

Validacija metode za određivanje tokoferola u ulju pasjeg trna

Knezović, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:339747>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2023.

Nikolina Knezović

**VALIDACIJA METODE ZA
ODREĐIVANJE TOKOFEROLA U
ULJU PASJEG TRNA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Zorana Zorića, te uz pomoć Patricije Čulina, 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

Iskreno zahvaljujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Zoranu Zoriću na ukazanom povjerenju, susretljivosti te uloženom vremenu i strpljenju. Od srca zahvaljujem Patriciji Čulini, mag. ing. techn. aliment. na svoj pruženoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela, izvedbe istraživanja te obrađivanja rezultata.

Najveće hvala mojim roditeljima i sestri na pomoći i osloncu koji su mi pružali tijekom studiranja. Također, zahvaljujem se svojem malom krugu velikih ljudi, svojim prijateljima, koji su bili uz mene te mi pružali podršku.

Josipu, hvala na beskrajnom strpljenju, osloncu i motivaciji, što jesi moja najveća podrška i što si vjerovao u mene.

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

VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE TOKOFEROLA U ULJU PASJEG TRNA

Nikolina Knezović, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058212673

Sažetak: Pasji trn (*Hippophae rhamnoides* L.) listopadna je grmolika biljka koja sadrži plod narančasto-crvene boje. Od ploda pasjeg trna proizvodi se ulje koje sadrži brojne bioaktivne komponente, kao što su karotenoidi i tokoferoli, koji su izrazito značajni s obzirom da pokazuju pozitivan utjecaj na zdravlje. Cilj ove preliminarne studije bio je validacija HPLC metode za određivanje tokoferola u ulju pasjeg trna, pri čemu su ispitani sljedeći parametri: selektivnost, točnost, preciznost, linearnost te granice detekcije i kvantifikacije. Dobivene vrijednosti za preciznost i točnost te granice detekcije i kvantifikacije pokazale su prikladnost razvijene HPLC metode za određivanje tokoferola. HPLC metodom u ulju pasjeg trna detektiran je jedino α -tokoferol. Rezultati statističke analize pokazali su da ulje sorte *Leikora* sadrži viši udio α -tokoferola, dok ulje sorte *Ascola* pokazuje veću antioksidacijsku aktivnost. Ekstrakcija superkritičnim CO₂ pokazala je bolje rezultate u odnosu na Soxhlet ekstrakciju.

Ključne riječi: *validacija, visoko učinkovita tekućinska kromatografija, tokoferoli, ulje pasjeg trna, antioksidacijski kapacitet*

Rad sadrži: 52 stranice, 16 slika, 14 tablica, 69 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Zoran Zorić

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

- | | |
|-----------------------------------|------------------|
| 1. doc. dr. sc. Marko Obranović | (predsjednik) |
| 2. izv. prof. dr. sc. Zoran Zorić | (mentor) |
| 3. doc. dr. sc. Maja Repajić | (član) |
| 4. doc. dr. sc. Sandra Pedisić | (zamjenski član) |

Datum obrane: 28. travnja 2023.

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

VALIDATION OF METHOD FOR THE DETERMINATION OF TOCOPHEROLS IN SEA BUCKTHORN OIL

Nikolina Knezović, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058212673

Abstract: Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) is a deciduous bushy plant with an orange-red fruit. Sea buckthorn oil contains numerous bioactive components, like carotenoids and tocopherols, which are extremely important because they show a positive impact on health. The aim of this preliminary study was to validate the HPLC method for the determination of tocopherols in sea buckthorn oil, where the following parameters were tested: selectivity, accuracy, precision, linearity and limits of detection and quantification. The obtained values for precision and accuracy, as well as detection and quantification limits showed the suitability of the developed HPLC method for the determination of tocopherols. Only α -tocopherol was detected in sea buckthorn oil by the HPLC method. The results of the statistical analysis showed that the oil of the *Leikora* variety contains a higher content of α -tocopherol, while the oil of the *Ascola* variety shows a higher antioxidant activity. Supercritical CO₂ extraction showed better results when compared to Soxhlet extraction.

Keywords: *validation, high performance liquid chromatography, tocopherols, sea buckthorn oil, antioxidant capacity*

Thesis contains: 52 pages, 16 figures, 14 tables, 69 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Zoran Zorić, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Patricija Čulina, MSc

Reviewers:

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

Thesis defended: April 28th, 2023

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	TEORIJSKI DIO	2
2.1	PASJI TRN (<i>Hippophae rhamnoides</i> L.)	2
2.1.1	Osnovne karakteristike i kemijski sastav biljke	2
2.1.2	Ulje pasjeg trna.....	5
2.1.3	Tokoferoli.....	7
2.2	VISOKO UČINKOVITA TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA	8
2.2.1	Osnovna načela visoko učinkovite tekućinske kromatografije	8
2.2.2	Fluorescentni detektori	10
2.3	VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA	10
2.3.1	Specifičnost i selektivnost metode	12
2.3.2	Točnost metode	12
2.3.3	Preciznost metode	13
2.3.4	Linearnost metode	13
2.3.5	Granica detekcije i granica kvantifikacije	14
2.3.6	Robusnost metode	15
2.4	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA ORAC METODOM .	16
3	EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1	MATERIJALI.....	17
3.1.1	Uzorci	17
3.1.2	Standardi.....	17
3.1.3	Kemikalije	17
3.1.4	Pribor.....	18
3.1.5	Aparatura.....	19
3.2	METODE.....	20
3.2.1	Ekstrakcija tokoferola	20
3.2.2	Priprema otopine standarda	20
3.2.3	Određivanje tokoferola primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije uz fluorescentnu detekciju (HPLC/FD).....	21
3.2.4	Postupak validacije metode	22
3.2.5	Određivanje antioksidacijskog kapaciteta lipofilnom ORAC metodom.....	23
3.2.6	Statistička obrada rezultata.....	24
4	REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1	SELEKTIVNOST METODE	25
4.2	TOČNOST METODE	29

4.3	PRECIZNOST METODE	30
4.4	ANALITIČKA SVOJSTVA METODE	34
4.4.1	Linearnost metode, granica detekcije i granica kvantifikacije	34
4.5	IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA TOKOFEROLA U UZORCIMA ULJA PASJEG TRNA	37
4.6	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA LIPOFILNOM ORAC METODOM	40
4.7	UTJECAJ SORTE I NAČINA EKSTRAKCIJE NA MASENI UDIO α - TOKOFEROLA I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ULJA BOBICA PASJEG TRNA	41
5	ZAKLJUČCI	44
6	LITERATURA	45

1 UVOD

Sposobnost pružanja pravovremenih, točnih i pouzdanih podataka predstavlja ključnu ulogu analitičara, a posebno je bitna kod otkrivanja, razvoja i proizvodnje lijekova i prehrambenih proizvoda. Razvoj i validacija metode imaju izravan utjecaj na kvalitetu dobivenih rezultata, stoga korištene analitičke metode trebaju biti validirane kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Validacija metode je proces dokazivanja da je analitička metoda prihvatljiva za svoju namjenu. Tijekom provođenja procesa validacije, potrebno je definirati svrhu metode, odrediti parametre validacije te kriterije prihvatljivosti za tražene parametre. Zatim slijedi postupak analize, obrade podataka te usporedba dobivenih rezultata s postavljenim kriterijima.

Bobice pasjeg trna, listopadnog otpornog grma, predstavljaju izvrstan izvor funkcionalnih sastojaka kao što su askorbinska kiselina, tokoferoli, nezasićene masne kiseline i karotenoidi. Na temelju bogatog kemijskog sastava, pasji trn pokazuje pozitivne učinke na zdravlje, uključujući smanjenje razine kolesterola u plazmi, inhibiciju agregacije trombocita i regulacije imunološke funkcije te se koristi za liječenje opekline, oralnih upala, želučanih ulkusa i slično. Sukladno tome, svakodnevno raste interes za korištenje ulja pasjeg trna u medicinske i kozmetičke svrhe, kao i u funkcionalnoj hrani. Iako su mnoge komponente bobica pasjeg trna, poput vitamina C, organskih kiselina, nezasićenih masnih kiselina, karotenoida i fitosterola opsežno proučavani, objavljeni podaci o tokoferolima još uvijek su dosta raznoliki i nepouzdana. Na temelju navedenog, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdio sastav tokoferola u ulju pasjeg trna različitog podrijetla te je potrebno razviti metodu kojom će se točno identificirati i kvantificirati.

Cilj ove preliminarne studije je bio validacija HPLC metode za određivanje tokoferola u ulju pasjeg trna, pri čemu su se definirali uvjeti za razvoj analitičke metode koja rezultira točnim i preciznim rezultatima te koja je lako primjenjiva i jeftina. Za postupak validacije ispitali su se ključni parametri metode, i to: selektivnost, točnost, preciznost, linearnost te granice detekcije i kvantifikacije. Dobivenim rezultatima potvrdit će se jesu li zadovoljeni ključni parametri validacije te je li metoda prihvatljiva za njenu namijenjenu svrhu.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 PASJI TRN (*Hippophae rhamnoides* L.)

2.1.1 Osnovne karakteristike i kemijski sastav biljke

Pasji trn (*Hippophae rhamnoides* L.) listopadna je grmolika biljna vrsta iz obitelji *Elaeagnaceae*, koja raste i do 7 m visine (Wang i sur., 2014). Biljka je također poznata i kao vučji trn (zlolesina) te se često zamjenjuje s krkavinom iz porodice *Rhamnaceae*. Pasji trn raste u Europi, Kavkazu, Maloj i Srednjoj Aziji, Sibiru, Kini i Tibetu te predstavlja najčešću vrstu u obitelji *Hippophae*, koje rastu od atlantske obale Europe do sjeverozapadne Mongolije i Kine. U zapadnoj Europi pasji trn ograničen je na područja planinskih padina, dina te pješćanih litica uz more. S druge strane, u Srednjoj Aziji je rasprostranjen u suhim i pjeskovitim područjima, često kao subalpski grm (Fu i sur., 2014). U tablici 1 prikazana je sažeta taksonomska klasifikacija *H. rhamnoides* L. (Khan i sur., 2010). Prema podacima Globalne ustanove za informacije o bioraznolikosti (engl. *The Global Biodiversity Information Facility*, GBIF) Euroazija predstavlja žarišnu točku rasprostranjenosti pasjeg trna, ali je posljednjih godina zabilježen značajan pad u populaciji biljke, kao i broju zemalja u kojima se nalazi (GBIF, 2022).

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

Carstvo	Plantae
Podcarstvo	Tracheobionta
Odjel	Magnoliophyta
Razred	Magnoliopsida
Podrazred	<i>Rosidae</i>
Red	<i>Rhamnales</i>
Porodica	<i>Elaeagnaceae</i>
Rod	<i>Hippophae</i>
Vrsta	<i>rhamnoides</i>

Pasji trn posjeduje glatku ili ponekad ispucalu koru, a listovi su mu naizmjenično raspoređeni, uski i lancetasti, prekriveni srebrnastim dlačicama odozdo i dužine 2 do 6 cm (Wu i sur., 2007). Cvjetovi su anemofilni, zelenkastožuti i sadrže svijetlonarančasti, kuglasti i elipsoidni plod (Gruendwald i sur., 2007). Plodovi pasjeg trna su sočne bobice koje sadrže

mesnatu pulpu te se sastoje od sjemenki koje su obavijene mekim tkivom. Sjemenke unutar bobica su 2,8 do 4,2 mm duge, smeđe, ovalnog oblika te sjajne površine (Michel i sur., 2012). Na slici 1 prikazani su dijelovi biljke pasjeg trna.



Slika 1. Dijelovi biljke pasjeg trna (prema Anonymous 1, 2022)

Biljka je izuzetno otporna na visoke temperature do 45 °C te može preživjeti i u uvjetima visoke razine slanosti i suše (Khan i sur., 2010). Razmnožava se vegetativno i spolno, i to u vlažnim klizištima, šljunku, riječnim obalama i na sunčanoj strani strmih padina. Najlakši način razmnožavanja vrši se sjemenkama, dok se vegetativno razmnožava ukorjenjivanjem reznica četinara, tvrdog drva ili reznica korijena i izdanaka (Schroeder, 2017).

Nadalje, svi dijelovi pasjeg trna sadrže obilje hranjivih tvari i mnoge bioaktivne spojeve, pri čemu predstavljaju bogat izvor prirodnih antioksidansa poput askorbinske kiseline, karotenoida, flavonoida i sadrže značajnu količinu bjelančevina, vitamina, minerala, lipida i fitosterola. Međutim, bitno je istaknuti kako kemijski sastav varira ovisno o podrijetlu, klimi, ali i načinu ekstrakcije (Zeb, 2004).

Crvene, žute ili narančaste bobice izrazito su cijenjene, s obzirom da predstavljaju bogati izvor flavonoida, karotenoida (lutein, β -karoten, zeaksantin i likopen), vitamina (C i E), organskih kiselina te mikro i makro nutrijenata (Kallio i sur., 2002). Koncentracija vitamina C kod pasjeg trna određena je u rasponu od 28 do 2500 mg/100 g bobica, ovisno o

raznim podvrstama *H. rhamnoides*. Osim podvrste, bitni čimbenici koji utječu na koncentraciju vitamina C su i temperatura, vrijeme berbe, porijeklo, kao i metoda obrade. Pasji trn, uz vitamin C, sadrži i određenu koncentraciju vitamina A, vitamina B1 i B2 te vitamina K (Zeb, 2004). Nadalje, sjemenke i bobice sadrže i značajne koncentracije vitamina E. Koncentracije tokoferola i tokotrienola kreću se od 100 do 300 mg/1000 g u sjemenkama i 110-150 mg/1000 g bobica (Yang i Kallio, 2002). Bobice su žuto narančaste boje zbog prisutnosti karotenoida, koji su kvantificirani u 1 do 10 puta višim koncentracijama nego u sjemenkama (Yang, 2001). Nadalje, bobice sadrže i mnoge važne mineralne elemente, poput željeza, kalcija, fosfora i posebno kalija koji je u pulpi pasjeg trna određen u masenim udjelima 10-15 mg/kg, a u sjemenkama 9-13 mg/kg (Dhyani i sur., 2007). Raspodjela masnih kiselina u mezokarpu i sjemenkama se razlikuje. Masne kiseline koje su određene u najvišim koncentracijama su palmitoleinska, palmitinska, linolna i oleinska kiselina (Cakir, 2004). Zbog prisutnosti velikog broja hlapljivih spojeva, poput etil oleata, etil oktanoata i etil dekanoata, bobice pasjeg trna imaju izrazito specifičnu aromu koja se ne može usporediti ni s jednom drugom prisutnom aromom u nekom voću (Kumar i sur., 2011). S obzirom na vrlo veliku količinu prirodnih antioksidansa prisutnih u bobicama, pasji trn pokazuje jedan od najvećih antioksidativnih potencijala u odnosu na ostale ljekovite biljke (Bal i sur., 2011), a općenito, sastav bobica pasjeg trna prikazan je u tablici 2 (Lõugas, 2006).

Tablica 2. Kemijski sastav bobica pasjeg trna (prema Lõugas, 2006)

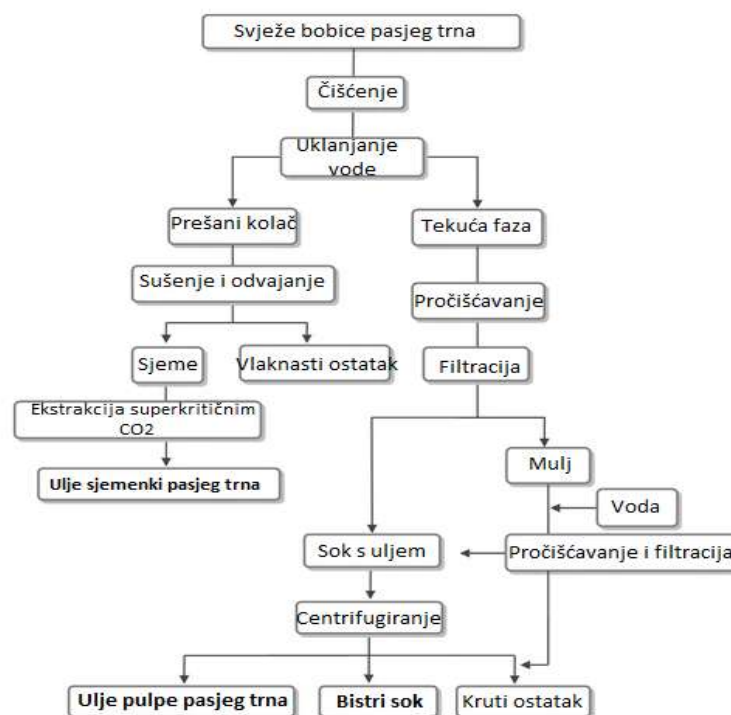
SASTOJCI	KOLIČINA	SASTOJCI	KOLIČINA
Ulje	3-15 %	Steroli	do 2 %
Organske kiseline	2,6-4 %	Pektini	3,7-4,7 %
Šećeri i alkoholi	3,5-7 %	Mineralne tvari	
Vitamini		K	159-175 mg/100 g
B1	0,02-0,08 mg/100 g	Fe	12 mg/kg
B2	0,03-0,056 mg/100 g	Na	5-10 mg/100 g
C	150-1600 mg/100 g	Mg	20-29 mg/100 g
P	250-300 mg/100 g	Ca	11-14 mg/100 g
K	1-1,5 mg/100 g	Pb	0,045-0,047 mg/kg
Karotenoidi	6-28 mg/100 g	Ni	0,28-0,42 mg/kg
Tokoferoli	do 145 mg/100 g	Zn	4,5-6,2 mg/kg
Kolin	110-700 mg/100 g	Cu	0,12-0,16 mg/kg
Folna kiselina	do 0,79 mg/100 g	Mn	1,8-2,1 mg/kg
Flavonoidi	0,2-1,5 %	Co	0,009-0,01 mg/kg
Kvercetin	57 mg/100 g	Cd	0,019-0,023 mg/kg
Eterična ulja	36 mg/kg	Cr	0,11-0,13 mg/kg

List pasjeg trna također sadrži veliku količinu bioaktivnih spojeva, posebno polifenola i fenolnih kiselina, uključujući leukoantocijanidine, epigalokatehin i galnu kiselinu. Svježi listovi pasjeg trna bogati su ukupnim klorofilom (98,8 mg/100 g) i ukupnim karotenoidima (26,3 mg/100 g) (Suryakumar i Gupta, 2011).

