

Kinetika otpuštanja polifenola jabuke u simuliranom probavnom procesu

Valenteković, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:415876>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-28**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Matea Valenteković

**Kinetika otpuštanja polifenola jabuke u simuliranom probavnom
procesu**

diplomski rad

Osijek, rujan 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju

Katedra za primijenjenu kemiju, biokemiju i instrumentalne metode

Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski studij: Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Fizikalna kemija

Tema rada: je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog Vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 2. svibnja 2023. godine

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron

Pomoć pri izradi:

Kinetika otpuštanja polifenola jabuke u simuliranom probavnom procesu

Matea Valenteković, 0113144001

Sažetak: Polifenolni spojevi otpuštaju se postepeno iz voća tijekom simuliranog probavnog procesa. Cilj ovog rada bio je ispitati kinetiku otpuštanja polifenolnih spojeva iz jabuke tijekom probave u želudcu te tankom crijevu. Polifenoli jabuke ekstrahirani su kemijskom ekstrakcijom te ekstrakcijom potpomognutom enzimima, a ekstrakti su analizirani upotrebom RP-HPLC metode (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography) da bi se odredila količina polifenola prije probave. Nakon toga, provedena je simulirana probava jabuke u želudcu i tankom crijevu, *in vitro*, u različitim vremenskim periodima, a uzorci su analizirani RP-HPLC metodom da bi se odredila količina polifenola za vrijeme probave. U jabuci su identificirani i kvantificirani spojevi koji se uobičajeno nalaze u jabuci (flavan-3-oli, fenolne kiseline, dihidrokalkoni, flavonoli i antocijanini). Količina polifenola tijekom probave bila je manja od količina koja se prirodno nalaze u jabuci. Nakon probave u želudcu identificirani su isti polifenoli kao i prije probave, uz dodatno identificiranje kriptoklorogenske kiseline dok procijanidin B1 nije identificiran. I nakon probave u tankom crijevu pronađene su određene razlike u pojavnosti polifenola. Uz uobičajene polifenole, identificirani su kriptoklorogenska, neoklorogenska kiselina te izomer klorogenske kiseline. Procijanidin B1 i cijanidin-3-galaktozid nisu identificirani. Na ove razlike utjecao je različit pH u različitim fazama probave. Količine polifenolnih skupina (c) otpuštenih u vremenu (t) analizirane su nelinearnom regresijom modificiranih jednadžbi prvog i drugog reda. Prema vremenu polureakcije ($t_{1/2}$) za želudac (1,5 – 3,8 min prvi red, 0,5 – 3,5 min drugi red) te za tanko crijevo (0,2 – 5,9 min prvi red, 0,8 – 5,2 min drugi red) polovica ukupno otpuštenih polifenola oslobodi se u prvih nekoliko minuta probave. Ukupne količine polifenola otpuštenih na kraju probave (c_{exp}) odgovaraju količinama predviđenim modelima (c_{∞}). Modificirane jednadžbe mogu se koristiti za istraživanje kinetike otpuštanja polifenola u probavnom procesu.

Ključne riječi: želudac, tanko crijevo, kinetika, jednadžbe brzine reakcije

Rad sadrži: 42 stranice
26 slika
2 tablice
0 priloga
24 literaturne reference

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|---|---------------|
| 1. doc. dr. sc. Valentina Bušić | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron | član-mentor |
| 3. doc. dr. sc. Ivana Tomac | član |
| 4. dr. sc. Petra Matić, znanstveni suradnik | zamjena člana |

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Applied Chemistry, Biochemistry and Instrumental Methods
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program: Process Engineering
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Physical Chemistry
Thesis subject: was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII. held on May 02. 2023.
Mentor: Lidija Jakobek Barron, PhD, Full Professor
Technical assistance:

The Kinetics of the Release of Phenolic Compounds From Apples in the Simulated Gastrointestinal Digestion
Matea Valenteković, 0113144001

