*
35	1288,36 ± 2,08 ^a
50	1745,29 ± 2,08 ^c
65	1618,37 ± 2,08 ^b
Snaga (%)	p < 0,05*
30	1463,96 ± 2,08 ^a
60	1518,02 ± 2,08 ^b
90	1670,04 ± 2,08 ^c
Vrijeme (min)	p < 0,05*
10	1384,23 ± 2,08 ^a
20	1588,42 ± 2,08 ^b
30	1679,36 ± 2,08 ^c

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

Utjecaj temperature na udio ukupnih fenola

Najviši prosječni udio ukupnih fenola $1745,29 \pm 2,08$ mg GAE/100 g s.tv. određen je pri temperaturi 50 °C, a najniži pri temperaturi 35 °C ($1288,36 \pm 2,08$ mg GAE/100 g s.tv.) (tablica 8). Najviši udio ukupnih fenola nije određen pri najvišoj temperaturi od 65 °C ($1618,37 \pm 2,08$ mg GAE/100 g s.tv.). Primjenom visokih temperatura dolazi do mekšanja biljnog tkiva i slabljenja interakcija fenolnih spojeva i proteina što u konačnici rezultira boljom migracijom fenolnih spojeva u ekstrakcijsko otapalo (Mokrani i Madani, 2016). Iako viša temperatura uzrokuje viši prinos, nakon određene temperature dolazi do smanjenja prinosa ukupnih fenola zbog smanjenog učinka kavitacije tj. veliki broj mjehurića implodira s manjim intenzitetom uzrokujući manja oštećenja biljnog materijala (Kumar i sur., 2021). Sličan trend zabilježen je i u istraživanju Al-Dhabi i sur. (2017) primjenom UAE fenolnih spojeva iz taloga kave pri temperaturama 30-50 °C gdje je prinos ukupnih fenola bio niži pri temperaturi višoj od 45 °C. Također, Dzah i sur. (2020) navode kako do razgradnje fenolnih spojeva dolazi pri temperaturi iznad 60 °C ovisno o vrstama fenolnih spojeva, njihovim fizikalno-kemijskim karakteristikama i interakciji uzorka s otapalom. Suprotno tome, u istraživanju Zardo i sur. (2019) najviši prinos ukupnih fenola u pogači suncokreta ostvaren je pri najvišoj temperaturi od 70 °C primjenom UAE. Također, u istraživanju Teh i Birch (2014) najviši udio ukupnih fenola u odmašćenoj pogači konoplje, uljane repice i lana ostvaren je pri

najvišoj temperaturi ekstrakcije od 70 °C, a temperatura je imala statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola.

Utjecaj snage ultrazvuka na udio ukupnih fenola

Statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola ima i snaga ultrazvuka ($p < 0,05$) pri čemu je najniži prosječni udio ukupnih fenola određen pri snazi ultrazvuka od 30 % ($1463,96 \pm 2,08$ mg GAE/100 g s.tv.), a najviši pri najvišoj snazi tj. 90 % ($1670,04 \pm 2,08$ mg GAE/100 g s.tv.) (tablica 8). Povećanje snage ultrazvuka utjecalo je na rast udjela ukupnih fenola. Razlog tome je povećanje veličine kavitacijskih mjehurića koji uzrokuju stvaranje pora i mekšanje biljnog tkiva što rezultira višim prinosom (Kumar i sur., 2021). U istraživanju Dobrinčić i sur. (2020) statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola lista masline primjenom UAE je također imala snaga ultrazvuka te je uočen porast udjela ukupnih fenola povećanjem snage ultrazvuka s 50 na 100 %.

Suprotno tome, prema istraživanju Dobrosravić i sur. (2021) snaga ultrazvuka nije imala statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola lista lovora nakon UAE, a korištena snaga ultrazvuka bila je 50-100 %.

Utjecaj vremena ekstrakcije na udio ukupnih fenola

Vrijeme ekstrakcije također ima statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na udio ukupnih fenola, a prosječan udio ukupnih fenola je najniži pri vremenu od 10 minuta ($1384,23 \pm 2,08$ mg GAE/100 g s.tv.) dok je najviši udio određen pri 30 minuta ($1679,36 \pm 2,08$ mg GAE/100 g s.tv.) (tablica 8). Povećanjem temperature UAE povećava se udio ukupnih fenola. Produljeno vrijeme ekstrakcije uzrokuje bubrenje, hidrataciju i mekšanje biljnog tkiva što rezultira povećanjem prinosa. Ipak, predugo vrijeme ekstrakcije može rezultirati smanjenjem prinosa zbog degradacije analita (Kumar i sur., 2021).

Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Tech i Birch (2014) u kojem je vrijeme ekstrakcije imalo statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na udio ukupnih fenola određen nakon UAE u odmašćenju pogači konoplje, uljane repice i lana. Također, i u istraživanju Dobrosravić i sur. (2021) vrijeme ekstrakcije imalo je statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola lista lovora. Značajan utjecaj vremena UAE na udio ukupnih fenola iz ploda biljke *Cupaniopsis anacardioides* utvrđen je i u istraživanju Pham i sur. (2020) gdje je uočeno povećanje udjela ukupnih fenola odnosno flavonoida produljenjem trajanja ekstrakcije s 20 na 60 minuta.