Na temelju svog vrlo bogatog kemijskog sastava i prisustva mnogih prirodnih antioksidansa, pasji trn pokazuje visoka nutritivna i ljekovita svojstva, a samim time ima važnu ulogu u poboljšanju ljudskog zdravlja. S obzirom da pokazuje imunomodulatorno, antioksidativno, antistresno, protuupalno, kardioprotektivno i antikancerogeno djelovanje, pasji trn se koristi kod različitih zdravstvenih stanja i bolesti (Bal i sur., 2011).

2.1.2 Ulje pasjeg trna

Ulje pasjeg trna može se dobiti iz dva dijela biljke – sjemenke i pulpe. Na slici 2 prikazana je jedna od patentiranih metoda prerade svježih bobica pasjeg trna i dobivanje ulja sjemenki, ulja pulpe i soka pulpe. Prvi način uključuje ekstrakciju ulja pasjeg trna postupkom mehaničkog hladnog prešanja sjemenki koje sadrže do 12,50 % ulja. Drugi način dobivanja ulja je ekstrakcija ili hladno prešanje voćne pulpe koja sadrži 8-12 % ulja. Dobivene frakcije se filtriraju, a dvije vrste ulja se značajno razlikuju po izgledu, svojstvima te sadržaju aktivnih sastojaka (Arumughan i sur., 2004).



Slika 2. Shematski prikaz patentirane metode prerade bobica pasjeg trna u ulje sjemenki, ulje pulpe i bistri sok (prema Arumughan i sur., 2004)

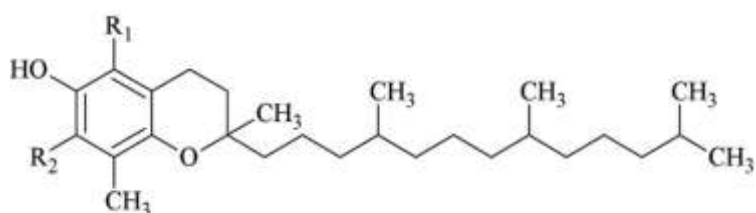
Cenkowski i sur. (2006) uspoređivali su različite metode ekstrakcije s ciljem ispitivanja utjecaja na kvalitetu ulja pasjeg trna, pri čemu su određivali količinu masnih kiselina, tokoferola, karotenoida i sterola. Općenito, razvijene su četiri metode ekstrakcije ulja, a to su: ekstrakcija otapalom pomoću petroletera, pužno prešanje, vodena ekstrakcija i ekstrakcija superkritičnim CO₂. Rezultati provedenog istraživanja su pokazali da ekstrakcija provedena petroleterom daje najbolje rezultate, s obzirom na najviši udio svih analiziranih bioaktivnih sastojaka. Nevedenom metodom dobivena su ulja s najvišim koncentracijama tokoferola (420,6 i 170,7 mg/100 g), tokotrienola (9,7 i 7,6 mg/100 g), karotenoida (22,2 i 527,8 mg/100 g) i sterola (772,4 i 600,4 mg/100 g) u ulju sjemenki i pulpe (Cenkowski i sur., 2006). S druge strane, Yang i Kallio (2002) navode kako ekstrakcija otapalima nije prikladna metoda za ekstrakciju ulja pasjeg trna, s obzirom da mogu zaostati štetni ostaci otapala, što pridonosi i zagađenju okoliša. Metode vodene ekstrakcije i pužnog prešanja ograničene su vrstom materijala (sjemenke naspram pulpe) koji se može prerađivati te su ulja dobivena tim metodama sadržavala najmanje količine nutritivno važnih komponenti (Yakimishen i sur., 2005). Metoda superkritičnim CO₂ pokazala se izrazito uspješnom u ekstrakciji ulja sjemenki i pulpe, s relativno visokim koncentracijama svih identificiranih bioaktivnih spojeva. Dodavanje kootapala s CO₂ može povećati selektivnost za ekstrakciju dodatnih nutritivnih komponenti (Cenkowski i sur., 2006).

Sadržaj ulja varira od vrste do vrste i sorte do sorte, dijela biljke koji se koristi, metode ekstrakcije i faze berbe. Zrele sjemenke pasjeg trna sadrže 8-20 % ulja, dok osušena pulpa voća daje oko 20-25 % uljane komine, a ostatak koji ostane nakon cijedenja soka također sadrži 15-20 % ulja (Parimelazhagan i sur., 2005). Ulja pasjeg trna iz sjemenki i pulpe znatno se razlikuju po sastavu masnih kiselina. Ulje pulpe pasjeg trna sadrži mononezasićene masne kiseline i zasićene masne kiseline, dok su polinezasićene masne kiseline glavne masne kiseline ulja sjemenki pasjeg trna (Yang i Kallio, 2001). Ulje sjemenki pasjeg trna jedino je ulje koje prirodno osigurava 1:1 omjer omega-3 (linolenske kiseline) i omega-6 (linolne kiseline). Ulje sjemenki pasjeg trna, uz omega-3 i omega-6 masne kiseline, sadrži i druge korisne masne kiseline, poput oleinske, za koju se pokazalo da smanjuje razinu kolesterola u krvi (Kumar i sur., 2011). Oba ulja obiluju tokoferolima, tokotrienolima i biljnim sterolima. Ulje sjemenki pasjeg trna sadrži veće koncentracije svih vrsta tokoferola, u usporedbi s uljem pulpe, osim β-tokoferola. Najveću antioksidativnu aktivnost pokazuje α-tokoferol te je ujedno i najzastupljeniji tokoferol u bobicama pasjeg trna (Partanen i sur., 2002). S druge strane, ulje pulpe sadrži više koncentracije tokotrienola u odnosu na ulje sjemenki. Zahvaljujući visokom sadržaju vitamina E u ulju sjemenki pasjeg trna, ulje pokazuje odličan doprinos u borbi protiv

slobodnih radikala i njihovoj eliminaciji (Cenkowski i sur., 2006). Najčešći karotenoidi su likopen i prekursor vitamina A: β -karoten, koji pokazuju mnoge fiziološke funkcije te djeluju kao učinkoviti hvatači slobodnih radikala i jačaju imunološki sustav. Za razliku od ulja sjemenki, ulje pulpe sadrži visoku koncentraciju karotenoida (527,4 mg/100 g) (Cenkowski i sur., 2006).

2.1.3 Tokoferoli

Tokoferoli, zajedno s tokotrienolima, pripadaju skupini antioksidansa topljivih u lipidima te se zajednički nazivaju vitaminom E. Najčešće se kao vitamin E spominje osam spojeva: četiri tokoferola i četiri tokotrienola, koje sintetiziraju samo biljke i fotosintetski mikroorganizmi (Birringer i sur., 2018). Tokoferoli sadrže kromanolni prsten (biciklički fenoli) i zasićeni ugljikovodični bočni lanac. Sastoje se od homologa α -, β -, γ -, δ -, a razlikuju se po broju i položaju metilnog supstituenta u hidrofilnom prstenu 6-kromanola, koji je odgovoran za prisutnost različitih izomernih oblika tokoferola (slika 3 i tablica 3) (Khallouki i sur., 2020).



Slika 3. Općenita kemijska struktura tokoferola (prema Zou i Akoh, 2015)

Tablica 3. Razlike u strukturi α -, β -, γ -, δ -tokoferola (prema Zou i Akoh, 2015)

TOKOFEROL	α -	β -	γ -	δ -
R₁	CH ₃	CH ₃	H	H
R₂	CH ₃	H	CH ₃	H

Zbog svoje strukture ugrađeni su u amfipatski fosfolipidni dvosloj staničnih membrana te na taj način štite membranske lipide i organe od oksidativnog stresa. Unatoč sličnoj strukturi i antioksidativnom djelovanju, izoforme vitamina E razlikuju se u bioraspodivnosti i metabolizmu. Stoga, iako su sve izoforme biološki aktivne, samo se α -tokoferol zadržava u visokim razinama u plazmi i tkivima te predstavlja biološki najaktivniji oblik (Jiang, 2017). Aktivnost ostalih tokoferolnih oblika izražava se kao ekvivalent α -tokoferola (%), što čini 50

% za β -tokoferol, 10 % za γ -tokoferol i 3 % za δ -tokoferol (Wallert i sur., 2021). Uz antioksidativno djelovanje tokoferola, indicirani su antiproliferativni, proapoptotski, antiangiogeni i protuupalni učinci. Povoljan učinak na ljudsko zdravlje proizlazi iz sposobnosti modulacije transdukcije signala i ekspresije gena kod upala i poremećaja imunološkog sustava (Reboul, 2017).

Glavni prirodni izvor tokoferola je uljna frakcija orašastih plodova i uljarica, poput bademovog ulja, maslinovog i suncokretovog ulja, ulja repice, kukuruznog ulja te lanenog i sojinog ulja (Shahidi i De Camargo, 2016). Sadržaj i sastav tokoferola variraju ovisno o biljnoj vrsti i lokalizaciji unutar biljnih tkiva jedne vrste. Sjemenke većinom dominiraju nad drugim dijelovima biljke u sadržaju ukupnih tokoferola, ali koncentracija izoformi tokoferola varira od vrste do vrste (Jiang, 2017). Swiglo i Skorska (2004) utvrdili su kako β - i γ -tokoferoli dominiraju u ulju kukuruza, soje i uljane repice, dok α -tokoferol dominira u maslinovom i suncokretovom ulju. Prema Kallio i sur. (2002) maseni udio ukupnih tokoferola u plodovima sorti *H. rhamnoides* ssp. *sinensis* i *H. rhamnoides* ssp. *mongolica* iznosio je 56-140 mg/kg cijelih bobica, a α -tokoferol bio je dominantan te je određen u udjelu 76-89 % ukupnih tokoferola u bobicama pasjeg trna.

Naposljetku, bitno je istaknuti kako udio tokoferola u plodovima ovisi o sorti, porijeklu, vremenu berbe i sazrijevanju, dok u uljima veliku ulogu, uz prethodno navedeno, ima i metoda ekstrakcije i pročišćavanje ulja (Chun i sur., 2006).

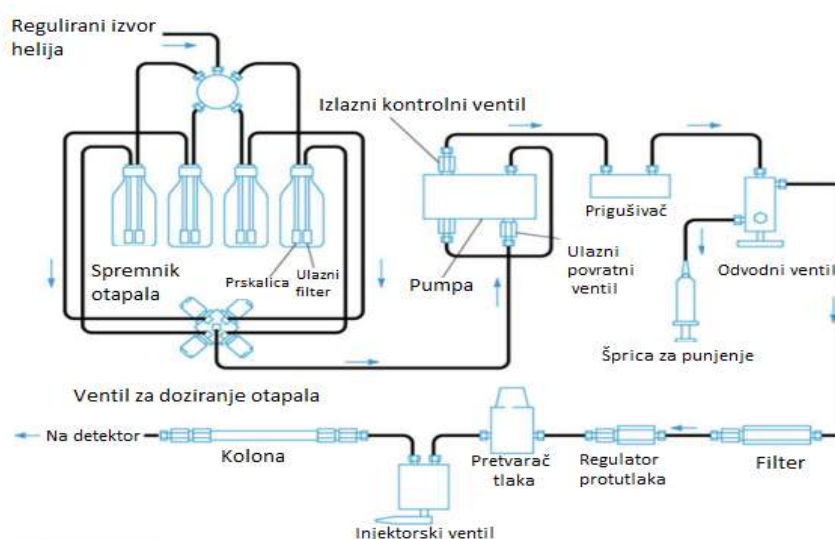
2.2 VISOKO UČINKOVITA TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti ili obično poznata kao HPLC (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*) predstavlja analitičku tehniku koja se koristi za odvajanje, identifikaciju ili kvantificiranje svake komponente u smjesi. Komponente iz smjese razdvajaju se pomoću osnovnog principa kromatografije na stupcu (koloni), a potom se identificira i kvantificira spektroskopijom. Tijekom 1960-ih godina, tekućinska kromatografija na stupcu sa svojim niskotlačnim odgovarajućim staklenim stupcima dalje je razvijena u HPLC s visokotlačnim prilagođenim metalnim stupcima. Stoga HPLC predstavlja poboljšani oblik tekućinske kromatografije na stupcu (Kumar i sur., 2018).

2.2.1 Osnovna načela visoko učinkovite tekućinske kromatografije

Osnovno načelo rada kromatografskih metoda, pa tako i visoko učinkovite tekućinske kromatografije temelji se na razdvajanju sastojaka smjese zbog njihove različite raspodjele između dviju faza koje se ne miješaju. Prema mehanizmu razdvajanja sastojaka razlikuju se

adsorpcijska, razdjelna i ionsko-izmjenjivačka kromatografija te kromatografija isključenjem (Jadaun i sur., 2017). Kod HPLC metode kao pokretna faza koristi se otapalo ili smjesa otapala, koji pod utjecajem visokog tlaka prolaze kroz stacionarnu fazu u koloni. Vrijeme zadržavanja spojeva na koloni ovisi o jakosti vezanja na stacionarnu fazu te o topljivosti u mobilnoj fazi. HPLC se dijeli na kromatografiju normalnih faza i kromatografiju obrnutih faza. Kod kromatografije obrnutih faza mobilna faza je polarnija od stacionarne, pri čemu se prvo eluiraju polarnije molekule. S druge strane, kod kromatografije normalnih faza, stacionarna faza je polarnija od mobilne, stoga se prvo eluiraju hidrofobniji spojevi (Kazakevich i LoBrutto, 2006).



Slika 4. Shematski prikaz HPLC sustava (prema Akash i Rehman, 2020)

Na slici 4 shematski je prikazan HPLC sustav koji se sastoji od spremnika otapala, pumpe, injektora uzorka, kolone, detektora te računalnog sustava (Akash i Rehman, 2020). Otopina uzorka nanosi se na kolonu poroznog materijala, koja predstavlja stacionarnu fazu, ručnim ili automatskim injektorom (autosamplerom), dok se mobilna (tekuća) faza crpi kroz kolonu pod povišenim tlakom. Visoki tlak mobilne faze postiže se korištenjem sustava pumpi. Razdvajanje spojeva prisutnih u analiziranom uzorku odvija se u kromatografskoj koloni, kao rezultat različitih fizikalno-kemijskih interakcija sa stacionarnom fazom. Signali odvojenih spojeva detektiraju se pomoću odgovarajućeg detektora te se podaci analiziraju na računalnom sustavu za obradu (Jadaun i sur., 2017).

Visoko učinkovita tekućinska kromatografija predstavlja vrlo osjetljivu tehniku, visokih performansi, uz uštedu vremena, pri čemu se može koristiti i za kvalitativnu i kvantitativnu procjenu te za analitičke i preparativne svrhe. Usprkos brojnim prethodno

navedenim prednostima, postoje i neki nedostaci HPLC tehnike, a to su: skupa tehnika, ponekad je osjetljivost nekih specifičnih spojeva niska te je teško otkriti koeluciju nekih spojeva (Akash i Rehman, 2020).

2.2.2 Fluorescentni detektori

Kao što je prethodno spomenuto, detektori u HPLC sustavu postavljaju se iza kolone (slika 4) te im je funkcija detekcija ciljnih molekula koje se eluiraju iz kolone. Dobiveni električni signali proporcionalni su koncentraciji pojedinih komponenti analita.

Neki organski spojevi mogu reemitirati dio apsorbiranog UV/Vis zračenja veće valne duljine (niža energija), što je poznato kao fluorescencija. Fluorescentni detektori rade na principu mjerenja emitirane svjetlosti te predstavljaju najosjetljivije, specifične detektore među svim postojećim HPLC detektorima. Iako je mali broj spojeva inherentno fluorescentan, analiti se često pretvaraju u fluorescentne derivate (Reuhs, 2017). Također postoje razne vrste fluorescentnih detektora: fluorescentni detektor s jednom ili više valnih duljina i detektor fluorescencije izazvan laserom. Prednosti fluorescentnih detektora su: veća osjetljivost od UV/Vis detektora (10-1000 puta), visoka selektivnost te kompatibilnost s gradijentnim eluiranjem. Uz prednosti, prisutni su i neki nedostaci poput utjecaja okolišnih uvjeta, otapala, pH, temperature, viskoznosti te je teško predvidjeti fluorescenciju (Raut i Charde, 2014). Fluorescentni detektori idealni su za analizu spojeva u tragovima, stoga se koriste za određivanje raznih vitamina u hrani i dodacima, praćenje aflatoksina u uskladištenim proizvodima od žitarica te otkrivanju aromatskih ugljikovodika u otpadnim vodama (Reuhs, 2017).

2.3 VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

Razvojem analitičkih metoda teži se postići točne, brze i vjerodostojne rezultate analiza i kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka potrebno je provesti validaciju metoda. Provođenjem validacije moguće je predvidjeti najčešće probleme i poteškoće koje se pojavljuju tijekom primjene metode (Kapil, 2011). Iako postoje brojne definicije validacije, najčešće se upotrebljava definicija od strane Međunarodne organizacije za standardizaciju (engl. *International Organization for Standardization*, ISO), koja kaže: „Validacija je proces definiranja analitičkih zahtjeva i potvrđuje da metoda pod razmatranjem ima obilježja dosljedna onom što program zahtijeva“ (ISO 5725, 1994).

Iako ne postoji univerzalno primjenjiva regulativa o validaciji metoda, različite međunarodne organizacije su tijekom godina objavljivale različite priručnike i smjernice, kao

što su: „Harmonizirane smjernice za provjeru valjanosti analitičkih metoda u jednom laboratoriju“ (Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *The International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC), 2002), „Validacija analitičkih postupaka: tekst i metode“ (Međunarodno vijeće za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku upotrebu (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), 2005), itd. Uvjeti koji zahtijevaju validaciju metode odnose se na razvoj i uvođenje novih metoda, ali i na postojeće metode i prijenos te metode u drugi laboratorij ili instrument. Prilikom provođenja validacije potrebno je proći prethodno uspostavljene korake, koji uključuju definiranje svrhe metode, određivanje parametara validacije, postavljanje kriterija prihvatljivosti, provedba laboratorijskih eksperimenata, obrada podataka te usporedba rezultata s postavljenim kriterijima (Eurachem, 2014). Parametri identificirani tijekom validacije su točnost, preciznost (ponovljivost, intermedijarna preciznost, reproducibilnost), specifičnost/selektivnost, linearnost, granice detekcije i kvantifikacije, raspon i robusnost. Ovisno o namjeni metode, odlučuje se koje parametre identificirati u postupku validacije i koje kriterije prihvatljivosti koristiti, a određuju se pojedinačno za svaki analitički postupak prema ICH smjernicama (ICH, 2005). U tablici 4 prikazani su parametri validacije koji se utvrđuju ovisno o svakom pojedinom tipu analitičke metode.