Summary: Polyphenolic compounds are gradually released from the fruit during the simulated digestion process. The aim of this work was to examine the kinetics of the release of polyphenolic compounds from apples during digestion in the stomach and small intestine. Apple polyphenols were extracted by chemical extraction and enzyme-assisted extraction, and extracts were analyzed using RP-HPLC method (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography) to determine the amount of polyphenols before digestion. After that, the simulated digestion of apples in the stomach and small intestine was carried out *in vitro*, in different time periods, and the samples were analyzed with RP-HPLC method to determine the amount of polyphenols during the digestion. Compounds that have been identified and quantified are commonly found in apples (flavan-3-ols, phenolic acids, dihydrochalcones, flavonols and anthocyanins). The amount of polyphenols during the digestion was lower than the amount naturally found in apples. Polyphenols that were identified after the digestion in the stomach were the same as those identified before the digestion, with additional identification of cryptochlorogenic acid, while procyanidin B1 was not identified. After the digestion in the small intestine certain differences in the occurrence of polyphenols were found. Along with the usual polyphenols, cryptochlorogenic acid, neochlorogenic acid, and an isomer of chlorogenic acid have been identified. Procyanidin B1 and cyanidin-3-galactoside were not identified. These differences were influenced by different pH in different stages of digestion. The amounts of polyphenolic subgroups (c_i) released in time (t) were analyzed with nonlinear regression by using modified equations of the first and second order reactions. According to the reaction half-time ($t_{1/2}$) for the stomach (1.5 – 3.8 min first order reaction, 0.5 – 3.5 min second order reaction) and for the small intestine (0.2 – 5.9 min first order reaction, 0.8 – 5.2 min second order reaction) half of the total released polyphenols were released in the first few minutes of digestion. The total amounts of polyphenols released at the end of the digestion (c_{exp}) correspond to the amounts predicted by the models (c_{∞}). The modified equations can be used to investigate the kinetics of polyphenol release in the digestive process.

Keywords: stomach, small intestine, kinetics, rate law

Thesis contains: 42 pages
26 figures
2 tables
0 supplements
24 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Valentina Bušić, PhD, Assistant Professor | chair person |
| 2. Lidija Jakobek Barron, PhD, Full Professor | supervisor |
| 3. Ivana Tomac, PhD, Assistant Professor | member |
| 4. Petra Matić, PhD, Postdoc. | stand-in |

Defense date:

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	4
2.1. JABUKA	5
2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI	5
2.2.1. Fenolne kiseline.....	6
2.2.2. Flavonoidi	7
2.3. POLIFENOLI U JABUKAMA	7
2.4. POLIFENOLNI SPOJEVI U PROBAVNOM PROCESU	10
2.5. KEMIJSKA KINETIKA	11
2.5.1. KEMIJSKA KINETIKA OTPUŠTENIH POLIFENOLNIH SPOJEVA U SIMULIRANOM PROBAVNOM PROCESU	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. ZADATAK	14
3.2. MATERIJAL I METODE.....	14
3.2.1. Kemikalije	14
3.2.2. Priprema uzorka jabuke	15
3.2.3. Kemijska ekstrakcija polifenola jabuke	15
3.2.4. Enzimaska ekstrakcija polifenola jabuke.....	16
3.2.5. Simulirana probava	16
3.2.6. Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija	17
3.2.7. Kinetika procesa simulirane probave	17
3.2.8. Statistička obrada podataka	18
4. REZULTATI	19
4.1. Polifenolni spojevi jabuke	20
4.2. Polifenolni spojevi u simuliranom probavnom procesu	27
4.3. Kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva tijekom probave	29
5. RASPRAVA	32
6. ZAKLJUČAK.....	37
6. LITERATURA.....	39