4.2. UTJECAJ UAE NA ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET POGAČE PASJEG TRNA

Rezultati određivanja antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktima pogače pasjeg trna primjenom ORAC metode prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Rezultati antioksidacijskog kapaciteta ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv.}$) određenog u ekstraktima pogače pasjeg trna primjenom ORAC metode

Uzorak	Temperatura (°C)	Snaga (%)	Vrijeme (min)	Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv.}$)
1	35	30	10	6871,34 \pm 8,64
2			20	6322,90 \pm 17,61
3			30	8759,13 \pm 12,71
4		60	10	6000,12 \pm 28,13
5			20	9194,90 \pm 82,50
6			30	8813,61 \pm 4,75
7		90	10	9192,18 \pm 13,47
8			20	9280,29 \pm 6,72
9			30	8989,16 \pm 12,15
10	50	30	10	8983,91 \pm 4,19
11			20	7700,93 \pm 87,06
12			30	8440,58 \pm 12,34
13		60	10	8756,20 \pm 7,51
14			20	9404,85 \pm 9,89
15			30	9448,77 \pm 11,65
16		90	10	8751,92 \pm 6,07
17			20	8495,53 \pm 15,39
18			30	8931,60 \pm 8,41
19	65	30	10	8887,88 \pm 8,96
20			20	8794,28 \pm 5,66
21			30	8631,72 \pm 11,08
22		60	10	8631,72 \pm 5,74
23			20	9332,67 \pm 5,89
24			30	8912,14 \pm 7,11
25		90	10	9427,00 \pm 9,26
26			20	9485,00 \pm 4,34
27			30	9304,90 \pm 14,99

Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost dvaju mjerenja \pm standardna devijacija.

Antioksidacijski kapacitet u ekstraktima pogače pasjeg trna bio je u rasponu od $6000,12 \pm 28,13$ do $9485,00 \pm 4,34$ $\mu\text{mol TE}/100$ g s.tv. (tablica 9). Najveća vrijednost antioksidacijskog kapaciteta određena je u ekstraktu kada je pogača pasjeg trna ekstrahirana pri temperaturi 65 °C, snazi ultrazvuka 90 % i vremenu ekstrakcije od 20 minuta (uzorak 26), a najmanji antioksidacijski kapacitet određen je u ekstraktu uzorka ekstrahiranog pri temperaturi 35 °C, snazi ultrazvuka 60 % i vremenu ekstrakcije od 10 minuta (uzorak 4).

Rezultati statističke analize utjecaja parametara ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet pogače pasjeg trna prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. Rezultati statističke analize utjecaja parametara ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet pogače pasjeg trna

Parametar ekstrakcije	Antioksidacijski kapacitet ($\mu\text{mol TE}/100$ g s.tv.)
Temperatura (°C)	p < 0,05*
35	$8158,18 \pm 6,02^a$
50	$8768,26 \pm 6,02^b$
65	$9045,26 \pm 6,02^c$
Snaga (%)	p < 0,05*
30	$8154,74 \pm 6,02^a$
60	$8721,66 \pm 6,02^b$
90	$9095,29 \pm 6,02^c$
Vrijeme (min)	p < 0,05*
10	$8389,14 \pm 6,02^a$
20	$8667,93 \pm 6,02^b$
30	$8914,62 \pm 6,02^c$

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 za $p \leq 0,05$.

Statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet imaju temperatura, snaga ultrazvuka i vrijeme ekstrakcije (tablica 10). Prema prikazu statističke analize vidljivo je kako je porast temperature utjecao na povećanje antioksidacijskog kapaciteta (AK) ekstrakata odnosno najniža prosječna vrijednost AK određena je u ekstraktima dobivenim pri temperaturi 35 °C ($8158,18 \pm 6,02$ $\mu\text{mol TE}/100$ g s.tv.), a najviša u ekstraktima dobivenim pri temperaturi 65 °C. Povećanje AK pri višoj temperaturi u skladu je s istraživanjem Galviz-Quezada i sur. (2021), gdje je provedena optimizacija ekstrakcije fenolnih spojeva iz plodova

biljke *Carludovica palmata* primjenom UAE te je primijećen porast AK ekstrakata određenog ORAC metodom povećanjem temperature s 30 °C na 60 °C. Sličan trend primijećen i u istraživanju Boeira i sur. (2018), primjenom UAE fenolnih spojeva iz biljke *Achyrocline satureioides*, gdje je uočeno povećanje AK ekstrakata određenog ORAC metodom povećanjem temperature s 20 °C na 40 °C odnosno 60 °C. Suprotno tome, Elshreef i sur. (2021) su utvrdili kako može doći do smanjenja AK povećanjem temperature iznad 45 °C zbog moguće oksidacije fenolnih spojeva i drugih antioksidanasa.