Tablica 4. Parametri validacije ovisno o vrsti analitičke metode (prema ICH, 2005)

Parametri validacije	Metode za identifikaciju	Metode za ispitivanje čistoće		Metode za određivanje sadržaja
		Kvantitativno	Limit test	
Točnost	-	+	-	+
Preciznost	-	+	-	+
Specifičnost/ selektivnost	+	+	+	+
Granica detekcije	-	-	+	-
Granica kvantifikacije	-	+	-	-
Linearnost	-	+	-	+
Područje	-	+	-	+

Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti HPLC metode, koja se koristi za određivanje udjela tokoferola u ulju pasjeg trna, prema Lazariću i Gašljeviću (2006),

prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti (Lazarić i Gašljević, 2006)

PARAMETAR	KRITERIJI PRIHVATLJIVOSTI
Selektivnost	informacija
Točnost	80-110 %
Preciznost <ul style="list-style-type: none"> • Ponovljivost injektiranja • Ponovljivost iniciranja standarda • Ponovljivost pripreme uzorka 	RSD \leq 5 % RSD \leq 5 % RSD \leq 11 %
Linearnost	linearnost u području od 0,5 do 5,0 mg/L R ² \geq 0,995

2.3.1 Specifičnost i selektivnost metode

Specifičnost/selektivnost metode predstavlja mjeru sposobnosti i svojstvo metode da specifično i točno odredi željeni analit u prisutnosti drugih komponenti, kao što su nečistoće i/ili produkti razgradnje u matriksu uzorka (Sabir i sur., 2013). Pri tome je bitno istaknuti kako su specifičnost i selektivnost zapravo dva različita svojstva, koja se u praksi često poistovjećuju. Metoda kojom se može odrediti samo jedan specifičan analit naziva se specifična metoda, dok selektivna metoda predstavlja metodu kojom se može mjeriti više komponenti istovremeno, bez međusobnog ometanja komponenti tijekom procesa mjerenja (Lazarić, 2012). Kod kromatografskih metoda specifičnost se postiže optimalnim izborom kolona te postavljanjem odgovarajućih kromatografskih uvjeta i parametara (temperatura, sastav mobilne faze, vrsta detekcije, valna duljina, itd.). Međutim, veliki problem predstavljaju nečistoće jer otežavaju pouzdano određivanje u analizi dobivenih pikova, pri čemu treba obratiti pozornost da li su dobiveni pikovi od željenog analita ili su prisutne i nečistoće. Zbog navedenog razloga preporučuje se optimizacija pripreme uzoraka za bolju selektivnost te utvrđivanje čistoće pikova (Huber, 2007).

2.3.2 Točnost metode

Točnost metode izražava stupanj slaganja između rezultata ispitivanja te prihvatljive referentne vrijednosti, a utvrđuje se određivanjem preciznosti i istinitosti. Istinitost se definira kao stupanj podudaranja između srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom

određeni broj puta i prihvaćene referentne vrijednosti. Mjerno odstupanje (engl. *bias*) je numerički pokazatelj istinitosti, a izražava razliku između aritmetičke sredine rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti, ili pak njihov odnos (Pravilnik, 2005). Mjerno odstupanje je moguće odrediti na tri načina: analizom referentnog materijala, usporedbom rezultata s rezultatima dobivenim drugom metodom i eksperimentima određivanja analitičkog povrata (engl. *recovery*) (Eurachem, 2014). Određuje se pri najmanje tri različite koncentracije, minimalno u triplicatu, unutar radnog područja, a rezultati se iskazuju kao analitički prinos ili iskorištenje što označava srednju vrijednost omjera izmjerene i stvarne koncentracije analita izraženo u postotku prema formuli [1]:

$$\text{iskorištenje (\%)} = \frac{\text{izmjerena koncentracija analita}}{\text{stvarna koncentracija analita}} \cdot 100 \quad [1]$$

2.3.3 Preciznost metode

Preciznost se definira kao izraz slaganja između niza mjerenja dobivenih iz istog homogenog uzorka pod određenim uvjetima. Obično se izražava numerički kao standardna devijacija (SD), relativna standardna devijacija (RSD) te interval pouzdanosti srednje vrijednosti. Definiranje granice prihvatljivosti ovisi o koncentraciji analita kao i o vrsti analize i matriksu uzorka.

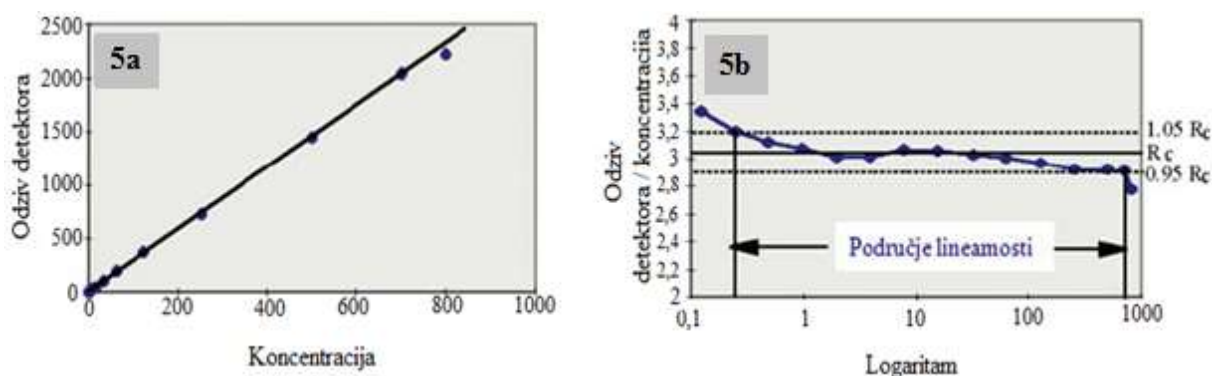
Može se izraziti na tri načina: ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost (Lazarić, 2012). Ponovljivost se odnosi na podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom te pod istim uvjetima (isti analitičar, instrument i laboratorij) u kratkom vremenskom razdoblju (Huber, 2007). Intermedijarna preciznost (međupreciznost) temelji se na mjerenjima u istom laboratoriju pod različitim uvjetima (različiti analitičari, druga oprema, reagensi različith boca), a sve kako bi se potvrdilo da će razvijena metoda dati iste rezultate tijekom laboratorijske uporabe (Sabir i sur., 2013; Gupta i sur., 2012). Obnovljivost (reproducibilnost) predstavlja parametar koji opisuje preciznost koju postižu različiti laboratoriji pod propisanim uvjetima, s ciljem potvrde da će metoda dati isti rezultat u različitim laboratorijima (ICH, 2005).

2.3.4 Linearnost metode

Linearnost je vjerojatnost da će metoda dati rezultat proporcionalan koncentraciji analita u uzorku u određenom rasponu (Toomula i sur., 2011). Parametar linearnosti se određuje mjerenjem odgovora metode na različite koncentracije referentnog spoja, najčešće tri

ponavljanja na pet koncentracijskih razina.

Može se procijeniti grafički i matematički. Vizualna procjena rezultata temelji se na grafičkom prikazu ovisnosti signala o koncentraciji analita, pri čemu se razlikuju dva načina grafičkog prikaza linearnosti (slika 5). Prva metoda grafičkog prikaza (slika 5a) temelji se na prikazu ovisnosti odziva metode o koncentraciji, pri čemu su odstupanja ravnomjerno raspoređena između pozitivnih i negativnih vrijednosti. Druga metoda se temelji na tome da se dobiveni signali podijele odgovarajućim vrijednostima koncentracija, pri čemu se dobije relativni odgovor metode. Potom se konstruira graf kao ovisnost izračunatih relativnih vrijednosti signala (y-os) o logaritmu koncentracije (x-os), pri čemu je dobivena krivulja vodoravna kroz cijeli linearni raspon (slika 5b). Do gubitka linearnosti dolazi pri koncentraciji gdje linija relativnog odziva siječe paralelnu liniju koja odgovara koncentraciji od 95 ili 105 % (Lazarić, 2012).



Slika 5. Dva načina grafičkog prikaza linearnosti (prema Huber, 2007)

Matematičko prikazivanje, s druge strane, uključuje izračun jednadžbe pravca pomoću metode linearne regresije preko baždarnog pravca. Također se izračuna i koeficijent korelacije, čiji kriterij prihvatljivosti obično iznosi $k \geq 0,99$. Na temelju dobivene jednadžbe pravca očitaje se nagib pravca koji izravno ukazuje na osjetljivost metode, a također se može očitati i odsječak pravca koji može sugerirati na sustavne pogreške (Lazarić, 2012).

2.3.5 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije (engl. *Limit of detection*, LOD) predstavlja najnižu koncentraciju analita prisutnog u uzorku koji se može detektirati s određenom točnošću i preciznošću, ali ne mora nužno biti kvantificirana (Eurachem, 2014). Također, bitno je imati na umu kako granica detekcije ne predstavlja najnižu granicu odgovora instrumenta (IUPAC, 2002). Može se odrediti statistički i vizualnim prikazom. Statistički se određuje korištenjem standardne

devijacije signala i nagiba regresijskog pravca. Vizualno određivanje temelji se na razrjeđivanju otopine uzorka, a procjenjuje se najmanji signal koji se može bez sumnje identificirati. Omjer signala i šuma može se koristiti za analitičke postupke s baznom linijom, pri čemu je razina prihvatljivosti za ovaj omjer 3:1 (Huber, 2007).

Granica kvantifikacije (engl. *Limit of quantification*, LOQ) odnosi se na najnižu koncentraciju analita u uzorku koja se može odrediti s odgovarajućom preciznošću i točnošću te se većinom određuje u kvantitativnim testovima u kojima je razina utvrđene koncentracije analita iznimno niska (Kapil, 2011). Limit kvantifikacije se također može odrediti na dva načina: koristeći omjer signal/šum, čija je prihvatljivost 10:1 te, kao i kod granice detekcije, pomoću standardne devijacije signala i nagiba pravca (Huber, 2007).

Kod određivanja vrijednosti za LOD i LOQ statističkom obradom podataka na osnovi odstupanja signala i nagiba, nagib se procijeni iz kalibracijske krivulje, a za standardno odstupanje se uzima ostatna standardna devijacija [2] regresijskog pravca u koncentracijskom području granice detekcije.

$$\sigma = \frac{S_e}{S_d} \quad [2]$$

U tom slučaju LOD i LOQ se računaju prema formulama [3] i [4] (ICH Harmonized tripartite guideline, 2005):

$$LOD = 3,3 \cdot \frac{\sigma}{a} \quad [3]$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{\sigma}{a} \quad [4]$$

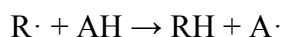
gdje je σ ostatna standardna devijacija, a nagib regresijskog pravca, S_e standardna greška, a S_d standardna devijacija.

2.3.6 Robusnost metode

Robusnost analitičke metode mjera je njezine sposobnosti da pruži iste rezultate unatoč malim, ali namjernim promjenama u parametrima metode. Kod robusnosti metode ispituje se stabilnost pripremljenog uzorka, utjecaji različitih kolona ili pokretne faze te utjecaj promjene instrumenata. Ispitivanje robusnosti metode provodi se s ciljem dokazivanja kako i male promjene radnih uvjeta i provedbe metode utječu na rezultate analize (Toomula, 2011). Smatra se da je određeni radni uvjet u području robusnosti metode, ukoliko njegova promjena ne utječe bitno na rezultat. S druge strane, posebnu pozornost treba obratiti na uvjete koji utječu na rezultate i to označiti u opisu metode (Lazarić, 2012).

2.4 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA ORAC METODOM

Iako postoji nekoliko mehanizama za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti, dva najčešće korištena mehanizma su metode koje se temelje na prijenosu vodikovog atoma (engl. *Hydrogen Atom Transfer*, HAT) i metode temeljene na prijenosu elektrona (engl. *Electron Transfer*, ET). Metode temeljene na HAT i ET principu koriste se za mjerenje sposobnosti tvari da uklone slobodne radikale ili oksidanse (Prior, 2015). HAT metoda temelji se na sposobnosti antioksidansa da inaktiviraju slobodne radikale doniranjem atoma vodika:



Radikal $A\cdot$, koji nastaje reakcijom antioksidansa i slobodnih radikala, stabilizira se rezonancijom. Fluorescentna proba i antioksidansi reagiraju s radikalom, pri čemu se antioksidacijska aktivnost mjeri spektrofluorometrijski, na temelju konkurentske kinetike mjerenjem raspada fluorescentne probe u odsutnosti i prisutnosti antioksidansa (Gupta, 2015).

ORAC metoda (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) jedna je od najčešće korištenih i standardiziranih antioksidativnih metoda iz skupine HAT metoda. Mjeri se inhibicija AAPH peroksil radikala, gdje je izvor radikala obično azo-spoj AAPH (2,2'-azobis(2-amidinoproionamid)-dihidroklorid) koji se pri 37 °C raspada konstantnom brzinom, stvarajući peroksil radikale (Bursać-Kovačević, 2010). Ova se metoda temelji na antioksidativnom kapacitetu spojeva da inhibiraju oksidativnu razgradnju fluorescentne probe, pri čemu se kao fluorescentna proba najčešće upotrebljava fluorescein. U principu, antioksidansi doniraju proton peroksilnom radikal, pri čemu dolazi do neutralizacije. Nastali radikali zatim reagiraju s fluoresceinom, što rezultira stvaranjem nefluorescentnog produkta i smanjenjem fluorescencije, što se mjeri optički. S obzirom da se antioksidansi suprotstavljaju toj reakciji, antioksidativna aktivnost prati se kao gubitak fluorescencije u prisutnosti antioksidansa (Gupta, 2015). Neke od prednosti navedene ORAC metode su da predstavlja izrazito jednostavnu, automatiziranu i standardiziranu metodu, posjeduje visoku ponovljivost rezultata mjerenja te mjeri točno određenu kemijsku reakciju. Bitno je istaknuti kako se mjerenje odvija pri 37 °C, tj. pri fiziološkim uvjetima te se stoga smatra da navedena metoda može najbolje predvidjeti antioksidacijsko djelovanje ispitivanog uzorka *in vivo* (u organizmu), stoga se i koristi za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta bioloških uzoraka (krvne plazme i seruma). Ipak, uz brojne prednosti, ORAC metoda ima i neznatne nedostatke kao što su potreba za termostatiranjem prilikom analize (37 °C), potreba za uređajem sa sposobnošću mjerenja fluorescencije te duljina mjerenja (kompenzira se s velikim brojem uzoraka koji se istovremeno mjere) (Garrett i sur., 2010).

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Uzorci

Istraživanje je provedeno na 4 uzorka ulja pasjeg trna (od bobica uzgojenih na području Hrvatske, okolica Zagreba) dobivena iz 2 različite sorte (*Leikora* i *Ascola*). Svaki uzorak ulja pasjeg trna dobiven od jedne sorte podvrgnut je različitim postupkom ekstrakcije, pri čemu su 2 uzorka dobivena ekstrakcijom superkritičnim CO₂, a druga 2 uzorka su dobivena Soxhlet ekstrakcijom.

- Ekstrakcija superkritičnim CO₂ provedena je u SFE sustavu (Đuro Đaković aparati d.o.o., Slavonski Brod) metodom koju su opisali Pavlović i sur. (2016) uz određene modifikacije. Parametri provedene ekstrakcije su: tlak 276 bara, temperatura 35 °C, maseni protok 2 kg/h i vrijeme trajanja procesa 90 min. Svakih 15 min se sakupljena količina ekstrakta odvajala u prethodno izvagane staklene čaše i bilježila masa s točnošću ± 0,0001 g.
- Soxhlet ekstrakcija ulja iz bobica pasjeg trna provedena je u Soxtherm sustavu za ekstrakciju (Gerhardt, Njemačka), korištenjem *n*-heksana kao otapala, prema studiji Harkat i sur. (2022) uz određene modifikacije. Postupak Soxhlet ekstrakcije proveden je na način da se 10 g liofiliziranih i usitnjenih bobica pasjeg trna stavi u Soxtherm sustav za ekstrakciju te se zatim refluxira s 50 mL *n*-heksana tijekom 90 min. Prilikom provođenja ekstrakcije povećava se i temperatura do 180 °C. Nakon ekstrakcije, otapalo se uklanja pomoću rotacijskog vakuum uparivača pri 60 °C. Potom se dobiveno ulje filtrira, propuše u struji dušika te skladišti u tamnim bocama pri -18 °C do trenutka provođenja analize.

3.1.2 Standardi

U studiji su korišteni komercijalno dostupni standardi α -, β -, γ - (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Njemačka) i δ -tokoferola (Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada).

3.1.3 Kemikalije

Sve uporabljene kemikalije bile su visoke analitičke čistoće.

Kemikalije za ekstrakciju i određivanje tokoferola HPLC metodom uz FD detektor

- Izopropanol (C₃H₈O) (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, Češka)

- Heksan ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 95 % (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Redestilirana voda pročišćena na uređaju MilliQ (Millipore, SAD)

Reagensi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta ORAC metodom

- Aceton (GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska)
- Fosfatni pufer (75 mM, pH = 7,5)

Priprema: Odvaži se 5,0943 g dinatrijeva hidrogenfosfata dihidrata ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) i 6,3175 g kalijeva dihidrogenfosfata (KH_2PO_4) i otopi u 1000 mL destilirane vode na magnetskoj miješalici (IKAMAG RET-G, Njemačka) uz stalno mjerenje pH (pHmetar, inoLab pH 7110, Njemačka) te se dodaju peleti NaOH dok se ne postigne pH=7,5. Svaki dan je potrebno pripremiti svježu otopinu.
- Otopina standarda Trolox

Priprema: Početna otopina troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) pripravi se otapanjem 0,0017 g Troloxa (Acros Organics, USA) u 50 mL 7 % RMCD. Iz pripremljene početne otopine trolox pripremi se 6 razrjeđenja sa 7 % RMCD-a.
- Otopina AAPH (240 mM)

Priprema: Otopi se 0,6508 g AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamid)-dihidroklorid, 98%) (Acros Organics, Belgija) u 10 mL 75 mM fosfatnog pufera (pH=7,5).
- Fluorescein (63,0 nM)

Priprema: Otopina 1 fluoresceina priredi se tako da se otopi 22,5 mg fluoresceina (Riedel-de Haen, Njemačka) u 50 mL 75 mM fosfatnog pufera (pH 7,5). Otopina 2 fluoresceina pripremi se na način da se od otopine 1 uzme 24,5 μL te se nadopuni s 250 mL 75 mM fosfatnog pufera (pH 7,5).
- Otopina 7 % RMCD

Priprema: Otopi se 7 g metoksiliranog β -ciklodekstrina (Acros Organics, USA) u 100 mL 50 % acetona.