1. UVOD

Jabuke su voće koje se često konzumira te se intenzivno uzgaja (Feng i sur., 2021; Jakobek i sur., 2020). Preporučuju se u prehrani jer imaju brojne pozitivne učinke na ljudski organizam. Bogate su vitaminima među kojima su vitamini B kompleksa najviše prisutni. Također, sadrže i velike količine minerala te vlakana u odnosu na ostalo voće (Feliciano i sur., 2010). Sadrže visoke koncentracije polifenola koji se tijekom probavnog procesa iz jabuke otpuštaju u organizam (Jakobek i sur., 2023). Polifenolni spojevi su vrlo važni jer imaju potencijalno pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Kako se jabuke često konzumiraju, polifenoli se sve više istražuju (Jakobek i sur., 2020; Jakobek i sur., 2021). U jabukama se uobičajeno nalaze antocijanini, flavan-3-oli, fenolne kiseline, dihidrokalkoni i flavonoli (Jakobek i sur., 2020). Količina polifenolnih spojeva u jabukama nije uvijek ista. Naime, ona ovisi o mnogim čimbenicima kao što su vrsta jabuke, uvjeti u kojima se skladišti, uvjeti okoliša u kojima se uzgaja (Feng i sur., 2021).

Kemijska kinetika se bavi istraživanjem brzine kojom reaktanti nestaju, te kojom produkti nastaju u nekoj kemijskoj reakciji. Ona proučava način na koji određeni faktori utječu na brzinu reakcije te detektira korake odvijanja reakcije. Poblje objašnjava mehanizam reakcije, te daje informaciju o vremenu u kojem će kemijska reakcija stupiti u stanje ravnoteže (Atkins, 2001). U kemijskoj kinetici provođenjem kemijske reakcije dolazi do promjene količine reaktanta (c_t) tijekom vremena (t) što se može opisati krivuljom koja se definira jednadžbama brzina reakcije prvog i drugog reda (Jakobek i sur., 2023).

Kemijska kinetika može poslužiti i za analizu simuliranog probavnog sustava (Butterworth i sur., 2012). Prilikom simulacije probave može doći do povećanja ili do smanjenja količine reaktanta tj. otpuštenih spojeva u različitim fazama probavnog sustava. Povećanje količine reaktanta može biti opisano krivuljom čija je funkcija rastuća, odnosno ovisnost količine reaktanta (c_t) o vremenu (t) pokazuje porast. No, ako dolazi do razgradnje reaktanata tijekom probave, smanjenje količine reaktanata može biti opisano krivuljom čija je funkcija padajuća, odnosno ovisnost količine reaktanta (c_t) o vremenu (t) pokazuje smanjenje. Uobičajene jednadžbe brzine reakcije prvog i drugog reda koje opisuju ove krivulje su modificirane za otpuštanje polifenolnih spojeva u probavi na način da odgovaraju u oba slučaja, povećanju i smanjenju koncentracije otpuštenih polifenola (Jakobek i sur., 2023).

Cilj ovog rada bio je ispitati kinetiku otpuštanja polifenolnih spojeva iz jabuke tijekom probave u želudcu i tankom crijevu. Provedena je simulirana probava jabuke u ustima, želudcu i tankom crijevu, *in vitro*, u različitim vremenskim periodima. Svi uzorci analizirani su RP-HPLC

metodom (engl. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography) da bi se odredili ukupni polifenoli, ukupne polifenolne skupine i pojedinačni polifenolni spojevi otpušteni tijekom probave. Količine polifenolnih skupina otpuštene tijekom vremena analizirane su nelinearnom regresijom modificiranim jednadžbama brzina reakcija prvog i drugog reda. Određene su konstante brzine reakcija te vrijeme polureakcije za otpuštanje polifenolnih skupina jabuke tijekom probave.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JABUKA

Jabuka (**Slika 1**) je voće porijeklom iz porodice *Rosaceae*. Intenzivno se uzgaja, nutritivno je vrlo bogata i jedno je od najkonzumiranijih vrsta voća u svijetu. Može se posluživati u svježem obliku, u obliku sokova, čipseva te u obliku octa i vina (Feng i sur., 2021; Feliciano i sur., 2010).