Statistički značajan utjecaj na AK ima i snaga ultrazvuka pri čemu je najviša prosječna vrijednost dobivena pri snazi 90 % ($9095,29 \pm 6,02 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv.}$), a najmanja pri snazi 30 % ($8154,74 \pm 6,02 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv.}$). Navedeni trend porasta AK s porastom snage ultrazvuka u skladu je s istraživanjem Galviz-Quezada i sur. (2021) gdje je dokazano kako je AK viši pri snazi ultrazvuka od 40 % u odnosu na 20 %. Također, u navedenom istraživanju je utvrđeno kako temperatura, snaga ultrazvuka i vrijeme ekstrakcije imaju statistički značajan utjecaj na AK ekstrakata. Suprotno tome, Elshreef i sur. (2021) navode kako više vrijednosti snage ultrazvuka mogu rezultirati smanjenjem AK i udjela fenolnih spojeva nakon određene optimalne vrijednosti.

Vrijeme ekstrakcije također statistički značajno ($p < 0,05$) utječe na AK pri čemu je najveća vrijednost određena nakon 30 minuta ($8914,62 \pm 6,02 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv.}$), a najniža u ekstraktima nakon ekstrakcije od 10 minuta ($8389,14 \pm 6,02 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv.}$). I u istraživanju Vu i sur. (2016) vrijeme ekstrakcije je također imalo statistički značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet kore banane određen pomoću DPPH, FRAP i CUPRAC metode te je potvrđena i korelacija udjela ukupnih fenola i antioksidacijskog kapaciteta.

4.3. OPTIMALNI UVJETI EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM POGAČE PASJEG TRNA

Za utvrđivanje kombiniranog utjecaja parametara ekstrakcije na ukupne fenole i antioksidacijski kapacitet pogače pasjeg trna korišten je puni faktorijalni dizajn te su optimalni uvjeti ekstrakcije prikazani u tablici 11.

Tablica 11. Optimalni uvjeti ekstrakcije fenola i određivanja antioksidacijskog kapaciteta pogače pasjeg trna

Optimalni uvjeti							
			Predviđeno	Dobiveno	Predviđeno	Dobiveno	poželjnost
Temperatura (°C)	Snaga (%)	Vrijeme (min)	AK* (μmol TE/100 g s.tv.)	AK* (μmol TE/100 g s.tv.)	Ukupni fenoli (mg GAE/100 g s.tv.)	Ukupni fenoli (mg GAE/100 g s.tv.)	
50	60	20	9404,85	9384,42	1998,98	1940,55	0,795787

*AK-antioksidacijski kapacitet

Prema statističkoj analizi, optimalni uvjeti ekstrakcije ukupnih fenola i određivanja antioksidacijskog kapaciteta pogače pasjeg trna su: temperatura 50 °C, snaga ultrazvuka 60 % i vrijeme ekstrakcije od 20 minuta (tablica 11). I u istraživanju Mojerlou i Elhamirad (2018) optimalna temperatura ekstrakcije ukupnih fenola primjenom UAE iz komine masline bila je 56 °C. Ista temperatura navedena je kao optimalna i u radu Ghafoor i sur. (2009) primjenom UAE ukupnih fenola iz sjemenki grožđa. U istraživanju Pham i sur. (2020) temperatura od 40 °C navedena je kao optimalna za ekstrakciju fenola primjenom UAE iz ploda biljke *Cupaniopsis anacardioides*.

U istraživanju Sharayei i sur. (2019) optimalna snaga ultrazvuka od 60 % bila je kod UAE fenolnih spojeva iz kore šipka dok u istraživanju Dobrinčić i sur. (2020) optimalna snaga ultrazvuka za ekstrakciju fenola iz lista masline primjenom UAE je bila 100 % što je više nego za pogaču pasjeg trna. Optimalna snaga ultrazvuka za ekstrakciju fenolnih spojeva iz lista lovora bila je 50 % prema istraživanju Dobrosravić i sur. (2021). Također, optimalno vrijeme ekstrakcije od 20 minuta u skladu je s istraživanjem Dobrinčić i sur. (2020). U istraživanju Tech i Birch (2014) najviši udio fenolnih spojeva u odmašćenoj pogači konoplje i uljane repice određen je pri vremenu ekstrakcije od 20 minuta, a do smanjenja udjela je došlo nakon 30 minuta. Suprotno tome, optimalno vrijeme UAE ukupnih fenola iz komine grožđa je 25 minuta prema istraživanju González-Centeno i sur. (2014). Optimalno vrijeme za ekstrakciju ukupnih fenola primjenom UAE iz ploda biljke *Cupaniopsis anacardioides* u

istraživanju Pham i sur. (2020) je 40 minuta što je značajno više nego u ovom istraživanju. Vrijeme ekstrakcije od 10 minuta navedeno je kao optimalno za ekstrakciju fenolnih spojeva iz lovora primjenom UAE u istraživanju Dobroslavić i sur. (2021) što je upola kraće nego za pogaču pasjeg trna. Vrijednost antioksidacijskog kapaciteta (9404,85 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g s.tv.}$) dobivena pri optimalnim uvjetima neznatno je niža nego u istraživanju Zheng i sur. (2017) u kojem je u ulju sjemenki pasjeg trna dobivenom ekstrakcijom pomoću superkričnog CO_2 antioksidacijski kapacitet određen ORAC metodom iznosio $8509 \pm 242 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ te je utvrđeno kako viši antioksidacijski kapacitet ima ulje sjemenki u odnosu na ulje ploda pasjeg trna. U istraživanju Galviz-Quezada i sur. (2021) utvrđeno je kako je najviši antioksidacijski kapacitet plodova biljke *Carludovica palmata* postignut primjenom UAE pri temperaturi $60 \text{ }^\circ\text{C}$, snazi ultrazvuka 40 % i vremenu ekstrakcije od 20 minuta.