3.1.4 Pribor

Standardno laboratorijsko stakleno i plastično posuđe volumena 1-1000 mL te metalni pribor:

- Staklene čaše
- Odmjerne tikvice volumena 5, 25 i 50 mL te 1 L

- Stakleni lijevci
- Menzure volumena 100 mL i 1 L
- Stakleni štapić
- Staklene boce za otapala
- Falcon kivete
- Plastični nastavci za mikropipete
- Sterilne šprice s iglom
- Stalak za epruvete
- Špatula
- Magneti
- Aluminijske posudice
- Plastične žličice
- Automatske mikropipete (10-100 μ L, 100-1000 μ L, 0,5-5 mL)
- Viale smeđe 1,5 mL N9 navoj i odgovarajući čepovi (Macherey-Nagel GmbH Co KG, Njemačka)
- Filter za špicu Chromafil Xtra PTFE-45/25 (Macherey-Nagel GmbH Co KG, Njemačka)
- Mikrotitarska pločica sa 96 jažica (Greiner, Sigma-Aldrich, Njemačka)

3.1.5 Aparatura

- Analitička vaga (točnost $\pm 0,0001$ g) (Sartorius AG, Göttingen, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Elmasonic S 40H, Elma, Njemačka)
- Rotacijski vakuum uparivač RV 10 (IKA, Staufen, Njemačka)
- Vortex miješalica (Velp Scientifica, Italija)
- Magnetska miješalica (IKAMAG RET-G, Njemačka)
- pH metar (inoLab pH 7110, Njemačka)
- CLARIOstar uređaj (BMG LabTech, Offenburg, Njemačka)
- Tekućinski kromatograf Agilent 1260 (Agilent, Santa Clara, SAD) sistem (HPLC) opremljen sa:
 - 1260 kvarternom pumpom,
 - 1260 autosamplerom,
 - 1260 termostatiranom kolonom,
 - 1260 fluorescentnim detektorom,

3.2 METODE

Istraživanje validacija metode za određivanje tokoferola u ulju pasjeg trna provedeno je prema standardnoj metodi (HR EN ISO 9936:2007) uz primjenu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i fluorescentnu detekciju (HPLC/FD), izokratskom metodom normalnih faza.

Prije samog određivanja pomoću HPLC/FD, potrebno je iz uzoraka ulja pasjeg trna ekstrahirati tokoferole, prema postupku koji je detaljno opisan u poglavlju 3.2.1. Nakon toga su pripremljena razrjeđenja otopina standarda koja su se koristila za određivanje parametara validacije (poglavlje 3.2.2.) i izradu baždarnog pravca.

3.2.1 Ekstrakcija tokoferola

Ekstrakcija tokoferola iz ulja pasjeg trna provodi se na način da se odvaži 0,1 g uzorka ulja pasjeg trna s točnošću $\pm 0,01$ g u odmjernu tikvicu od 5 mL te nadopuni *n*-heksanom do oznake. Potom se dobiveni uzorak ekstrahira u ultrazvučnoj kupelji 5 min. Po završetku ekstrakcije, ekstrakti se propušu u struji dušika i čuvaju pri -60 °C do trenutka provođenja analize. Navedeni postupak ponovi se za sva 4 uzorka ulja pasjeg trna (tablica 6).

Tablica 6. Odvagane mase uzoraka ulja pasjeg trna za ekstrakciju tokoferola

UZORAK	POSTUPAK EKSTRAKCIJE	MASA UZORKA (g)
Ulje sorte A (<i>Leikora</i>)	superkritični CO ₂	0,1187
Ulje sorte B (<i>Ascola</i>)		0,1038
Ulje sorte A (<i>Leikora</i>)	Soxhlet ekstrakcija	0,1029
Ulje sorte B (<i>Ascola</i>)		0,1137

3.2.2 Priprema otopine standarda

Za pripremu standardnih otopina α -, β -, γ - i δ -tokoferola odvaži se $0,005 \pm 0,0001$ g pojedinog standarda i otopi u 10 mL *n*-heksana u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni s otapalom do oznake. Početne masene koncentracije tako pripremljenih otopina su 50 mg/L. Od početnih otopina tokoferola naprave se razrjeđenja u otapalu u omjeru: 1:9; 1:14; 1:19;

1:49 i 1:99. Koncentracije standarda u tim tikvicama iznose 5,00; 3,33; 2,50; 1,00 i 0,50 mg/L koje se koriste za izradu baždarnih pravaca.

3.2.3 Određivanje tokoferola primjenom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije uz fluorescentnu detekciju (HPLC/FD)

Razdvajanje tokoferola provedeno je visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom uz fluorescentnu detekciju (HPLC/FD).

Za razdvajanje tokoferola koristi se mobilna faza dobivena miješanjem izopropanola i heksana u omjeru 99,3:0,7; v/v. U odmjernu tikvicu od 500 mL otpipetira se 3,5 mL heksana i nadopuni izopropanolom do oznake. Prije upotrebe, dobivena mobilna faza se odzrači u ultrazvučnoj kupelji tijekom 10 min. Prethodno pripremljeni ekstrakti dobiveni iz uzoraka ulja pasjeg trna se prije injektiranja profiltriraju preko 0,45 µm Chromafil Xtra PTFE filtera.

Parametri kromatografske analize:

Kolona:	LiChroCART, Silica 60,5 µm (250 × 4,6 mm), (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
Mobilna faza:	otapalo A: izopropanol:heksan (99,3:0,7; v/v)
Temperatura kolone:	sobna
Brzina protoka:	0,9 mL/min 100 % A
Vrijeme analize:	25 min
Detektor: Fluorescentni detektor (FD)	
• Valna duljina ekstinkcije:	295 nm
• Valna duljina emisije:	330 nm
Injektirani volumen:	20 µL

Identifikacija i kvantifikacija tokoferola:

Identifikacija tokoferola temelji se na usporedbi vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenima zadržavanja standarda. Identifikacija tokoferola provodi se pri valnoj duljini 295 nm primjenom fluorescentne detekcije (FD) te se pri istoj valnoj duljini očitavaju površine razdvojenih pikova.

Za kvantifikaciju, odnosno izračunavanje koncentracije pojedinačnih tokoferola u analiziranim uzorcima ulja pasjeg trna, koriste se prethodno dobivene jednadžbe baždarnih pravaca standarda tokoferola.

3.2.4 Postupak validacije metode

Prema protokolu zadani su zahtjevi validacije za prethodno opisanu metodu. U tablici 5 prikazani su parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti.

3.2.4.1 Selektivnost

Selektivnost metode se odredi na način da se posebno injektiraju mobilna faza, otopine standarda tokoferola i otopina uzorka ulja pasjeg trna te se usporedbom kromatograma provjeri postoje li interferencije iz matriksa u zadanom području ispitivanja.

3.2.4.2 Točnost

Točnost metode određuje se injektiranjem otopina standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola poznatih koncentracija na tri koncentracijske razine unutar radnog područja metode. Otopina standarda svake koncentracije injektira se tri puta. Rezultati se iskazuju kao analitički prinos ili iskorištenje što označava srednju vrijednost omjera izmjerene i stvarne koncentracije analita izraženo u postotku prema formuli [1].

3.2.4.3 Preciznost

Preciznost metode određuje se kroz kategoriju *Ponovljivost/Repetabilnost*:

- Ponovljivost injektiranja metode određuje se injektiranjem otopina standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola, koncentracije 2,50 mg/L. Otopine standarda svakog pojedinog tokoferola injektiraju se šest puta pri čemu se dobivaju kromatogrami iz kojih se očitaju površine pikova i vremena zadržavanja otopina standarda. Potom se izračuna srednja vrijednost površine pikova i vremena zadržavanja te relativno standardno odstupanje (RSD) za površinu i vrijeme zadržavanja.
- Ponovljivost pripreme standarda određuje se injektiranjem 3 različite koncentracije otopina standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola. Otopine standarda različitih koncentracija injektiraju se šest puta pri čemu se dobivaju kromatogrami iz kojih se očitaju površine pikova. Na temelju dobivenih podataka izračuna se srednja vrijednost površine pika, standardna devijacija i koeficijent varijabilnosti (%).

3.2.4.4 Linearost

Linearost metode određuje se injektiranjem otopina standarda u rasponu

koncentracija od 0,50 do 5,00 mg/L. Otopina standarda svake koncentracije injektira se šest puta. Potom se iz dobivenih kromatograma očitavaju površine pikova otopina standarda te se izračuna njihova srednja vrijednost. Na temelju dobivenih rezultata određuje se jednadžba baždarnog pravca, nagib pravca, odsječak i koeficijent korelacije.

3.2.4.5 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije i granica kvantifikacije određuju se injektiranjem tri najniže koncentracije pojedinog standarda. Iz dobivenih rezultata pomoću računalnog programa Excel odredi se jednadžba baždarnog pravca na temelju čijeg su nagiba i ostatnog standardnog odstupanja statistički procijenjene granice detekcije i granice kvantifikacije za svaki standard posebice prema formuli (Eurachem, 2011):

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 * c_j)]^2}{n-2}} \quad [5]$$

gdje je:

A_j – površina uzorka

B_0 – odsječak regresijskog pravca

B_1 – nagib regresijskog pravca,

c_j – koncentracija uzorka

n – broj uzoraka

3.2.5 Određivanje antioksidacijskog kapaciteta lipofilnom ORAC metodom

Antioksidacijski kapacitet uzoraka ulja pasjeg trna određen je lipofilnom ORAC metodom prema Naguib i sur. (2002) uz određene modifikacije:

Princip metode:

ORAC metoda prema mehanizmu djelovanja spada u HAT metodu, koja se temelji na prijenosu atoma vodika, pri čemu se mjeri inhibicija peroksil radikala koji nastaje uslijed raspadanja azo-spoja, 2,2'-azobis(2-amidinoproionamid)-dihidroklorid (AAPH), pri stalnoj brzini na 37 °C.

Priprema uzoraka:

0,1 g uzorka ulja pasjeg trna s točnošću $\pm 0,001$ g odvaže se u odmjernu tikvicu od 5,00 mL te nadopuni acetonom do oznake. Zatim se napravi razrjeđenje 1:1 sa 7 % RMCD otopinom te se stavi 5 min u ultrazvučnu kupelj pri sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci se

promiješaju na vortex miješalici (4000 o/min) te profiltriraju kroz 0,45 µm Chromafil Xtra PTFE filter.

Postupak rada:

U 7 % RMCD pripremljeno je odgovarajuće razrjeđenje uzoraka i otopine Trolox standarda, dok su u 75 mM fosfatnom puferu (pH 7,38) pripremljene otopine fluoresceina (63 nM) i izvor radikala 2,2'-azobis (2-amidinopropan)-dihidroklorida (240 mM).

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

Nakon inkubacije, mjeri se fluorescencija (λ eks. 493 nm i λ em. 515 nm) svakih 90 s kako bi se odredio pozadinski signal. Mjerenje inteziteta fluorescencije traje do 120 min.

Za analizu podataka korišten je pripadajući računalni program koji omogućuje automatsku evaluaciju - MARS softver (MARS 2.0 software, BMG LABTECH, Offenburg, Germany).

3.2.6 Statistička obrada rezultata

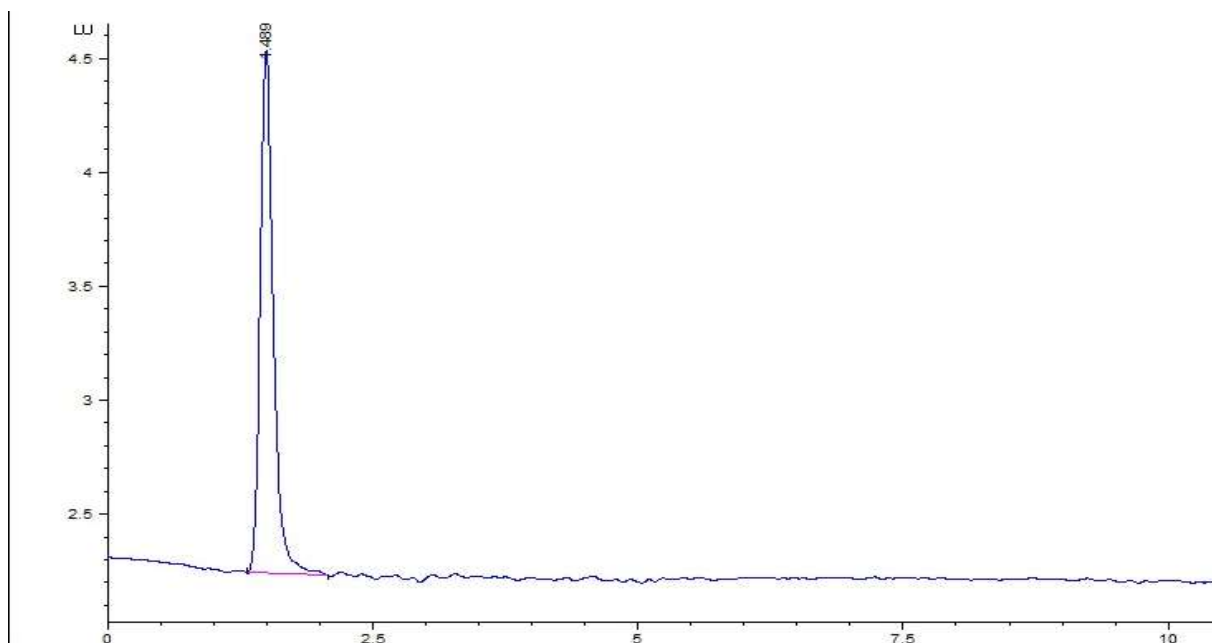
Statistička obrada rezultata provedena je računalnim programom Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft, Redmond, SAD) i Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD).

4 REZULTATI I RASPRAVA

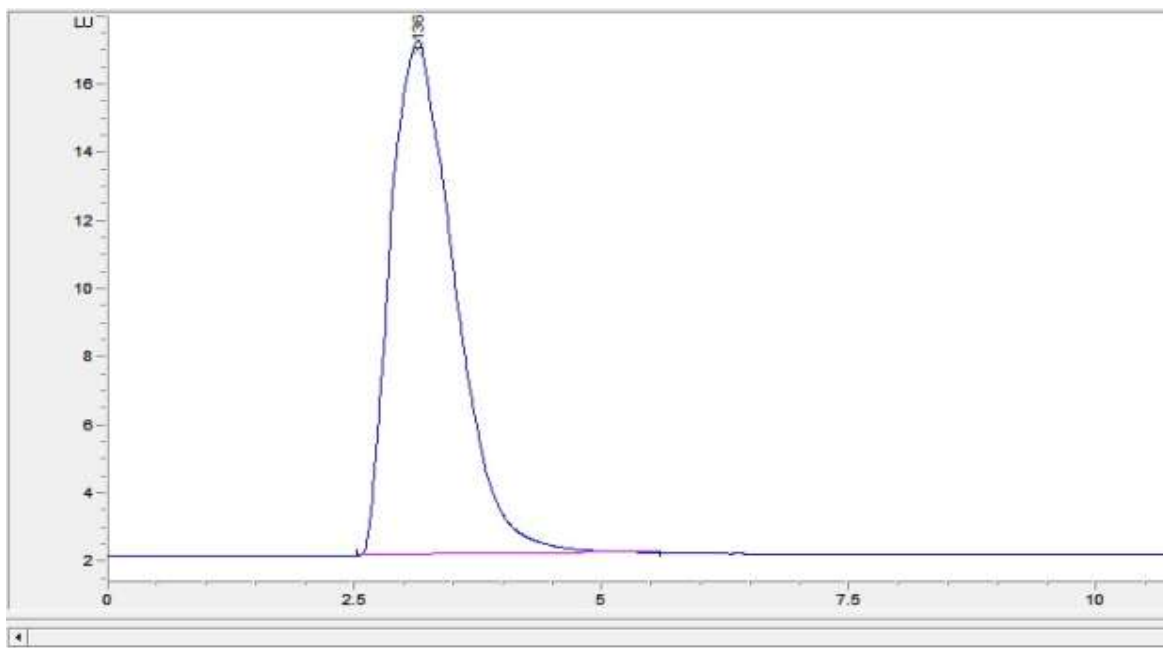
U ovom istraživanju proveden je postupak razrade i validacije metode za određivanje tokoferola u ulju pasjeg trna primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti na reverznoj fazi uz fluorescentnu detekciju (HPLC/FD). Važnost validacije analitičke metode je dobiti točne i pouzdane rezultate s ciljem smanjenja mogućnosti pogreške na najmanju moguću mjeru, a ako do njih i dođe one se trebaju nalaziti unutar prihvatljivih granica. Postupkom validacije metode za određivanje tokoferola u ulju pasjeg trna provjerena je selektivnost (slike 6-11), točnost (tablica 7), preciznost injektiranja (tablice 8 i 9), preciznost ponovljivosti pripreme standarda (tablica 10), linearnost (slike 12-15; tablica 11) te granice detekcije i kvantifikacije (tablica 11).