Slika 1 Jabuka (Zovko, 2017)

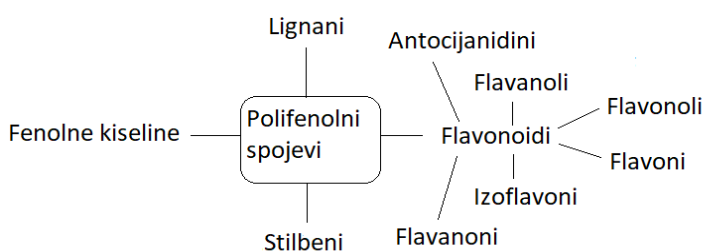
Različite sorte jabuka se razlikuju po kemijskom sastavu, a u sastavu je bitan omjer šećera i kiselina koji daju dobro uravnotežen okus. Jabuka sadrži veliki udio vode (oko 84 %), a isto tako sadrži minerale kao što su kalij, magnezij, kalcij i natrij. Prisutni su i cink, mangan, bakar, željezo, bor, fluor, selenij i molibden. Vitamini koji se nalaze u najvećoj koncentraciji su vitamini B kompleksa. Isto tako, u jabuci se u velikim količinama nalaze i vlakna kao što su celuloza, hemiceluloza, lignin i pektin, a lipidi i proteini se u njoj nalaze u malim količinama (Feliciano i sur., 2010).

Topiva i netopiva vlakna imaju različitu ulogu. Topiva vlakna snižavaju koncentraciju kolesterola u krvi, a netopiva vlakna imaju važnu funkciju u regulaciji rada crijeva (Feliciano i sur., 2010).

2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenolni spojevi sekundarni su metaboliti biljaka. Široko su rasprostranjeni i kompleksni, a pronađeno je više od 8000 spojeva. Dijelev se na dvije osnovne skupine, a to su flavonoidi i neflavonoidi. Neke od osnovnih podskupina polifenolnih spojeva prikazane su na

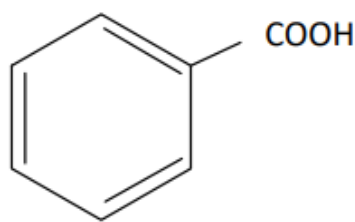
Slici 2. U neflavonoide se ubrajaju lignani, fenolne kiseline i stilbeni uz mnoge druge skupine, a u flavonoide se ubrajaju skupine kao što su antocijanidini, flavanoli, flavonoli, flavoni, izoflavoni te flavanoni i mnogi drugi (Bouayed i sur., 2011; Bravo, 1998). Tijekom *in vitro* simulirane probave, polifenolni spojevi se oslobađaju iz „matrixa“ hrane te dalje odlaze u iduće probavne faze. Time njihova djelotvornost, učinkovitost i stabilnost uvelike ovise o enzimima, temperaturi, pH te mnogim drugim čimbenicima (Bouayed i sur., 2011; Bravo, 1998).



Slika 2 Podjela polifenolnih spojeva

2.2.1. Fenolne kiseline

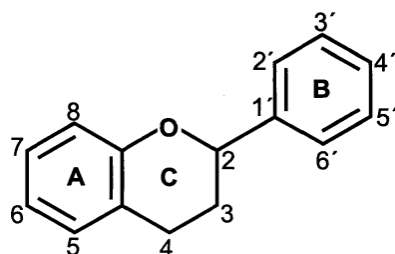
Fenolne kiseline, čija je osnovna struktura prikazana na **Slici 3**, predstavljaju važnu skupinu neflavonoida čija je molekularna masa mala. Najčešće su prisutne u vezanom obliku i dijele se u dvije velike skupine. Prva skupina su hidroksicimetne, a druga hidroksibenzojeve kiseline (Bravo, 1998; Jakobek, 2007). Hidroksibenzojeve kiseline se najčešće nalaze u vezanom obliku. Hidroksicimetne kiseline češće se pojavljuju u voću i povrću od hidroksibenzojevih kiselina (Jakobek, 2007).