4.3.1. UPLC-MS/MS određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva i vitamina C u ekstraktu pogače pasjeg trna dobivenom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije

U ekstraktu pogače pasjeg trna ekstrahiranom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije (temperatura $50 \text{ }^\circ\text{C}$, snaga ultrazvuka 60 % i vrijeme ekstrakcije 20 minuta) određeni su pojedinačni fenolni spojevi primjenom UPLC-MS/MS metode kao i udio vitamina C tj. askorbinske kiseline, a rezultati fenolnih spojeva prema skupinama prikazani su u tablici 12. Maseni udio ukupnih fenola (kao zbroj pojedinačnih fenolnih skupina) u ekstraktu iznosio je $125,02 \text{ mg}/100 \text{ g s.tv.}$ od čega je najviše flavonola ($63,70 \text{ mg}/100 \text{ g s.tv.}$), zatim hidroksibenzojevih kiselina ($43,09 \text{ mg}/100 \text{ g s.tv.}$), hidroksicimetnih kiselina ($16,58 \text{ mg}/100 \text{ g s.tv.}$) i flavona ($1,65 \text{ mg}/100 \text{ g s.tv.}$).

Identificirano je 20 flavonola pri čemu su u najvišem udjelu određeni izoramnetin-3-rutinozid ($20,59 \pm 1,10 \text{ mg}/100 \text{ g s.tv.}$), izoramnetin-3-heksozid ($9,21 \pm 0,60 \text{ mg}/100 \text{ g s.tv.}$) i rutin ($7,83 \pm 0,40 \text{ mg}/100 \text{ g s.tv.}$) dok su u najnižim udjelima određeni kvercetin-3-pentozid ($0,16 \pm 0,010 \text{ mg}/100 \text{ g s.tv.}$) i kvercetin ($0,11 \pm 0,010 \text{ mg}/100 \text{ g s.tv.}$). Iz grupe hidroksibenzojevih kiselina u najvišem udjelu je određena *p*-hidroksibenzojeva kiselina ($15,42 \pm 0,9 \text{ mg}/100 \text{ g s.tv.}$), a kafeinska kiselina ($15,36 \pm 1,10 \text{ mg}/100 \text{ g s.tv.}$) prisutna je u najvišem udjelu od detektiranih hidroksicimetnih kiselina. Od detektiranih flavona u najvišem udjelu u ekstraktu pogače pasjeg trna određen je luteolin ($1,03 \pm 0,05 \text{ mg}/100 \text{ g s.tv.}$).

Tablica 12. Maseni udjeli (mg/100 g s.tv.) pojedinačnih fenolnih spojeva i vitamina C u pogači pasjeg trna ekstrahiranoj pri optimalnim uvjetima UAE određeni primjenom UPLC-MS/MS metode

Naziv spoja	Maseni udio (mg/100 g s.tv.)
FLAVONOLI	
Izoramnetin-3-sinapoilglukozid-glukozid-7-ramnozid	0,20 ± 0,005
Izoramnetin-3-soforozid-7-ramnozid	0,45 ± 0,02
Izoramnetin-3-rutinozid-7-glukozid	0,50 ± 0,03
Kvercetin-3-soforozid-7-ramnozid	1,40 ± 0,10
Kvercetin-3-ramnoglukozid-7-ramnozid	0,30 ± 0,01
Kamferol-soforozid-ramnozid	0,91 ± 0,08
Izoramnetin-3,7-diheksozid	0,34 ± 0,02
Izoramnetin-3-rutinozid	20,59 ± 1,10
Rutin*	7,83 ± 0,40
Kamferol-3-rutinozid*	0,81 ± 0,05
Izoramnetin-3-heksozid	9,21 ± 0,60
Kvercetin-3-glukozid*	4,29 ± 0,23
Izoramnetin-3-ramnozid	3,11 ± 0,13
Kamferol-heksozid-ramnozid	0,36 ± 0,015
Kvercetin-3-ramnozid	0,48 ± 0,025
Kvercetin-3-pentozid	0,16 ± 0,010
Kamferol-ramnozid	6,26 ± 0,25
Izoramnetin	0,70 ± 0,04
Kvercetin	0,11 ± 0,010
Kamferol	5,69 ± 0,27
Ukupni flavonoli	63,70
FLAVONI	
Luteolin*	1,03 ± 0,05
Apigenin*	0,62 ± 0,04
Ukupni flavoni	1,65

* Identifikacija je potvrđena korištenjem autentičnih standarda.