4.1 SELEKTIVNOST METODE

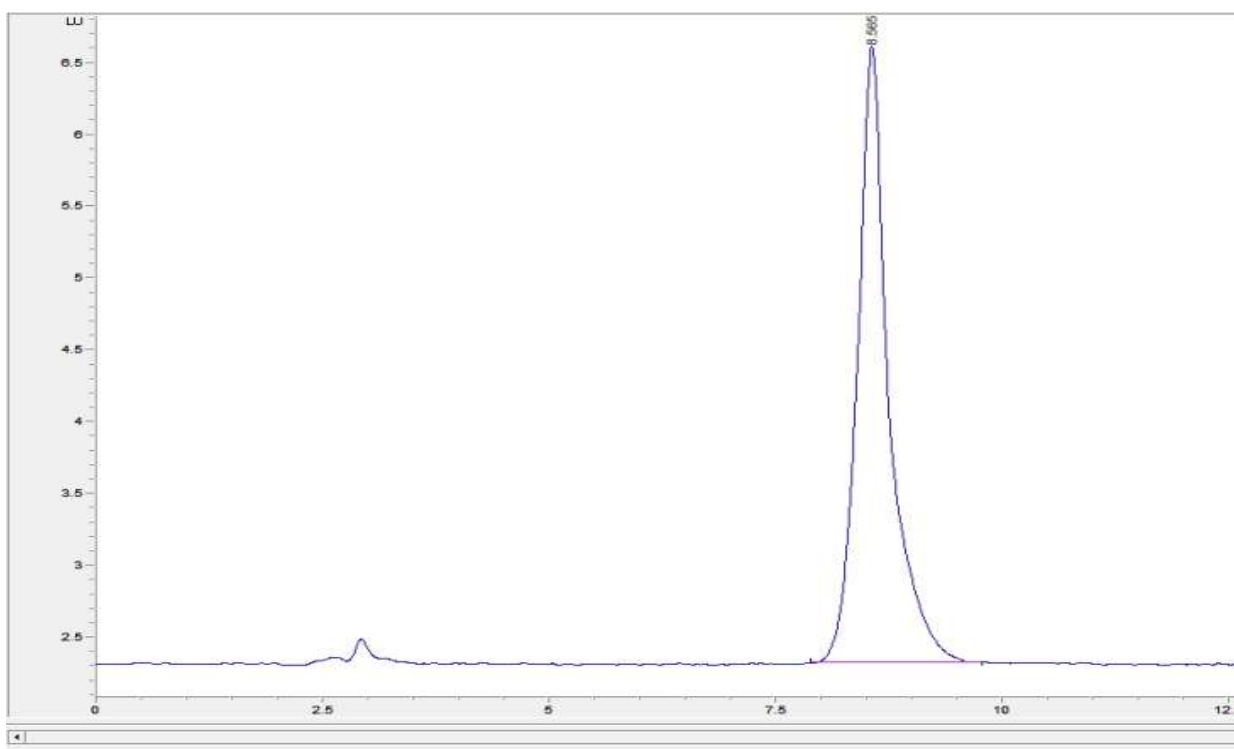
Selektivnost metode određena je usporedbom kromatograma mobilne faze (izopropanol:heksan; 99,3:0,7; v/v), otopina standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola i otopine uzorka ulja pasjeg trna. Na slici 6 prikazan je kromatogram mobilne faze, na slikama 7-10 kromatogrami otopina standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola, a na slici 11 kromatogram otopine ekstrakta tokoferola iz ulja pasjeg trna.



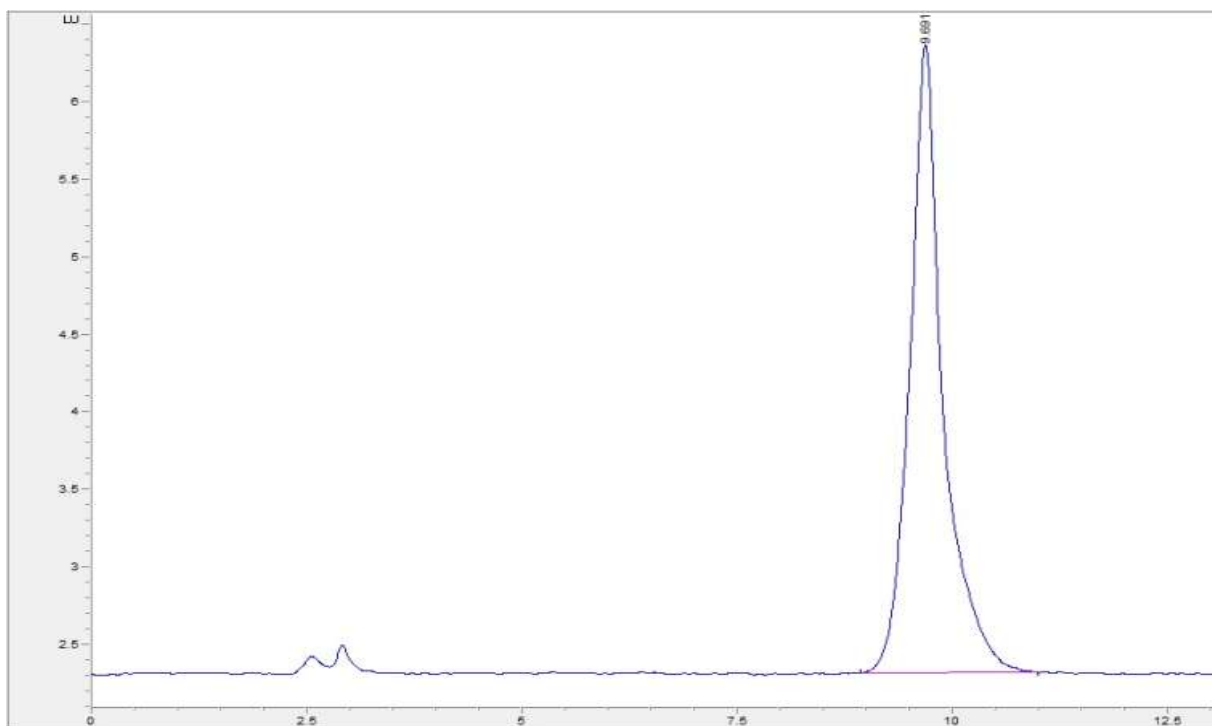
Slika 6. Kromatogram mobilne faze otapalo A (izopropanol:heksan; 99,3:0,7; v/v) korištene za HPLC/FD analizu



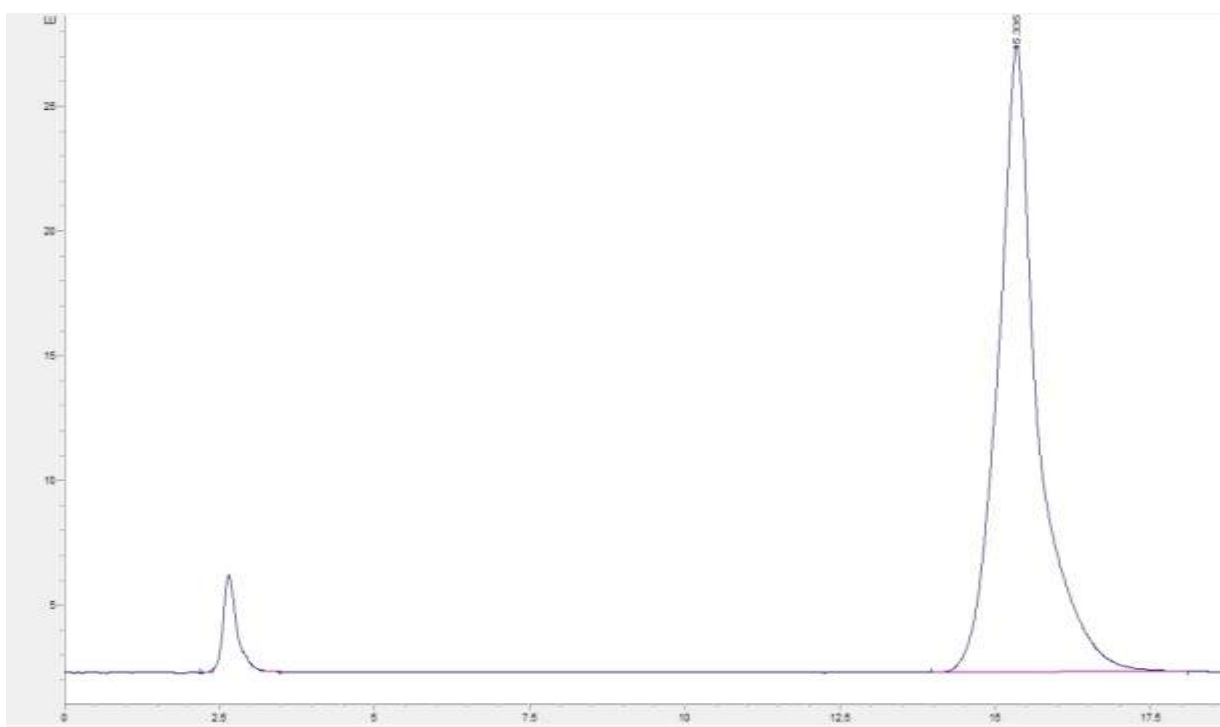
Slika 7. Kromatogram α -tokoferola koncentracije 2,50 mg/L, retencijsko vrijeme 3,13 min \pm 0,13 min



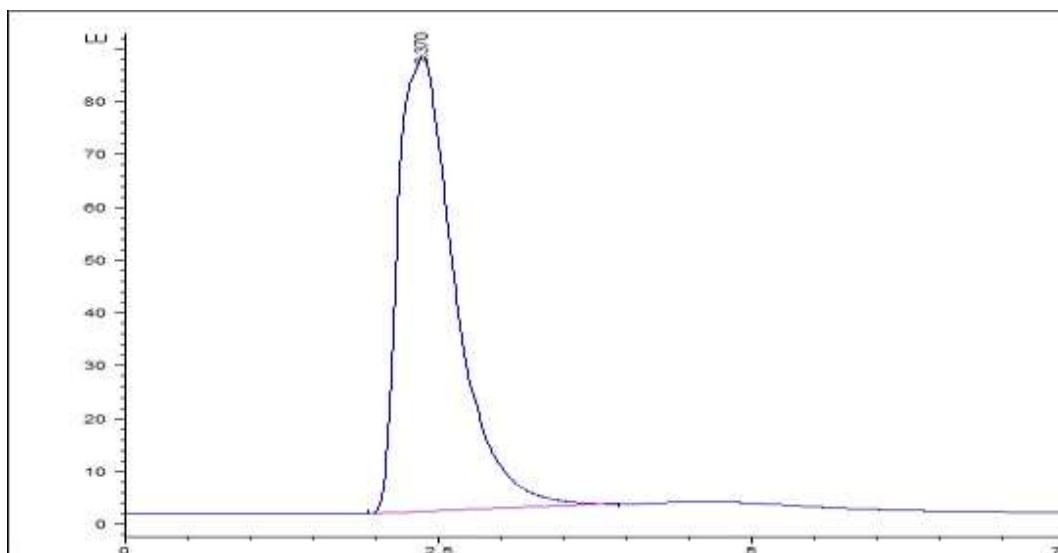
Slika 8. Kromatogram β -tokoferola koncentracije 2,50 mg/L, retencijsko vrijeme 8,57 min \pm 0,25 min



Slika 9. Kromatogram γ -tokoferola koncentracije 2,50 mg/L, retencijsko vrijeme 9,81 min \pm 0,18 min



Slika 10. Kromatogram δ -tokoferola koncentracije 2,50 mg/L, retencijsko vrijeme 15,33 min \pm 0,36 min



Slika 11. Kromatogram otopine ekstrakta tokoferola iz ulja pasjeg trna, retencijsko vrijeme $2,40 \text{ min} \pm 0,42 \text{ min}$

Metoda se smatra selektivnom ukoliko se usporedbom kromatograma mobilne faze, otopine standarda i otopine uzorka odredi da vremena zadržavanja i pikovi analita u standardnoj otopini odgovaraju vremenima zadržavanja i pikovima analita u uzorku. Uz navedeno, promatra se i prisustvo interferirajućih pikova, točnije da bi se metoda smatrala selektivnom ne smiju postojati interferirajući pikovi u području u kojem se očekuje otpuštanje dokazivanog analita. Određivanjem selektivnosti analizira se utjecaj različitih interferencija, pri čemu se provjerava da li prisutnost pojedinih interferencija utječe na identifikaciju i/ili kvantifikaciju te dobivanje pouzdanih rezultata.

Analizom kromatograma (slike 6-11) vidljivo je kako ne postoje interferirajući pikovi koji bi mogli ometati analizu ulazeći u interakciju s pikom dokazivanog analita. Nadalje, iz dobivenih kromatograma vidljivo je kako svi analizirani tokoferoli imaju različita vremena zadržavanja te nema preklapanja u uskom rasponu vremena, što znači da ne bi trebalo biti problema i nedoumica prilikom identifikacije pojedinog tokoferola u uzorcima. Usporedbom prikazanih kromatograma može se uočiti kako pik na kromatogramu α -tokoferola koncentracije 2,50 mg/L (slika 7) odgovara piku na kromatogramu otopine ekstrakta tokoferola iz ulja pasjeg trna (slika 11), iz čega možemo zaključiti kako uzorak ulja pasjeg trna sadržava određeni udio α -tokoferola. Međutim, ipak postoji mala razlika između vremena zadržavanja u standardnoj otopini i u otopini uzorka, a mogući uzrok je prisustvo ostalih tokoferola (β -, γ -, δ -tokoferola) u otopini uzorka te se zbog toga vrijeme zadržavanja otopine uzorka ne podudara u potpunosti s vremenom zadržavanja standardne otopine. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je metoda selektivna.

4.2 TOČNOST METODE

Točnost metode određuje se kao odstupanje srednje vrijednosti niza izmjerenih vrijednosti od prave ili referentne vrijednosti, a procjena točnosti rezultata mjerenja trebala bi obuhvatiti cijelo radno područje, stoga se ispitivanje vrši pri nekoliko koncentracija unutar radnog područja. U ovom radu točnost rezultata mjerenja određena je na temelju tri uzastopna mjerenja otopina standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola pri tri različite koncentracije. Točnost se izražava kao % iskorištenja na način da se uspoređi koncentracija standarda nakon ekstrakcije s koncentracijom standarda prije ekstrakcije. Za svaku koncentraciju standarda određeno je srednje iskorištenje (eng. *recovery*) (%) i relativna standardna devijacija (RSD) (%). Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Rezultati određivanja točnosti mjerenja s otopinama standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola

STANDARD	KONCENTRACIJA STANDARDA PRIJE EKSTRAKCIJE (mg/L)	KONCENTRACIJA STANDARDA NAKON EKSTRAKCIJE (mg/L)	ISKORIŠTENJE (eng. <i>recovery</i>) (%)	RSD (%)
α -TOKOFEROL	0,01583	0,01415	89,39	5,79
	15,83	13,0957	82,73	1,25
	50,66	44,8633	88,56	0,14
β -TOKOFEROL	0,02167	0,0195	90,16	0,52
	21,67	17,87	82,46	3,34
	69,34	58,28	84,05	1,90
γ -TOKOFEROL	0,02	0,0168	84,17	2,68
	20,00	16,7267	83,63	3,70
	64,00	54,4533	85,08	2,47
δ -TOKOFEROL	0,00438	0,0034	77,25	4,54
	4,375	3,7393	85,47	2,76
	14,00	12,2467	87,48	2,22

Prema dobivenim podacima, iskorištenje metode kreće se od 77,25 (najniža koncentracija standarda δ -tokoferola 0,00438 mg/L) do 90,16 % (najniža koncentracija standarda β -tokoferola 0,02167 mg/L). S obzirom da je prethodno postavljeni kriterij prihvatljivosti prema tablici 5 za točnost 80-110 %, može se zaključiti da metoda zadovoljava

navedeni kriterij prihvatljivosti za sve koncentracijske razine i standarde (82,46-90,16 %), osim za najnižu koncentraciju standarda δ -tokoferola za koju je izračunato iskorištenje 77,25 %.

Prema Causon (1997) poželjno je postići iskorištenje što bliže 100 %, jer se na taj način povećava osjetljivost metode, ali mala je vjerojatnost da će iskorištenja od 50 % ili više ugroziti integritet metode. Causon (1997) također navodi kako se dobra točnost i preciznost mogu dobiti i metodama s umjerenim iskorištenjem, ali pod uvjetom da imaju odgovarajuću osjetljivost. Stoga, iako pojedini rezultati dobiveni određivanjem točnosti ne zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti, ne treba značiti da navedena metoda nije prikladna za određivanje udjela α -, β -, γ - i δ -tokoferola u uzorcima ulja pasjeg trna.

4.3 PRECIZNOST METODE

Kao što je prethodno spomenuto, preciznost metode predstavlja mjeru podudaranja nekoliko nezavisnih ispitnih rezultata izvedenih iz istog uzorka te može sugerirati na slučajne pogreške metode. Kriteriji prihvatljivosti relativnih standardnih odstupanja (RSD) za parametar preciznosti metode ovise o prirodi uzorka u kojem se određuju.

Preciznost metode određena je kroz određivanje *ponovljivosti ili repetabilnosti*.

- Ponovljivost injektiranja određena je izračunom srednje vrijednosti dobivenih površina pikova za otopine standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola (koncentracije otopina standarda 2,50 mg/L) te pomoću standardnih devijacija i relativnih standardnih odstupanja dobivenih pikova (tablica 8). Osim toga, izračunata je i srednja vrijednost vremena zadržavanja otopina standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola te standardna devijacija i koeficijent varijabilnosti za vrijeme zadržavanja (tablica 9).

Tablica 8. Rezultati ponovljivosti mjerenja za otopine standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola koncentracije 2,50 mg/L

Red. broj određivanja	Površina ispod kromatografskog maksimuma (mAU)			
	α -tokoferol	β -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol
1.	841,00	1126,50	1467,50	726,60
2.	843,30	1127,30	1462,50	730,10

Tablica 8. Rezultati ponovljivosti mjerenja za otopine standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola koncentracije 2,50 mg/L - nastavak

3.	847,40	1128,80	1471,20	722,90
4.	839,50	1130,30	1472,50	724,80
5.	838,90	1124,70	1461,90	726,80
6.	842,60	1123,50	1466,60	729,20
Srednja vrijednost (x_{sr}):	842,12	1126,85	1467,03	726,73
Standardna devijacija (S_d)	3,10	2,52	4,35	2,68
Koeficijent varijabilnosti (%)	0,37	0,22	0,30	0,37

Dobivene RSD vrijednosti, tj. koeficijenti varijabilnosti površine pikova za otopine standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola koncentracije 2,50 mg/L kreću se u rasponu od 0,22 do 0,37 %, što znači da se nalaze unutar kriterija prihvatljivosti za ponovljivost injektiranja metode prema tablici 5 ($RSD \leq 5$ %).