Slika 3 Struktura fenolnih kiselina (Bravo, 1998)

2.2.2. Flavonoidi

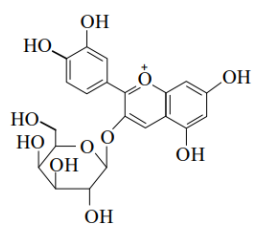
Struktura flavonoida prikazana na **Slici 4** sastavljena je od dva aromatska prstena (A i B) te od oksigeniranog heterocikličkog prstena (C). Kako su molekule šećera vezane za ovu osnovnu strukturu, postoji veliki broj različitih spojeva flavonoida. Na molekule flavonoida obično je vezana molekula šećera čime raste polarnost molekule. Isto tako vezanje različitih skupina na glavnu jezgru rezultira nastankom raznih spojeva u velikom broju (Bravo, 1998; Jakobek, 2007).



Slika 4 Osnovna struktura flavonoida (Bravo, 1998)

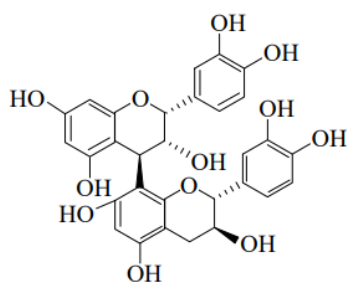
2.3. POLIFENOLI U JABUKAMA

Sastav, a isto tako i raspoređenost polifenolnih spojeva u jabukama nije uvijek isti i ovisi o mnogo faktora (zrelosti jabuke, uvjetima okoliša i skladištenja, sorti jabuke). Koncentracija polifenolnih spojeva u jabuci razlikuje se u kori, mesu i sjemenkama. Najveće količine polifenola nalaze se u sjemenkama, a najmanje u mesu jabuke (Feng i sur., 2021). Polifenoli u biljkama, pa tako i u jabukama, imaju različite funkcije. Oni štite biljku od mikroorganizama, ultraljubičastog zračenja, a također su zaslužni za boju voća ili povrća. Daju okus biljkama. Zaštita od bolesti je jedna od najvažnijih karakteristika koju polifenoli u biljkama mogu imati. Prilikom oštećenja biljke dolazi do stvaranja veće količine polifenola, odnosno dolazi do njihovog nakupljanja i samim time se biljka štiti od rizika nastanka bolesti (Berend i Grabarić, 2008; Jakobek, 2007). U jabukama se uobičajeno nalaze antocijanini, flavan-3-oli, dihidrokalkoni, fenolne kiseline i flavonoli. Na **Slikama 5** do **9** prikazane kemijske strukture pojedinačnih polifenolnih spojeva koji se mogu naći u jabukama (Matić, 2021; Feng i sur., 2021; Gao i sur., 2020; Vongsak i sur., 2013).