Tablica 12. Maseni udjeli (mg/100 g s.tv.) pojedinačnih fenolnih spojeva i vitamina C u pogači pasjeg trna ekstrahiranoj pri optimalnim uvjetima UAE određeni primjenom UPLC-MS/MS metode-*nastavak*

HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE	
Vanilinska kiselina*	7,67 ± 0,35
Elaginska kiselina heksozid	0,65 ± 0,030
Galna kiselina*	14,20 ± 1,20
<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina	15,42 ± 0,9
Siringinska kiselina*	3,19 ± 0,25
Protokatehinska kiselina	1,96 ± 0,05
Ukupne hidroksibenzojeve kiseline	43,09
HIDROKSICIMETNE KISELINE	
Kafeinska kiselina*	15,36 ± 1,10
Klorogenska kiselina*	0,22 ± 0,010
<i>p</i> -kumarinska kiselina*	0,08 ± 0,002
Ferulična kiselina*	0,37 ± 0,020
Cinamična kiselina*	0,55 ± 0,03
Ukupne hidroksicimetne kiseline	16,58
Ukupno fenolnih spojeva	125,02
VITAMINI	
Askorbinska kiselina*	674,58 ± 20,50

* Identifikacija je potvrđena korištenjem autentičnih standarda.

Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Ciesarová i sur. (2020) u kojem je navedeno kako su u plodovima pasjeg trna dominantni upravo flavonoli tj. glikozidi izoramnetina. Rezultati su također u skladu s istraživanjem Pfeifer (2021) gdje je u ekstraktima bobica pasjeg trna primjenom 96 %-tnog etanola kao ekstrakcijskog otapala određeno 71,36 mg/100 g s.tv. flavonola, a dominantni flavonoli bili su rutin (17,72 ± 0,98 mg/100 g s.tv.) i kamferol (33,45 ± 1,01 mg/100 g s.tv.) za razliku od pogače pasjeg trna u kojoj su dominantni izoramnetin-3-rutinozid i izoramnetin-3-heksozid. Najveći udio izoramnetin-3-heksozida (27,76-45,16 mg/100 g s.tv.) također je određen u plodovima pasjeg trna nakon primjene UAE uz aceton kao ekstrakcijsko otapalo u istraživanju Čulina i sur. (2021). Udio ukupnih hidroksibenzojevih kiselina (43,09 mg/100 g s.tv.) je u skladu s

istraživanjem Pfeifer (2021) gdje je maseni udio hidroksibenzojevih kiselina iznosio 45,54 mg/100 g s.tv. Međutim, u ekstraktima bobica pasjeg trna dominantne su bile vanilinska i protokatehinska kiselina, a u ovom istraživanju, u pogači pasjeg trna *p*-hidroksibenzojeva, kafeinska i galna kiselina. Udio hidroksicimetnih kiselina (16,58 mg/100 g s.tv.) nešto je viši nego u ekstraktima bobica pasjeg trna (11,38 mg/100 g s.tv.). U ekstraktu pogače udio flavona iznosio je 1,65 mg/100 g s.tv., te su identificirani luteolin i apigenin, a u bobicama maseni udio flavona odnosno luteolina iznosio je $4,91 \pm 0,21$ mg/100 g s.tv. (Pfeifer, 2021). Prema istraživanju Teleszko i sur. (2015), udio flavonola u bobicama pasjeg trna određen LC-MS metodom bio je u rasponu od 212,89 do 407,48 mg/100 g što je značajno više nego u pogači pasjeg trna. U navedenom istraživanju detektirano je 11 flavonola odnosno derivati izoramnetina, kvercetina i kamferola. Udio fenolnih kiselina u jednoj od istraživanih sorti iznosio je 5,81 mg/100 g dok je udio flavanola 88,04 mg/100 g (Teleszko i sur., 2015). Slično navedenom, u istraživanju Pop i sur. (2013) udio ukupnih flavonola u plodovima pasjeg trna iznosio je 563-1437 mg/100 g s.tv. izraženo kao ekvivalent rutina što je značajno više nego u provedenom istraživanju. Pogača je nusproizvod proizvodnje ulja pasjeg trna i moguća je degradacija bioaktivnih spojeva pa tako i flavonola čiji se udio smanjuje u odnosu na plodove pasjeg trna. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Zardo i sur. (2020) u kojem je navedeno kako visoka temperatura može utjecati na degradaciju fenolnih spojeva pogače uljane repice. Najviši udio flavonola u istraživanju Pop i sur. (2013) određen je u sorti *Serpenta*, a primjenom UHPLC/PDA–ESI/MS metode dokazana je prisutnost izoramnetina i derivata izoramnetina (izoramnetin-3-heksozid, izoramnetin-3-ramnozid, izoramnetin-3,7-dihexozid, izoramnetin-3-rutinozid, izoramnetin-3-rutinozid-7-glukozid, izoramnetin-3-soforozid-7-ramnozid), kvercetina i njegovih derivata (kvercetin-3-soforozid-7-ramnozid) kao i rutina. Navedeni spojevi određeni su i u ekstraktu pogače pasjeg trna u ovom istraživanju. Ipak, dominantan spoj u plodovima pasjeg trna je izoramnetin-3-neohesperidozid, a identificirani su i izoramnetin-3-glukozid-7-ramnozid, kvercetin-3-heksozid, kvercetin-3-ramnozilglukozid koji nisu prisutni u pogači. U navedenom istraživanju je utvrđeno i kako su dominantni spojevi derivati izoramnetina čiji je udio šest puta veći nego derivata kvercetina te kako derivati flavonola mogu biti biomarkeri za utvrđivanje različitih sorti pasjeg trna (Pop i sur., 2013).