Tablica 9. Rezultati ponovljivosti određivanja vremena zadržavanja za otopine standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola koncentracije 2,50 mg/L

Red. broj određivanja	Vrijeme zadržavanja (min)			
	α -tokoferol	β -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol
1.	3,13	8,22	9,65	15,00
2.	3,31	8,37	9,57	15,40
3.	3,20	8,73	9,99	15,90
4.	3,02	8,50	9,87	15,57
5.	3,01	8,71	10,00	15,02
6.	3,10	8,87	9,80	15,11
Srednja vrijednost (x_{sr}):	3,13	8,57	9,81	15,33
Standardna devijacija (S_d)	0,11	0,25	0,18	0,36
Koeficijent varijabilnosti (%)	3,64	2,87	1,80	2,33

Izračunati koeficijenti varijabilnosti (RSD vrijednosti) vremena zadržavanja za otopine standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola koncentracije 2,50 mg/L, također se nalaze unutar granica prihvatljivosti za ponovljivost injektiranja metode prema tablici 5 ($RSD \leq 5\%$), s vrijednostima 1,80-3,64 %.

Prema dobivenim rezultatima ispitivanja preciznosti metode uočava se kako se metoda može smatrati preciznom te kao takva koristiti za određivanje tokoferola.

- Ponovljivost pripreme otopine standarda određena je pomoću srednje vrijednosti dobivenih površina pikova za otopine standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola pri tri različite koncentracije te pomoću relativnih standardnih odstupanja dobivenih pikova. U tablici 10 prikazani su rezultati ponovljivosti pripreme otopina standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola pri tri različite koncentracije.

Tablica 10. Rezultati ponovljivosti mjerenja s otopinama standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola pri tri različite koncentracije (0,50; 2,50 i 5,00 mg/L)

STANDARD		α -tokoferol	β -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol
KONCENTRACIJE STANDARDNA (mg/L)		0,50	0,50	0,50	0,50
	Red. broj određivanja	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv
	1	286,00	570,20	491,70	145,10
	2	286,60	575,10	492,80	147,70
	3	291,10	568,30	488,60	144,40
	4	282,60	569,00	493,30	142,90
	5	281,50	573,30	487,40	148,20
	6	284,40	574,80	495,40	143,10
	Srednja vrijednost	285,37	571,78	491,53	145,23
	Standardna devijacija	3,42	2,99	3,01	2,26
	Koeficijent varijabilnosti (%)	1,20	0,52	0,61	1,56

Tablica 10. Rezultati ponovljivosti mjerenja s otopinama standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola pri tri različite koncentracije (0,50; 2,50 i 5,00 mg/L) – nastavak

KONCENTRACIJE STANDARDA (mg/L)		2,50	2,50	2,50	2,50
	Red. broj određivanja	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv
	1	841,00	1126,50	1467,50	726,60
	2	843,30	1127,30	1462,50	730,10
	3	847,40	1128,80	1471,20	722,90
	4	839,50	1130,30	1472,50	724,80
	5	838,90	1124,70	1461,90	726,80
	6	842,60	1123,50	1466,60	729,20
Srednja vrijednost		842,12	1126,85	1467,03	726,73
Standardna devijacija		3,10	2,52	4,35	2,68
Koeficijent varijabilnosti (%)		0,37	0,22	0,30	0,37
KONCENTRACIJE STANDARDA (mg/L)		5,00	5,00	5,00	5,00
	Red. broj određivanja	Odziv	Odziv	Odziv	Odziv
	1	1609,80	1947,60	2919,40	1454,00
	2	1610,50	1950,70	2920,90	1455,60
	3	1604,90	1951,40	2921,50	1457,70
	4	1607,80	1945,90	2917,40	1452,90
	5	1611,90	1944,30	2915,50	1453,30
	6	1613,10	1950,40	2914,70	1454,20
Srednja vrijednost		1609,67	1948,38	2918,23	1454,62
Standardna devijacija		2,96	2,90	2,82	1,77
Koeficijent varijabilnosti (%)		0,18	0,15	0,10	0,12

Dobivene RSD vrijednosti površina pikova za otopine standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola koncentracije 0,50 mg/L određene su u rasponu od 0,52 do 1,56 %. S druge strane, RSD vrijednosti površina pikova za otopine standarda koncentracije 2,50 i 5,00 mg/L su niže

od 0,50 %. Sve dobivene RSD vrijednosti površina pikova za otopine standarda pri tri različite koncentracije nalaze se unutar kriterija prihvatljivosti preciznosti metode prema tablici 5 ($RSD \leq 5\%$).

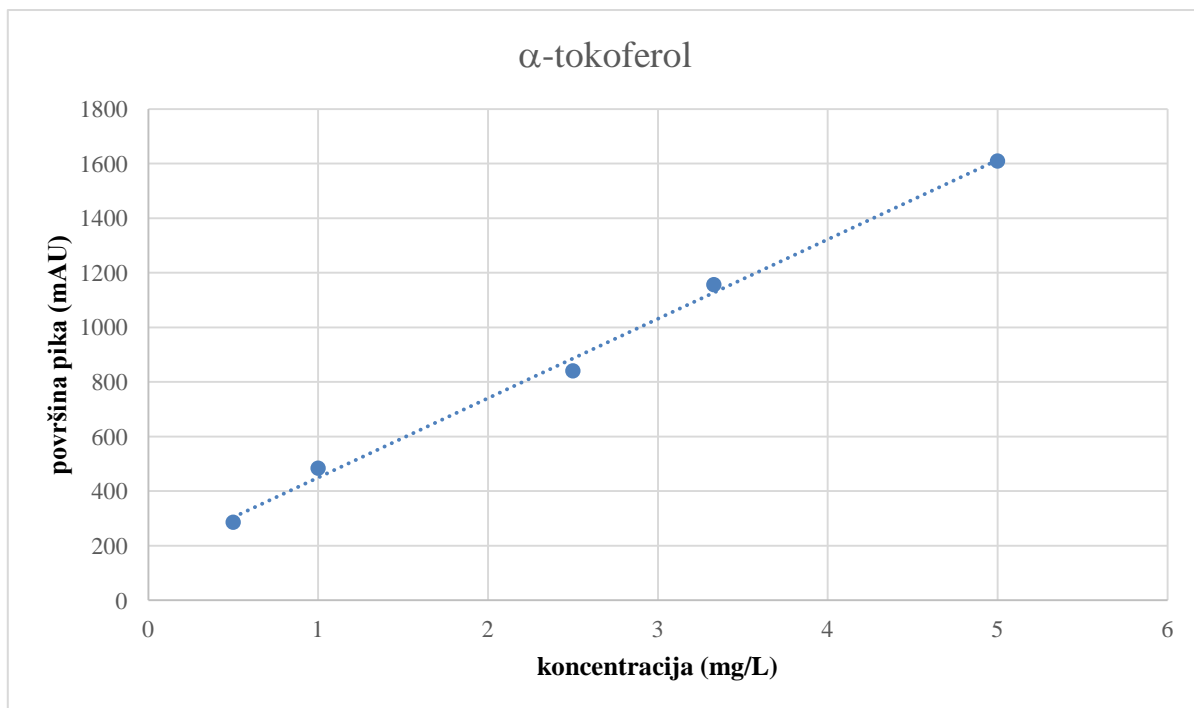
Prema Lazariću i Gašljeviću (2006) precizna metoda za određivanje sadržaja u prehrambenim i ekološkim uzorcima je ona u kojima se RSD vrijednosti nalaze između 2 i 20 %, dok *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) naglašava da granice prihvatljivosti RSD vrijednosti za preciznost metode ovise o koncentraciji analita i mogu biti u rasponu 1,3-30 % (Taverniers i sur., 2004). Horwitzova funkcija predstavlja empirijski odnos između preciznosti analitičke metode i koncentracije analite bez obzira na prirodu analita i korištene metode. Prema Horwitzovoj funkciji granice prihvatljivosti RSD vrijednosti za preciznost metode su 2-45,3 %, pri čemu se veća varijabilnost očekuje pri nižim koncentracijama analita, koje su u blizini LOD (Taverniers i sur., 2004). S obzirom da su sve dobivene RSD vrijednosti unutar kriterija prihvatljivosti, metoda se može ocijeniti preciznom te kao takva upotrebljavati za određivanje tokoferola.

4.4 ANALITIČKA SVOJSTVA METODE

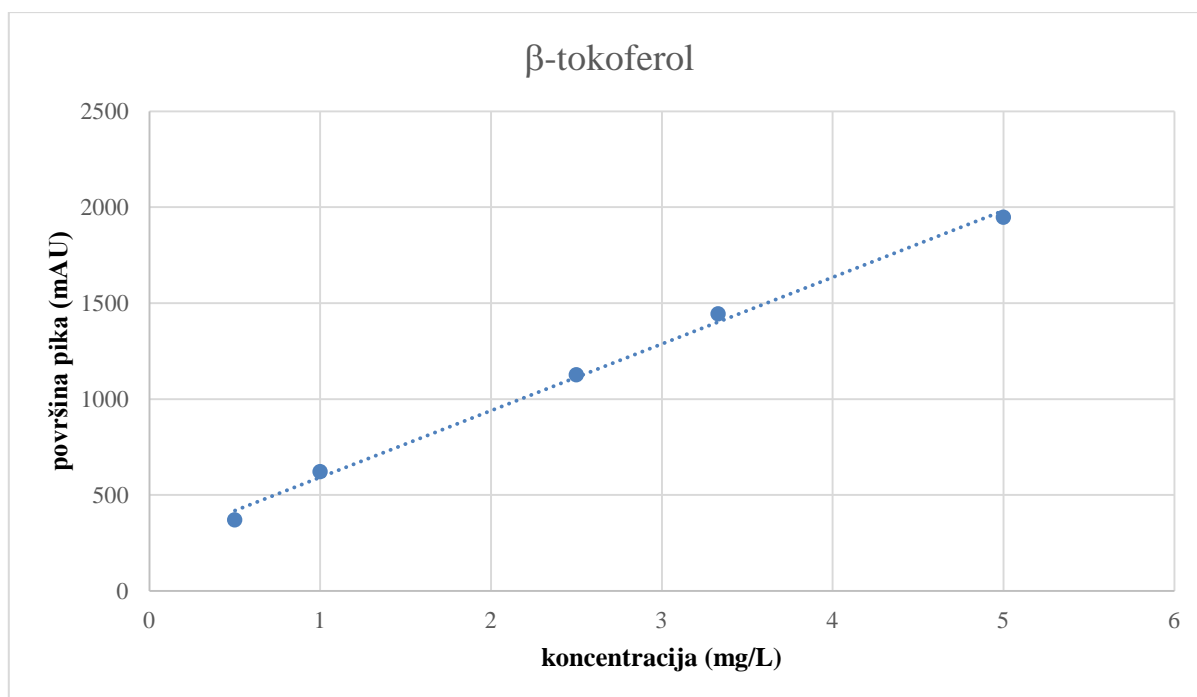
4.4.1 Linearnost metode, granica detekcije i granica kvantifikacije

Linearnost metode određena je izradom baždarnih krivulja za otopine standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola, u širokom rasponu koncentracija. Otopine standarda poznate koncentracije (u rasponu od 0,50 do 5,00 mg/L) injektirane su šest puta, a potom se iz dobivenih površina pikova izračuna srednja vrijednost. Zatim se, za svaki standard tokoferola (α -, β -, γ - i δ -tokoferol), metodom linearne regresije izrađuje kalibracijski pravac koji pokazuje ovisnost površine pikova o koncentraciji analita. Na slikama 12-15 prikazana je ovisnost površine pika o koncentraciji analita za otopine standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola. U tablici 11 navedene su izračunate jednadžbe pravca s naznačenim koeficijentima determinacije za sve otopine standarda.

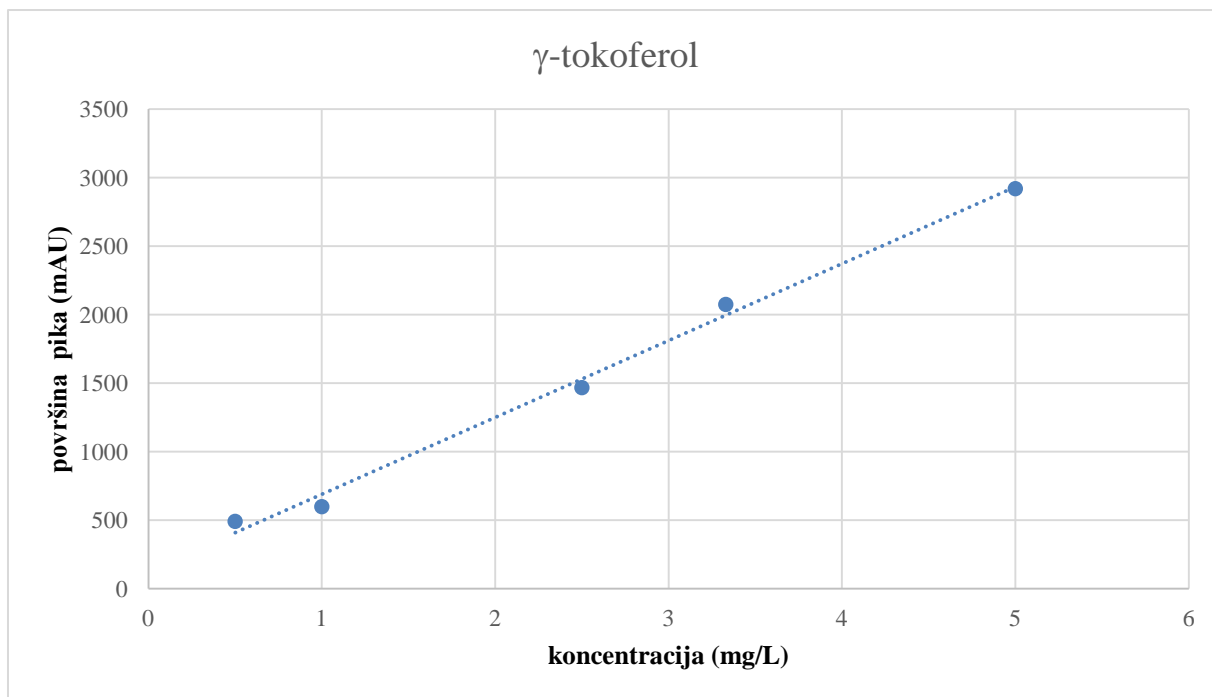
Granica detekcije i granica kvantifikacije dobivene su statističkom procjenom, na osnovu nagiba i standardnog odstupanja regresijskog pravca. Pravac je dobiven linearnom regresijom podataka dobivenih ispitivanjem tri najniže koncentracije standardnih otopina α -, β -, γ - i δ -tokoferola. U tablici 11 prikazani su rezultati ispitivanja granice detekcije i granice kvantifikacije.



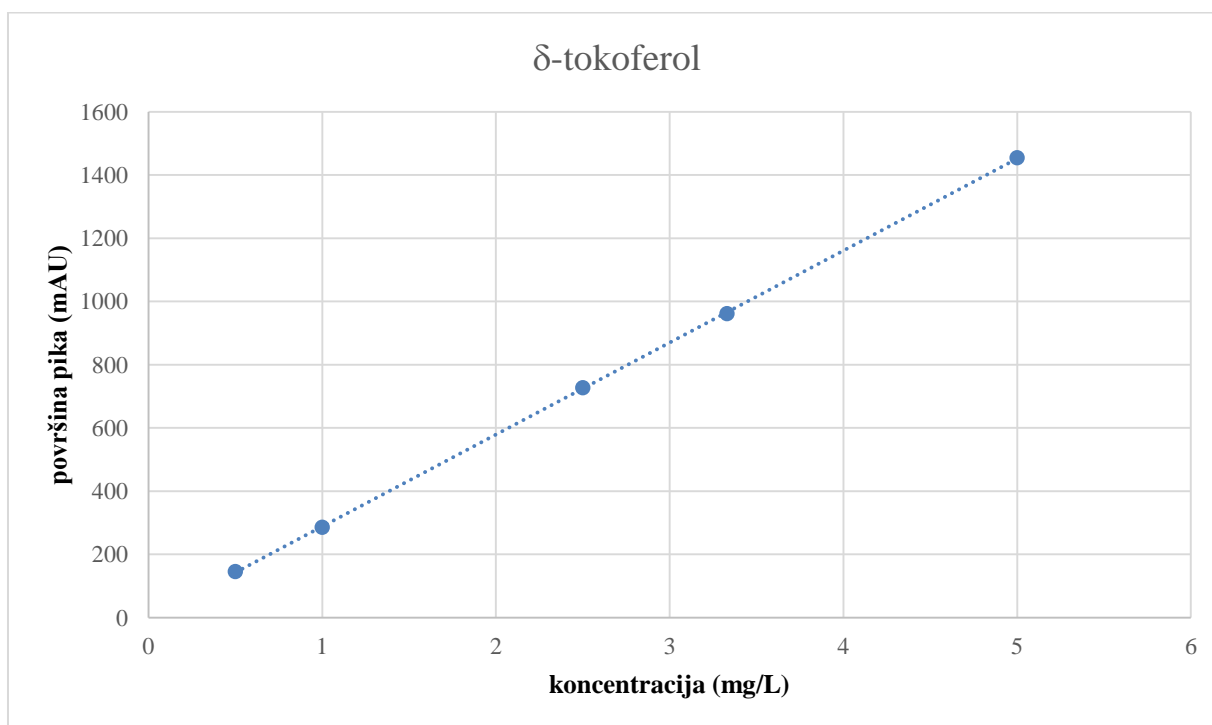
Slika 12. Kalibracijski pravac za otopinu standarda α -tokoferola



Slika 13. Kalibracijski pravac za otopinu standarda β -tokoferola



Slika 14. Kalibracijski pravac za otopinu standarda γ -tokoferola



Slika 15. Kalibracijski pravac za otopinu standarda δ -tokoferola

Tablica 11. Analitička svojstva metode s rezultatima ispitivanja linearnosti te granica detekcije i kvantifikacije za otopine standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola

STANDARD	POČETNA KONCENTRACIJA (mg/L)	PODRUČJE LINEARNOSTI (mg/L)	JEDNADŽBA PRAVCA	KOEFICIJENT DETERMINACIJE	LIMIT DETEKCIJE LOD (mg/L)	LIMIT KVANTIFIKACIJE LOQ (mg/L)
α -tokoferol	50 mg/L	0,5 do 5,0	$y=290,84x + 158,49$	0,996	0,6154	1,8649
β -tokoferol	50 mg/L	0,5 do 5,0	$y=347,58x + 244,83$	0,996	0,4695	1,4226
γ -tokoferol	50 mg/L	0,5 do 5,0	$y=560,99x + 127,00$	0,995	0,7477	2,2658
δ -tokoferol	50 mg/L	0,5 do 5,0	$y=290,98x - 3,1899$	1,000	0,0503	0,1525

Iz grafičkih prikaza ovisnosti odziva detektora (površine pika mAU) o koncentraciji analita (slike 12-15) za otopine standarda tokoferola vidljivo je da porastom koncentracije analita u otopini linearno raste i površina pika. Linearne kalibracijske krivulje konstruirane su unutar raspona 0,50 do 5,00 mg/L. Na temelju kalibracijskih krivulja dobiju se jednadžbe pravca koje su dobre linearnosti, što potvrđuju vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2) koje se kreću od 0,995 do 1,000 (tablica 11), pri čemu odgovaraju postavljenim kriterijima prihvatljivosti ($R^2 \geq 0,995$) prema tablici 5.