U istraživanju Terpinč i sur. (2012) u pogači sjetvenog podlanka (*Camelina sativa* L.) primjenom LC-MS metode dokazana je prisutnost rutina, katehina, kvercetina i kvercetin-3-*O*-glukozida. Navedeni spojevi prisutni su i u pogači pasjeg trna uz izuzetak katehina.

Udio vitamina C u ekstraktu iznosio je $674,58 \pm 20,50$ mg/100 g s.tv. Prisutnost vitamina C u visokom udjelu u skladu je s literaturnim podacima pri čemu koncentracija vitamina C u pasjem trnu u odnosu na drugo voće i povrće može biti čak 5-100 puta viša, ovisno o sorti (Ciesarová i sur., 2020). Prema istraživanju Wojdyło i sur. (2013) udio vitamina C u crnom ribizu je 132,9-212,92 mg/100 g s.tv., a u crvenom ribizu 46,64 mg/100 g s.tv. Iz navedenih rezultata je vidljivo kako pogača pasjeg trna sadrži značajno viši udio vitamina C, a crveni i crni ribiz su navedeni kao voće bogato navedenim vitaminom. Mogući razlog visokog udjela vitamina C u pogači pasjeg trna je nedostatak enzima oksidaze askorbinske kiseline u plodovima pasjeg trna koji katalizira reakciju oksidacije L-askorbinske kiseline u L-dehidroaskorbinsku kiselinu. Time je osiguran visok udio vitamina C u osušenim bobicama, ali i drugim proizvodima pasjeg trna poput raznih vrsta sokova (Ciesarová i sur., 2020).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i rasprave, može se zaključiti sljedeće:

1. Maseni udio ukupnih fenola u ekstraktima pogače pasjeg trna određen spektrofotometrijski bio je u rasponu od 983,56 do 1998,98 mg GAE/100 g s.tv., a antioksidacijski kapacitet određen ORAC metodom od 6000,12 do 9485,00 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g s.tv.}$
2. Ispitivani parametri ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (temperatura, snaga ultrazvuka i vrijeme ekstrakcije) imaju statistički značajan utjecaj na udio ukupnih fenola i antioksidacijski kapacitet pogače pasjeg trna.
3. Najviši udio ukupnih fenola te antioksidacijski kapacitet određeni su pri ekstrakcijskim uvjetima temperature 50 °C, snage ultrazvuka 60 % i vremenu od 20 minuta.
4. Primjenom UPLC-MS/MS metode u ekstraktu dobivenom pri optimalnim uvjetima određeni su u padajućem nizu flavonoli (63,70 mg/100 g s.tv.), hidroksibenzojeve (43,09 mg/100 g s.tv.) i hidroksicimetne kiseline (16,58 mg/100 g s.tv.) te flavoni (1,65 mg/100 g s.tv.)
5. Najzastupljeniji flavonoli u ekstraktu pogače pasjeg trna bili su izoramnetin-3-rutinozid, izoramnetin-3-heksozid i rutin, iz grupe hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina *p*-hidroksibenzojeva i kafeinska kiselina te luteolin kao najzastupljeniji flavon.
6. UAE je učinkovita metoda za ekstrakciju fenolnih spojeva i vitamina C iz pogače pasjeg trna.

6. LITERATURA

Abubakar AR, Haque M (2020) Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *J Pharm Bioallied Sci* **12(1)**, 1 – 10.

https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19

Al-Dhabi NA, Ponmurugan K, Jeganathan PM (2017) Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrason Sonochem* **34**, 206 – 213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.05.005>

Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M, Güçlü K (2013) Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* **85(5)**, 957 – 998. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>

Atole DM, Rajput HH (2018) Ultraviolet spectroscopy and its pharmaceutical applications-a brief review. *Asian J Pharm Clin Res* **11(2)**, 59 – 66. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i2.21361>

Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, i sur. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng* **117**, 426 – 436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

Azwanida NN (2015) A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants* **4(3)**, 196. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>

Bal LM, Meda V, Naik SN, Satya S (2011) Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmoceuticals. *Food Res Int* **44(7)**, 1718 – 1727. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.002>

Boeira CP, Piovesan N, Soquetta MB, Flores DCB, Lucas BN, Barin JS, i sur. (2018) Ultrasonic assisted extraction to obtain bioactive, antioxidant and antimicrobial compounds from marcela. *Ciênc Rural* **48(6)**, 1 – 6. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170772>

Ciesarová Z, Murkovic M, Cejpek K, Kreps F, Tobolková B, Koplík R, i sur. (2020) Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) so exceptional? A review. *Food Res Int* **133**, 109170. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109170>

Čulina P, Cvitković D, Pfeifer D, Zorić Z, Repajić M, Elez Garofulić I, i sur. (2021) Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Selected Medicinal and Aromatic Plants: Diversity upon Plant Species and Extraction Technique. *Processes* **9(12)**, 2207. <https://doi.org/10.3390/pr9122207>

D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità* **43(4)**, 348 – 361.

Dobrinčić A, Repajić M, Garofulić Elez I, Tuđen L, Dragović-Uzelac V, Levaj B (2020) Comparison of Different Extraction Methods for the Recovery of Olive Leaves Polyphenols. *Processes* **8(9)**, 1008. <https://doi.org/10.3390/pr8091008>

Dobrosravić E, Elez Garofulić I, Zorić Z, Pedisić S, Dragović-Uzelac V (2021) Polyphenolic Characterization and Antioxidant Capacity of *Laurus nobilis* L. Leaf Extracts Obtained by Green and Conventional Extraction Techniques. *Processes* **9(10)**, 1840. <https://doi.org/10.3390/pr9101840>

Dong K, Binosh Fernando WM, Durham R, Stockmann R, Jayasena V (2021) Nutritional value, health-promoting benefits and food application of sea buckthorn. *Food Rev Int* **37**, 1 – 16. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1943429>

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

Dzah CS, Duan Y, Zhang H, Wen C, Zhang J, Chen G, i sur. (2020) The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Biosci* **35**, 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>

Elez Garofulić I, 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**(11), 2782 – 2789. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14368>

Elshreef HS, Mirghani MES, Sulaiman S, Jami MS (2021) A review of the effect of UAE optimization parameters on antioxidant activity. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* **765**(1), 012109. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/765/1/012109>

Erdman JW, Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, i sur. (2007) Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC. *J Nutr* **137**(3), 718 – 737. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.718s>

Franjić J, Horvat G, Krstonošić D (2016) Novo nalazište i sintaksonomske značajke pasjega trna (*Hippophaë rhamnoides* L., *Elaeagnaceae*) u Hrvatskoj. *Sumar list* **140**, 111 – 116. <https://doi.org/10.31298/sl.140.3-4.1>

Galviz-Quezada A, Ochoa-Aristizábal AM, Arias Zabala ME, Ochoa S, Osorio-Tobón JF (2021) Obtaining phenolic compounds from iraca waste (*Carludovica palmata* Ruiz & Pav) through ultrasound-assisted extraction. *Biomass Convers Biorefin* **11**, 1 – 12. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01490-1>

Ghafoor K, Choi YH, Jeon JY, Jo IH (2009) Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. *J Agr Food Chem* **57**(11), 4988 – 4994. <https://doi.org/10.1021/jf9001439>

González-Centeno MR, Knoerzer K, Sabarez H, Simal S, Rosselló C, Femenia A (2014) Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.)—a response surface approach. *Ultrason Sonochem* **21**(6), 2176 – 2184. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.021>

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

Halliwell B (1990) How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Res Com* **9(1)**, 1 – 32. <https://doi.org/10.3109/10715769009148569>

Harris DC (2010) Quantitative Chemical Analysis, 8.izd., W.H. Freeman and Company, New York, SAD, str. 502 – 529.

Horvat AJM (2015) O nazivima spektrometrija i spektroskopija. *Kem Ind* **64**, 530 – 531.

Ignat I, Volf I, Popa VI (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* **126(4)**, 1821 – 1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>

Ivanova GV, Nikulina EO, Kolman OY, Ivanova AN (2019) Products of sea-buckthorn berries processing in parapharmaceutical production. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* **315**, 052020. <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/315/5/052020>

Jaśniewska A, Diowksz A (2021) Wide Spectrum of Active Compounds in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) for Disease Prevention and Food Production. *Antioxidants* **10(8)**, 1279. <https://doi.org/10.3390/antiox10081279>

Khan BA, Akhtar N, Mahmood T (2010) A Comprehensive Review of a Magic Plant, *Hippophae rhamnoides*. *Pharmacogn J* **2(16)**, 65 – 68. [https://doi.org/10.1016/S0975-3575\(10\)80053-7](https://doi.org/10.1016/S0975-3575(10)80053-7)

Krejcarová J, Straková E, Suchý P, Herzig I, Karásková K (2015) Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) as a potential source of nutraceuticals and its therapeutic possibilities-a review. *Acta Vet Brno* **84(3)**, 257 – 268. <https://doi.org/10.2754/avb201584030257>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>

Lovrić T (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Hinus, Zagreb, str. 262 – 264.

Mandal SC, Mandal V, Das AK (2015) Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications, Academic Press, London, str. 101 – 110.

Mojerlou Z, Elhamirad A (2018) Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of phenolic compounds from olive cake. *J Food Sci Technol* **55(3)**, 977 – 984. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-3005-x>

Mokrani A, Madani K (2016) Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Sep Purif Technol* **162**, 68 – 76. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.043>

Nikolić T, Topić J (2005) Crvena knjiga vaskularne flore Hrvatske, Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, str. 99 – 101.

Nimse SB, Pal D (2015) Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv* **5(35)**, 27986 – 28006. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>

Patel CA, Divakar K, Santani D, Solanki HK, Thakkar JH (2012) Remedial prospective of *Hippophae rhamnoides* Linn. (Sea Buckthorn). *Int Sch Res Notices* **2012**, 1 – 6. <https://doi.org/10.5402/2012/436857>

Pavlović N, Valek Lendić K, Miškulin M, Moslavac T, Jokić S (2016) Supercritical CO₂ Extraction of Sea Buckthorn. *Hrana u zdravlju i bolesti* **5(2)**, 55 – 61.

Penner MH (2017) Ultraviolet, Visible, and Fluorescence Spectroscopy. U: Nielsen S (ured.) Food Analysis. Food Science Text Series, Springer, New York, str. 89 – 106.