Rezultati osjetljivosti metode (tablica 11) pokazuju kako je najniži LOD i LOQ izračunat za δ -tokoferol te je iznosio 0,0503 mg/L, odnosno 0,1525 mg/L iz čega se može zaključiti kako FD detektor pokazuje najveću osjetljivost na δ -tokoferol. S druge strane, najviši LOD i LOQ izračunat je za γ -tokoferol, a iznosio je 0,7477 mg/L, odnosno 2,2658 mg/L. LOD i LOQ za δ -tokoferol vrlo su niski te su od vrijednosti LOD i LOQ za γ -tokoferol niži oko 15 puta, a od vrijednosti LOD i LOQ za β - i α -tokoferole 10-12 puta. S obzirom da tokoferoli ne pokazuju nikakav štetan utjecaj na zdravlje i okoliš, ne postoje nikakve granice za dopuštene vrijednosti LOD i LOQ te se smatra da je HPLC metoda prikladna i dovoljno osjetljiva za identifikaciju i kvantifikaciju ispitivanih tokoferola.

4.5 IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA TOKOFEROLA U UZORCIMA ULJA PASJEG TRNA

Tokoferoli u uzorcima ulja pasjeg trna identificiraju se usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenima zadržavanja standarda. Nakon identifikacije provedena je i kvantifikacija, tj. određivanje udjela identificiranih tokoferola u uzorcima ulja pasjeg trna. Prema jednadžbama baždarnih krivulja (tablica 11) dobivenih metodom linearne regresije određene su masene koncentracije pojedinačnih tokoferola u

uzorcima ulja pasjeg trna te dobivene vrijednosti preračunate prema formuli [6] u masene udjele (mg/g) koji su predočeni u tablici 12.

Maseni udio pojedinačnih tokoferola u ulju (mg/g):

$$\omega (\text{tokoferol}_i) = \frac{\gamma_i * V}{m} \quad [6]$$

gdje je :

γ_i = koncentracija (α -, β -, γ - i δ -) tokoferola (mg/L)

V = volumen pripremljenog ekstrakta uzorka (L)

m = masa uzorka uzetog za analizu (g) (tablica 6)

Tablica 12. Vrijeme zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) i maseni udjeli detektiranih tokoferola u uljima pasjeg trna

UZORAK	NAČIN EKSTRAKCIJE	VRIJEME ZADRŽAVANJA (min)	ω (α -tokoferol) mg/100 g ulja
Ulje sorte A (<i>Leikora</i>)	superkritični CO ₂	2,27	53,43 ± 0,14
Ulje sorte B (<i>Ascola</i>)		2,37	44,50 ± 0,16
Ulje sorte A (<i>Leikora</i>)	Soxhlet ekstrakcija	2,38	41,79 ± 0,22
Ulje sorte B (<i>Ascola</i>)		2,40	34,74 ± 0,17

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

Na temelju usporedbe vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) uzoraka ulja (tablica 12) s vremenima zadržavanja standarda (tablica 9), vidljivo je kako je u svim uzorcima ulja bobica pasjeg trna detektiran jedino α -tokoferol. Maseni udjeli detektiranog α -tokoferola u uzorcima ulja bobica pasjeg trna određeni su u rasponu od 34,74 (ulje sorte B (*Ascola*), Soxhlet ekstrakcija) do 53,43 mg/100 g (ulje sorte A (*Leikora*), ekstrakcija superkritičnim CO₂).

U istraživanju koje su proveli Zadernowski i sur. (2003) uz α -tokoferol kvalitativno su odredili i δ -tokoferol kod 6 različitih uzoraka ulja zrelih bobica pasjeg trna. Osim toga, u pojedinim uzorcima ulja identificiran je i γ -tokoferol u tragovima. Ovisno o sorti, maseni udjeli α -tokoferola određeni su u rasponu od 63,4 do 83,3 mg/100 g ulja, a maseni udjeli δ -tokoferola između 10,2-38,6 mg/100 g ulja. Nadalje, Beveridge i sur. (1999) te Kallio i sur. (2002) su u provedenim istraživanjima pronašli i male količine β -tokoferola u uzorcima ulja bobica pasjeg trna, dok je Dragičević (2021) u ulju pulpe pasjeg trna kvantificirala samo α -tokoferol, i to s masenim udjelom 112,04 mg/100 g ulja. Yang i sur. (2011) identificirali i kvantificirali su α - (90 mg/100 g ulja) i γ -tokoferol (80 mg/100 g ulja) u ulju sjemenki pasjeg

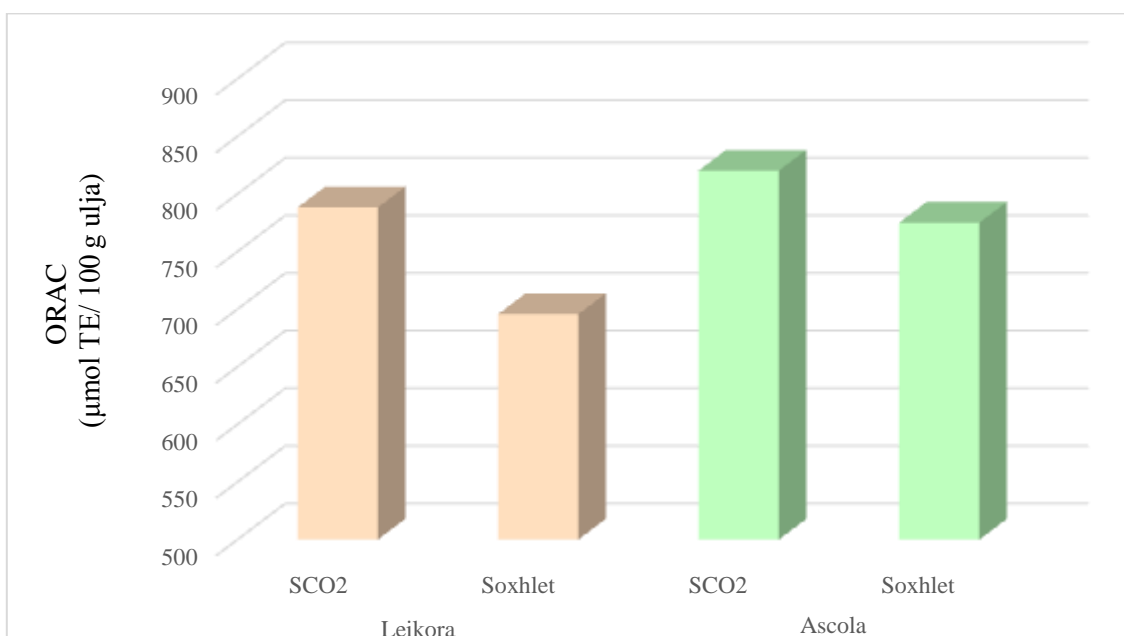
trna, ali i u ulju pulpe pasjeg trna, s masenim udjelom 120 mg α -tokoferola/100 g ulja, odnosno 50 mg γ -tokoferola/100 g ulja.

Usporedbom vrijednosti dobivenih u ovom radu s vrijednostima iz prethodno spomenutih istraživanja uočene su značajne razlike koje mogu biti posljedica razlika u sortama, s obzirom da su istraživanja provedena na različitim sortama pasjeg trna, ali i posljedica geografskih i klimatskih faktora. U istraživanju koje su proveli Zadernowski i sur. (2003) zabilježen je i utjecaj zrenja bobica na sadržaj tokoferola u pasjem trnu. Tako je najviši udio α -tokoferola zabilježen u uzorcima pasjeg trna ubranim u rujnu (74,9 mg/100 g ulja), dok je u navedenom razdoblju udio γ - i δ -tokoferola bio izrazito nizak. Također, iz navedenih literaturnih podataka može se zaključiti kako velik utjecaj na sadržaj tokoferola ima i izbor sirovine korištene za dobivanje ulja, s obzirom da pojedini uzorci ulja dobiveni iz različitih dijelova pasjeg trna (pulpa, sjemenke ili bobice) sadrže različite udjele tokoferola, jer im je i kemijski sastav prilično različit. Još jedan od razloga neusklađenosti u dobivenim rezultatima su i različiti uvjeti provedbe HPLC metode odnosno otapala korištenih za analizu. Međutim, zbog strukturne sličnosti izomera tokoferola, iznimno je važno pravilno procijeniti kromatografske uvjete, uključujući i izbor mobilne faze, kako bi se postiglo adekvatno odvajanje sva četiri izomera tokoferola s visokom osjetljivošću. Yang i sur. (2011) su kao mobilnu fazu koristili smjesu otapala metanol:acetonitril:voda (50:44:6, v/v/v), dok je u istraživanju, koje su proveli Zadernowski i sur. (2003), kao mobilna faza korištena smjesa otapala heksan:dietil eter (95:5, v/v). Nadalje, Saha i sur. (2013) su koristili četiri različite mobilne faze za odvajanje tokoferola te su utvrdili kako metanol:tert-butil metil eter (TBME) u omjeru 95:5 (v/v), pri brzini protoka od 0,75 mL/min daje najbolje rezultate, u usporedbi s metanolom, metanol:acetonitril:diklormetanom (50:44:6, v/v/v) i acetonitril:tetrahidrofuran:vodom (70:20:10, v/v/v). Zaključeno je kako je dodatak tert-butil metil etera (TBME) u metanol bio potreban za poboljšanje odvajanja β - i γ -tokoferola, iako sam metanol daje slične rezultate (Saha i sur., 2013).

4.6 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA LIPOFILNOM ORAC METODOM

Antioksidacijski kapacitet ekstrakata određen je lipofilnom ORAC metodom, gdje se mjerenje provodi spektrofluorimetrijski pri temperaturi 37 °C uz λ eks. 493 nm i λ em. 515 nm. Trolox služi kao standard za izradu baždarnog pravca, a 7 % RMCD služi kao slijepa proba.

Mjerenje je provedeno u duplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su kao prosječne vrijednosti dvaju mjerenja. ORAC vrijednosti izražavaju se $\mu\text{mol TE/L}$, tj. preračunato na 100 g ulja kao $\mu\text{mol TE/100 g ulja}$. Na slici 16 prikazani su rezultati određivanja ORAC vrijednosti ispitivanih uzoraka ulja pasjeg trna.



Slika 16. ORAC vrijednosti ispitivanih uzoraka ulja pasjeg trna

Antioksidacijski kapaciteti (AOK) uzoraka ulja bobica pasjeg trna određenih ORAC metodom bili su u rasponu od 695,68 do 820,26 $\mu\text{mol TE/100 g ulja}$ (slika 16). Kao i kod određivanja udjela tokoferola, vidljivo je kako uzorci ulja sorte A (*Leikora*) i ulja sorte B (*Ascola*) dobiveni ekstrakcijom superkričnim CO_2 pokazuju viši AOK (788,26 i 820,26 $\mu\text{mol TE/100 g ulja}$), u odnosu na iste sorte ulja koje su dobivene Soxhlet ekstrakcijom (695,68 i 775,07 $\mu\text{mol TE/100 g ulja}$), što je u skladu s višim masenim udjelima α -tokoferola u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom SCO_2 . Usporedbom dobivenih rezultata, može se uočiti kako uzorci ulja sorte B (*Ascola*) pokazuju viši AOK (820,26 i 775,07 $\mu\text{mol TE/100 g ulja}$), u

odnosu na uzorke ulja sorte A (*Leikora*) (788,26 i 695,68 μ mol TE/100 g ulja).

U istraživanju kojeg su proveli Yang i sur. (2011) AOK ulja pulpe pasjeg trna iznosio je 1134 μ mol TE/100 g ulja, a AOK ulja iz sjemenki pasjeg trna 1323 μ mol TE/100 g ulja. S druge strane, Zheng i sur. (2017) odredili su AOK u ulju pulpe pasjeg trna koji je iznosio 1578 μ mol TE/100 g ulja, dok je u ulju iz sjemenki pasjeg trna AOK iznosio 8509 μ mol TE/100 g ulja. Iz navedenih literaturnih podataka vidljivo je kako veliki utjecaj na AOK ima izbor sirovine korištene za dobivanje ulja, odnosno ulja dobivena iz sjemenki pasjeg trna pokazuju viši AOK od ulja dobivenih iz pulpe.

Usporedbom rezultata dobivenih u ovom radu s vrijednostima iz prethodno spomenutih istraživanja uočene su značajne razlike. Mogući uzroci odstupanja rezultata, uz već spomenuti izbor dijela biljke za dobivanje ulja, mogu biti i razlike između sorti, s obzirom da su sva ispitivanja provedena na različitim sortama. Nadalje, većina biljaka uzgojena je na različitim geografskim područjima, a samim time i pod različitim klimatskim uvjetima. Svi prethodno navedeni uzroci utječu na kemijski sastav ulja, a samim time i na prisutnost fenolnih spojeva, koji su u značajnoj korelaciji s antioksidativnim kapacitetom.

4.7 UTJECAJ SORTE I NAČINA EKSTRAKCIJE NA MASENI UDIO α -TOKOFEROLA I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET ULJA BOBICA PASJEG TRNA

Rezultati statističke analize određivanja pojedinačnog i kombiniranog utjecaja sorte i načina ekstrakcije na maseni udio α -tokoferola u uzorcima ulja pasjeg trna i AOK uzoraka prikazani su u tablicama 13 i 14.

Tablica 13. Pojedinačni utjecaj sorte pasjeg trna i načina ekstrakcije na maseni udio α -tokoferola i antioksidacijsku aktivnost ulja bobica pasjeg trna

	α-tokoferol (mg/100 g ulja)	ORAC (μ mol TE/100 g ulja)
Sorta		
<i>Leikora</i>	47,61 \pm 0,07 ^b	741,97 \pm 4,46 ^a
<i>Ascola</i>	39,62 \pm 0,07 ^a	797,67 \pm 4,46 ^b
Ekstrakcija		
SCO ₂	48,97 \pm 0,07 ^b	804,26 \pm 4,46 ^b
Soxhlet	38,27 \pm 0,07 ^a	735,38 \pm 4,46 ^a

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna greška.

Tablica 14. Kombinirani utjecaj sorte pasjeg trna i načina ekstrakcije na maseni udio α -tokoferola i antioksidacijsku aktivnost ulja bobica pasjeg trna

		α -tokoferol (mg/100 g ulja)	ORAC (μ mol TE/100 g ulja)
Sorta	Ekstrakcija		
<i>Leikora</i>	SCO ₂	53,43 \pm 0,11 ^d	788,26 \pm 6,31 ^a
	Soxhlet	41,79 \pm 0,11 ^b	695,68 \pm 6,31 ^b
<i>Ascola</i>	SCO ₂	44,50 \pm 0,11 ^c	820,26 \pm 6,31 ^b
	Soxhlet	34,74 \pm 0,11 ^a	775,07 \pm 6,31 ^c

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna greška.

Iz dobivenih rezultata statističke analize (ANOVA) uočljivo je kako izbor sorte i primijenjeni način ekstrakcije statistički značajno utječu na maseni udio α -tokoferola u uzorcima ulja.

Rezultati analize određivanja pojedinačnog utjecaja sorte pokazuju kako sorta *Ascola* sadrži niži maseni udio α -tokoferola (39,62 \pm 0,07 mg/100 g ulja) u odnosu na sortu *Leikora* (47,61 \pm 0,07 mg/100 g ulja), dok se ekstrakcija superkričnim CO₂ pokazala značajno učinkovitijom (48,97 \pm 0,07 mg/100 g ulja) naspram Soxhlet ekstrakcije (38,27 \pm 0,07 mg/100 g ulja). Rezultati statističke analize kombiniranog utjecaja sorte i ekstrakcijske tehnike su pokazali da je najviši maseni udio α -tokoferola određen u ulju sorte *Leikora* koji je dobiven ekstrakcijom superkričnim CO₂ (53,43 \pm 0,11 mg/100 g ulja), dok je najniži maseni udio α -tokoferola određen u ulju sorte *Ascola* dobivenim Soxhlet ekstrakcijom (34,74 \pm 0,11 mg/100 g ulja). Različiti načini ekstrakcije značajno su utjecali na masene udjele α -tokoferola, pri čemu su ekstrakcijom superkričnim CO₂ (*Leikora*: 53,43 \pm 0,11 mg/100 g ulja; *Ascola*: 44,50 \pm 0,11 mg/100 g ulja) dobiveni značajno viši maseni udjeli α -tokoferola, u odnosu na Soxhlet ekstrakciju (*Leikora*: 41,79 \pm 0,11 mg/100 g ulja ; *Ascola*: 34,74 \pm 0,11 mg/100 g ulja) kod obje ispitivane sorte.