Pfeifer D (2021) Identifikacija i kvantifikacija biološki aktivnih spojeva odabranog mediteranskog bilja (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Pham NMQ, Vuong QV, Bowyer MC, Scarlett CJ (2020) Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic compounds and antioxidant capacity from Tuckeroo (*Cupaniopsis anacardioides*) fruit. *Separ Sci Technol* **55**, 3151 – 3160. <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1673413>

Pisoschi AM, Negulescu GP (2011) Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem Anal Biochem* **1(1)**, 106. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>

Pitt JJ (2009) Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev* **30(1)**, 19 – 34.

Poole CF (2003) *The Essence of Chromatography*, 1. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 2 – 12.

Pop RM, Socaciu C, Pinteana A, Buzoianu AD, Sanders MG, Gruppen H, i sur. (2013) UHPLC/PDA-ESI/MS Analysis of the Main Berry and Leaf Flavonol Glycosides from Different Carpathian *Hippophaë rhamnoides* L. Varieties. *Phytochem Analysis* **24(5)**, 484 – 492. <https://doi.org/10.1002/pca.2460>

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

Rafalska A, Abramowicz K, Krauze M (2017) Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) as a plant for universal application. *World Sci News* **72**, 123 – 140.

Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem* **66**, 401 – 436. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00093-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00093-X)

Sharayei P, Azarpazhooh E, Zomorodi S, Ramaswamy HS (2019) Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *Lwt-Food Sci Technol* **101**, 342 – 350. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.031>

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

Suryakumar G, Gupta A (2011) Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J Ethnopharmacol* **138(2)**, 268 – 278. <https://doi:10.1016/j.jep.2011.09.024>

Taleuzzaman M, Ali S, Gilani SJ, Imam SS, Hafeez A (2015) Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) – A Review. *Austin J Anal Pharm Chem* **2(6)**, 1056.

Teh SS, Birch EJ (2014) Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. *Ultrason Sonochem* **21(1)**, 346 – 353. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.08.002>

Teleszko M, Wojdyło A, Rudzińska M, Oszmiański J, Golis T (2015) Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Bioactive Compounds Content in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Berries. *J Agr Food Chem* **63(16)**, 4120 – 4129. <https://doi:10.1021/acs.jafc.5b00564>

Terechuk L, Starovoytova K, Ivanova S, Sergeeva I (2019) Obtaining functional products from sea buckthorn berries. *Atlantis* **298**, 407 – 411. <https://doi.org/10.2991/essd-19.2019.90>

Terpinc P, Polak T, Makuc D, Ulrih NP, Abramovič H (2012) The occurrence and characterisation of phenolic compounds in *Camelina sativa* seed, cake and oil. *Food Chem* **131(2)**, 580 – 589. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.033>

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>

Vu HT, Scarlett CJ, Vuong QV (2016) Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity from banana (*Musa cavendish*) peel. *J Food Process Pres* **41(5)**, 13148. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13148>

Wang L, Weller CL (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Tech* **17(6)**, 300 – 312. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>

Wojdyło A, Oszmianski J, Milczarek M, Wietrzyk J (2013) Phenolic profile, antioxidant and antiproliferative activity of black and red currants (*Ribes* spp.) from organic and conventional cultivation. *Int J Food Sci Technol* **48(4)**, 715 – 726. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12019>

Yang B, Jiang Y, Shi J, Chen F, Ashraf M (2011) Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit - A review. *Food Res Int* **44(7)**, 1837 – 1842. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.019>

Yogendra Kumar MS, Tirpude RJ, Maheshwari DT, Bansal A, Misra K (2013) Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves in vitro. *Food Chem* **141**, 3443 – 3450. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.057>

Zakynthinos G, Varzakas T (2015) Hippophae rhamnoides: safety and nutrition. *Curr Res Nutr Food Sci* **3(2)**, 89 – 97. <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.3.2.01>

Zaporozhskaya SP, Kasyanov GI, Kosenko OV, Jum, TA, Ksenz MV, Kucherova SI (2021) Technology and commodity characteristics of extracts and oil cake for food enrichment. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* **640**, 042017. <https://doi:10.1088/1755-1315/640/4/042017>

Zardo I, de Espíndola Sobczyk A, Marczak LDF, Sarkis J (2019) Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sunflower Seed Cake Using Response Surface Methodology. *Waste Biomass Valori* **10(1)**, 33 – 44. <https://doi:10.1007/s12649-017-0038-3>

Zardo I, Rodrigues NP, Sarkis JR, Marczak LDF (2020) Extraction and identification by mass spectrometry of phenolic compounds from canola seed cake. *J Sci Food Agr* **100(2)**, 578 – 586. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10051>

Zhang W, Zhao J, Wang J, Pang X, Zhuang X, Zhu X, i sur. (2010) Hypoglycemic effect of aqueous extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed residues in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* **24(2)**, 228 – 232. <https://doi.org/10.1002/ptr.2917>

Zheng L, Shi LK, Zhao CW, Jin QZ, Wang XG (2017) Fatty acid, phytochemical, oxidative stability and in vitro antioxidant property of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) oils extracted by supercritical and subcritical technologies. *Lwt-Food Sci Technol* **86**, 507 – 513. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.042>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Petra Jukić

Vlastoručni potpis