Prema dobivenim rezultatima utvrđeno je da je pojedinačni utjecaj sorte te načina ekstrakcije statistički značajno utjecao i na AOK uzoraka ulja pasjeg trna. Ulje sorte *Ascola* pokazalo je viši AOK (797,67 \pm 4,46 μ mol TE/100 g ulja) u odnosu na ulje sorte *Leikora* (741,97 \pm 4,46 μ mol TE/100 g ulja), dok je ekstrakcija superkričnim CO₂, kao i kod određivanja udjela α -tokoferola pokazala bolje rezultate (804,26 \pm 4,46 μ mol TE/100 g ulja) u odnosu na Soxhlet ekstrakciju (735,38 \pm 4,46 μ mol TE/100 g ulja). Kod kombiniranog utjecaja, najviši AOK zabilježen je u ulju sorte *Ascola* dobivenog ekstrakcijom superkričnim CO₂ (820,26 \pm 6,31 μ mol TE/100 g ulja), dok je ulje sorte *Leikora* dobiveno Soxhlet

ekstrakcijom pokazalo najniži AOK ($695,68 \pm 6,31 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g ulja}$).

Na AOK, uz tokoferole, utječu i ostali bioaktivni spojevi. Ulje pasjeg trna bogato je karotenoidima (β -karoten), masnim kiselinama (1:1 omjer omega-3 i omega-6), tokoferolima, tokotrienolima i fitosterolima, pri čemu većina spojeva predstavlja antioksidanse koji neutraliziraju slobodne radikale (Russia, 2011). Prema tome, ulje sorte *Ascola* vjerojatno je bogatije ostalim spojevima (karotenoidi, masne kiseline, tokotrienoli, fitosteroli), u odnosu na sortu *Leikora* te zbog toga pokazuje viši AOK, iako sadrži niži maseni udio α -tokoferola. Prethodno provedena istraživanja pokazala su kako je antioksidacijsko djelovanje rezultat kombinacije svake od komponenti složene smjese te da se može promatrati sinergijski ili antagonistički učinak, ovisno o okruženju (Pop i sur., 2015). Kod određivanja AOK čistih spojeva, karoteni (β -karoten, likopen) su pokazali viši kapacitet od ksantofila (lutein, zeaksantin, β -kriptoksantin) i svi su imali viši AOK od α -tokoferola (Müller i sur., 2011). Bobice pasjeg trna imaju visok sadržaj mikronutrijenata, uključujući lipofilne i hidrofilne antioksidanse (Bal i sur., 2011). Fenolni spojevi i vitamin C najsnažniji su hidrofilni antioksidansi, ali se njihova koncentracija smanjuje tijekom sazrijevanja plodova pasjeg trna, kao i hidrofilni AOK. S druge strane, tijekom sazrijevanja plodova, dolazi do nakupljanja karotenoida i tokoferola, pri čemu se povećava AOK lipofilnih ekstrakta bobica pasjeg trna (Gao i sur., 2000). Naposljetku, potrebna su dodatna istraživanja kemijskog sastava korištenih sorti, kako bi se detaljnije objasnili dobiveni rezultati.

5 ZAKLJUČCI

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

1. Validacija metode provedena je prema protokolu te pri definiranim optimalnim uvjetima. Ključni validacijski parametri bili su selektivnost, točnost, preciznost, linearnost te granice detekcije i kvantifikacije.
2. Selektivnost metode utvrđena je pregledom kromatograma, pri čemu je dokazano kako interferirajući spojevi ne utječu na određivanje tokoferola u ulju pasjeg trna. Također, uočena je i zadovoljavajuća razdvojenost pikova, što dokazuje da je metoda selektivna.
3. Preciznost metode određena je kroz ponovljivost injektiranja te ponovljivost pripreme otopine standarda. Rezultati ispitivanja preciznosti pokazuju da dobivene vrijednosti relativne standardne devijacije (do 3,64 %) za otopine standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti ($RSD \leq 5\%$) te se metoda može smatrati preciznom i kao takva koristiti za određivanje tokoferola.
4. Koeficijenti determinacije baždarnih dijagrama za otopine standarda α -, β -, γ - i δ -tokoferola određeni su u rasponu od 0,995 do 1,000 i odgovaraju postavljenim kriterijima prihvatljivosti ($R^2 \geq 0,995$) te ukazuju na odgovarajuću linearnost u definiranom radnom području.
5. Iz dobivenih rezultata ispitivanja granica detekcije (0,0503-0,7477 mg/L) i kvantifikacije (0,1525-2,2658 mg/L) može se zaključiti da je metoda prikladna i dovoljno osjetljiva za identifikaciju i kvantifikaciju ispitivanih tokoferola.
6. Na temelju usporedbe vremena zadržavanja razdvojenih spojeva s vremenima zadržavanja standarda, u svim uzorcima ulja bobica pasjeg trna identificiran i kvantificiran je α -tokoferol u masenim udjelima od 34,74 do 53,43 mg/100 g. Na temelju statističke analize, odabir načina ekstrakcije, kao i izbor sorte značajno je utjecao na maseni udio α -tokoferola u uzorcima ulja. Dokazano je kako ekstrakcija superkritičnim CO₂ pokazuje bolje rezultate u odnosu na Soxhlet ekstrakciju, dok ulje sorte *Leikora* sadrži viši udio α -tokoferola u odnosu na ulje sorte *Ascola*.
7. Prema dobivenim rezultatima statističke analize uočen je značajan utjecaj izbora sorte i načina ekstrakcije na antioksidacijski kapacitet uzoraka ulja pasjeg trna, pri čemu je ulje sorte *Ascola* pokazalo viši antioksidacijski kapacitet u odnosu na ulje sorte *Leikora*. S druge strane, ekstrakcija superkritičnim CO₂, kao i kod određivanja udjela α -tokoferola pokazala je bolje rezultate u odnosu na Soxhlet ekstrakciju.

6 LITERATURA

Akash MSH, Rehman K (2020) High performance liquid chromatography. *Essent Pharm Anal*, 175-184. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7_14

Anonymus 1, Pasji trn, 2022., <https://www.eatweeds.co.uk/sea-buckthorn-elaegnus-rhamnoides> Pristupljeno 20. lipnja 2022.

Arif S, Ahmed SD, Shah AH, Hassan L, Awan SI, Hamid A, i sur. (2010) Determination of optimum harvesting time for Vitamin C, oil and mineral elements in berries sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). *Pak J Bot* **42**(5), 3561-3568.

Arumughan C, Venugopalan VV, Ranjith A, Sarinkumar K, Mangalagowri P, Sawhney RC, i sur. (2004) A novel green approach to the integrated processing of sea buckthorn berries for therapeutic and nutraceutical values. *Indian Patent*, 648.

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>

Beveridge T, Li TS, Oomah BD, Smith A (1999) Sea buckthorn products: manufacture and composition. *J Agr Food Chem* **47**(9), 3480-3488. <https://doi.org/10.1021/jf981331m>

Birringer M, Siems K, Maxones A, Frank J, Lorkowski S (2018) Natural 6-hydroxychromanols and-chromenols: Structural diversity, biosynthetic pathways and health implications. *RSC advances* **8**(9), 4803-4841. <https://doi.org/10.1039/C7RA11819H>

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

Causon R (1997) Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J Chrom B: Biomed Scien and Applic* **689**(1), 175–180. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(96\)00297-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(96)00297-6)

Cenkowski S, Yakimishen R, Przybylski R, Muir WE (2006) Quality of extracted sea buckthorn seed and pulp oil. *Can Bios Eng* **48**, 3. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=8ad968ab01c760883b2ce1614fa8ab0d6ec1aa54>

Dhyani D, Maikhuri RK, Rao KS, Kumar L, Purohit VK, Sundriyal M, i sur. (2007) Basic nutritional attributes of *Hippophaë rhamnoides* (sea buckthorn) populations from Uttarakhand Himalaya, India. *Curr Sci India* **92**(8), 1148–1152. <https://www.jstor.org/stable/24097636>

Dragičević M (2021) Optimiranje proizvodnje praha ulja pulpe pasjeg trna primjenom sušenja raspršivanjem (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

EURACHEM (2011) The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. EURACHEM - Network of Organization dealing with chemical measurements https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf
Pristupljeno 12. srpnja 2022.

Fu L, Su H, Li R, Cui Y (2014) Harvesting technologies for sea buckthorn fruit. *Eng Agric Environ Food* **7**(2), 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.eaef.2013.10.002>

Gao X, Ohlander M, Jeppsson N, Björk L, Trajkovski V (2000) Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *J Agric Food Chem* **48**(5), 1485-1490. <https://doi.org/10.1021/jf991072g>

Garrett AR, Murray BK, Robison RA, O'Neill KL (2010) Measuring Antioxidant Capacity Using the ORAC and TOSC Assays. In: Armstrong, D. (eds) *Advanced Protocols in Oxidative Stress II. Methods Mol Biol* **594**. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_17

GBIF (2022) *Hippophae* L. in GBIF Secretariat. GBIF-Global Biodiversity Information Facility, <https://www.gbif.org/species/3039284>. Pristupljeno 5. prosinca 2022.

Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C (2007) PDR for herbal medicines, 4. izd., Thomson Reuters, Montvale, NJ.

Gupta V, Jain ADKJ, Gill NS, Guptan K (2012) "Development and validation of HPLC method - a review ", *Int Res J Pharm Appl Scien* **2**(4), 7-25. <https://scienztech.org/index.php/irjpas/article/view/307>. Pristupljeno 15. Srpnja 2022.

Huber L (2007) Validation and Qualification in Analytical Laboratories, 2. izd. CRC Press. <https://doi.org/10.3109/9780849382680>

ICH Guideline (2005) Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, <https://somatek.com/wp-content/uploads/2014/06/sk140605h.pdf>. Pristupljeno 15. srpnja 2022.

ISO (1994) ISO Guide 5725 - Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. ISO-International Organization for Standardization, <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:5725:-1:ed-1:v1:en>. Pristupljeno 13. srpnja 2022.

IUPAC (2002) Technical Report: Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl Chem* **74**, 835-855. IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry, North Carolina. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>

Jadaun GPS, Dixit S, Saklani V, Mendiratta S, Jain R, Singh S (2017) HPLC for Peptides and Proteins: Principles, Methods and Applications. *Pharm Methods* **8**(1), 1-6. DOI : 10.5530/phm.2017.8.1.

Jiang Q (2017) Natural forms of vitamin E as effective agents for cancer prevention and therapy. *Adv Nutr* **8**(6), 850-867. <https://doi.org/10.3945/an.117.016329>

Kallio H, Yang B, Peippo P (2002b) Effects of different origins and harvesting time on vitamin C, tocopherols, and tocotrienols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries. *J Agric Food Chem* **50**(21), 6136-6142. <https://doi.org/10.1021/jf020421v>

Kallio H, Yang B, Peippo P, Tahvonen R, Pan R (2002a) Triacylglycerols, Glycerophospholipids, Tocopherols, and Tocotrienols in Berries and Seeds of Two Subspecies (ssp. *Sinensis* and *Mongolica*) of Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*). *J Agric Food Chem* **50**, 3004–3009. <https://doi.org/10.1021/jf011556o>

Kalra K (2011) Method Development and Validation of Analytical Procedures. Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas. InTech. DOI: 10.5772/19894

Kazakevich YV, Lobrutto R (2006) HPLC for pharmaceutical scientists. John Wiley & Sons, New Jersey.

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)

Kumar R, Kumar GP, Chaurasia OP, Shashi Bala Singh (2011) Phytochemical and Pharmacological profile of seabuckthorn oil: A review. *Res J Med Plant* **5**, 491-499. <https://scialert.net/abstract/?doi=rjmp.2011.491.499>

Kumar Y, Mumtaz SD, Ahmad M (2018) HPLC: Principle and Maintenance with Application. *Int J Trend Res Dev* **2**, 1618 - 1626. <https://doi.org/10.31142/ijtsrd17134>

Lazarić K (2012) Validacija analitičkih metoda–osnovna načela. *Svijet po mjeri* **1**(1), 61-64.

Lazarić K, Gašljević V (2006) Validacija analitičkih metoda. Seminar "Svijet po mjeri". Hrvatsko mjeriteljsko društvo.

Lõugas T (2006) Study on physico-chemical properties and some bioactive compounds of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) (Dissertation), Tallinn University of Technology, Tallinn, Estonia. TUT Press.

Magnusson B, Örnemark U (2014) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf.

Pristupljeno: 17. srpnja 2022.

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

Müller L, Fröhlich K, Böhm V (2011) Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chem* **129**(1), 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.045>

Parimelazhagan T, Chaurasia OP, Ahmed Z (2005) Seabuckthorn: Oil with promising medicinal value. *Curr Sci* **88**(1), 8-9. <https://www.jstor.org/stable/i24110070>

Partanen R, Yoshii H, Kallio H, Yang B, Forsell P (2002) Encapsulation of sea buckthorn kernel oil in modified starches. *J Am Oil Chem Soc* **79**, 219-223. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0464-z>

Pop EA, Diaconeasa ZM, Fetea F, Bunea A, Dulf F, Pinteau A, i sur. (2015) Carotenoids, tocopherols and antioxidant activity of lipophilic extracts from sea buckthorn berries (*Hippophae rhamnoides*), apricot pulp and apricot kernel (*Prunus armeniaca*). *B Food Sci Technol* **72**, 14-21. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:11425>

Pravilnik (2005) Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. Narodne novine 16, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_01_2_16.html. Pristupljeno 27. lipnja 2022.

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

Raut PP, Charde SY (2014) Simultaneous estimation of levodopa and carbidopa by RP-HPLC using a fluorescence detector: its application to a pharmaceutical dosage form. *Luminescence* **29**(7), 762-771. <https://doi.org/10.1002/bio.2618>

Reboul E (2017) Vitamin E bioavailability: mechanisms of intestinal absorption in the spotlight. *Antioxidants* **6**(4), 95. <https://doi.org/10.3390/antiox6040095>

Reuhs BL (2017) High-performance liquid chromatography. *Food analysis*, 213-226. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_13

Russia N (2011) Phytochemical and pharmacological profile of Seabuckthorn oil: a review. *J Med Plant Res* **5**(5), 491-499. <https://scialert.net/abstract/?doi=rjmp.2011.491.499>

Sabir AM, Moloy M, Parminder BS (2013) HPLC method development and validation: a review. *Int Res J Pharm* **4**, 39-46. DOI: 10.7897/2230-8407.04407

Saha S, Walia S, Kundu A, Pathak N (2013) Effect of mobile phase on resolution of the isomers and homologues of tocopherols on a triacontyl stationary phase. *Anal Bioanal Chem* **405**, 9285-9295. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7336-9>

Schroeder WR (2017) Sea buckthorn Propagation. *Agriculture and Agri-Food Canada*. A59-45-2017-eng.pdf (PDF, 7.28 MB)

Shahidi F, De Camargo AC (2016) Tocopherols and tocotrienols in common and emerging dietary sources: Occurrence, applications, and health benefits. *Int J Mol Sci* **17**(10), 1745. <https://doi.org/10.3390/ijms17101745>

Swiglo AG, Sikorska E, Khmelinskii I, Sikorski M (2007) Tocopherol content in edible plant oils. *Polish J Food Nutr Sci* **57**, 157–161. https://www.researchgate.net/publication/264786138_Tocopherol_content_in_edible_plant_oils

Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E (2004) Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Analyt Chem* **23**(8), 535-552. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>

Toomula N, Kumar A, Kumar S, Bheemidi VS (2011) Development and Validation of Analytical Methods for Pharmaceuticals. *J Anal Bioanal Tech* **2**, 127. doi: 10.4172/2155-9872.1000127

Wallert M, Börmel L, Lorkowski S (2021) Inflammatory diseases and vitamin E—what do we know and where do we go?. *Mol Nutr Food Res* **65**(1). <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000097>

Wang R, Zong SX, Yu LF, Lu PF, Luo YQ (2014) Rhythms of volatile release from female and male sea buckthorn plants and electrophysiological response of sea buckthorn carpenter moths. *J Plant Interact* **9**(1), 763-774. <https://doi.org/10.1080/17429145.2014.926569>

Yakimishen R, Cenkowski S, Muir WE (2005) Oil recoveries from sea buckthorn seeds and pulp. *Appl Eng Agric* **21**(6), 1047-1055. doi: 10.13031/2013.20021

Yang B (2001) Lipophilic components of seeds and berries of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) and physiological effects of sea buckthorn oils (Academic Dissertation), Department of Biochemistry and Food Chemistry, University of Turku (Finland).

Yang B, Ahotupa M, Määttä P, Kallio H (2011) Composition and antioxidative activities of supercritical CO₂-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. *Food Res Int* **44**(7), 2009-2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.025>

Yang B, Kallio H (2002) Lipophilic components in seeds and berries of sea buckthorn and physiological effects of sea buckthorn oils. *Trends Food Sci Technol* **13**, 160-167. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00136-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00136-X)

Yang B, Kallio HP (2001) Fatty acid composition of lipids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different origins. *J Agric Food Chem*, **49**(4), 1939-1947. <https://doi.org/10.1021/jf001059s>

Zadernowski R, Naczek M, Amarowicz R (2003) Tocopherols in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berry oil. *J Am Oil Chem Soc* **80**(1), 55-58. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0650-z>

Zeb A (2004) Chemical and nutritional constituents of sea buckthorn juice. *Pak J Nutr* **3**(2), 99-106. DOI:10.3923/pjn.2004.99.106

Zeb A (2006) Anticarcinogenic potential of lipids from Hippophae; Evidence from the recent literature. *Asian Pac J Cancer Prev* **7**(1), 32. https://www.researchgate.net/publication/7150227_Anticarcinogenic_Potential_of_Lipids_from_Hippophae_Evidence_from_the_Recent_literature

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

Zheng RX, Xu XD, Tian Z, Yang JS (2009) Chemical constituents from the fruits of *Hippophae rhamnoides*. *Nat Prod Res* **23**(15), 1451-1456. <https://doi.org/10.1080/14786410903075457>

Zielińska A, Nowak I (2017) Abundance of active ingredients in sea-buckthorn oil. *Lipids Health Dis* **16**(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0469-7>

Zou L, Akoh CC (2015) Antioxidant activities of annatto and palm tocotrienol-rich fractions in fish oil and structured lipid-based infant formula emulsion. *Food Chem* **168**, 504-511. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.098>

Żuchowski J (2022) Phytochemistry and pharmacology of sea buckthorn (*Elaeagnus rhamnoides*; syn. *Hippophae rhamnoides*): progress from 2010 to 2021. *Phytochem Rev*, 1-31. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09832-1>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A handwritten signature in blue ink, reading "Nikola Knezić", written over a horizontal line.

Vlastoručni potpis