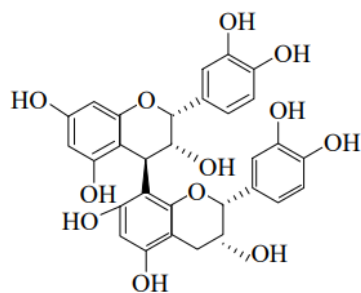


Cijanidin-3-galaktozid

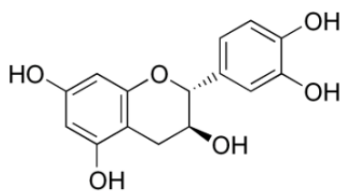
Slika 5 Antocijanin jabuke



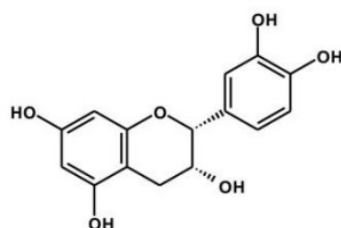
Procijanidin B1



Procijanidin B2

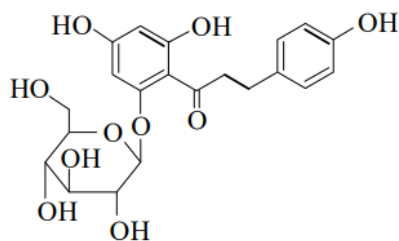


(+)-Katehin



(-)-Epikatehin

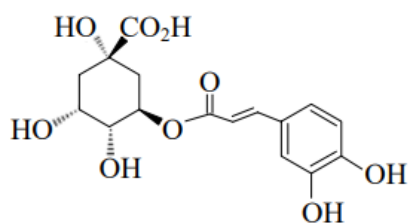
Slika 6 Flavan-3-oli jabuke



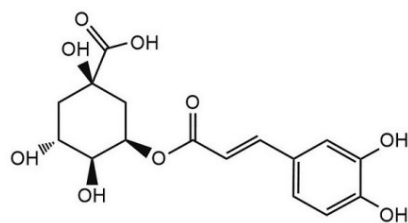
Floretin-2-*O*-glukozid

Slika 7 Dihidrokalconi jabuke

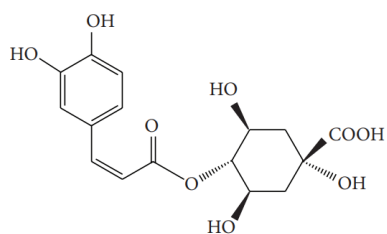
Komentirano [VB1]: U imenu se naglasi da je glikozidna veza preko kisika (*O*-glukozidi). Postoje i *C*-glukozidi. *O* i *C* se navode u imenu spoja u kurzivu



Klorogenska kiselina

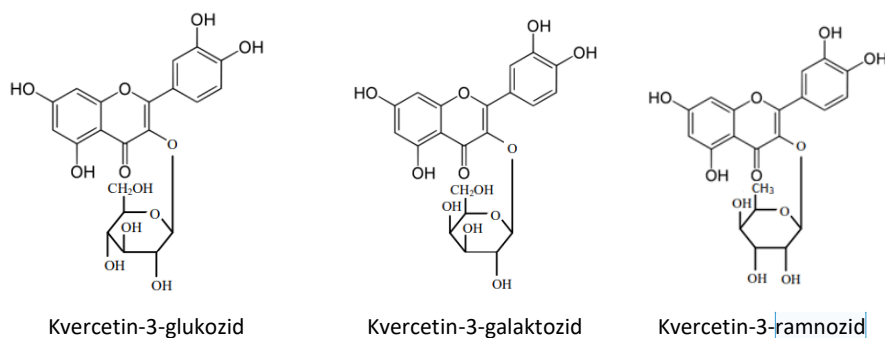


Neoklorogenska kiselina



Kriptoklorogenska kiselina

Slika 8 Fenolne kiseline jabuke



Slika 9 Flavonoli jabuke

Komentirano [VB2]: Ramnoza je 6-deoksi-L-manoza. Nije dobra struktura na 6 mjestu umjesto -CH₂OH ide samo CH₃ skupina

2.4. POLIFENOLNI SPOJEVI U PROBAVNOM PROCESU

Polifenolni spojevi se oslobađaju iz tzv. „matriksa“ hrane, pa tako i iz jabuka, prilikom procesa probave. Nakon usitnjavanja i miješanja hrane u ustima, uz nizak pH u želudcu polifenolni spojevi oslobode se iz hrane. Dolaskom u tanko crijevo zbog povišenog pH neki polifenoli mogu se degradirati na manje spojeve. Polifenoli se apsorbiraju u tankom crijevu u krv, ali pri tome dolazi do metabolizma i nastanka metabolita polifenola koji se mogu pronaći u krvi i koji imaju drugačiju kemijsku strukturu od prirodnih polifenolnih spojeva u hrani. Apsorpcija polifenola u tankom crijevu ovisi o raznim faktorima kao što su pH ili količina enzima. Polifenoli koji se ne apsorbiraju, dolaze u debelo crijevo (Jakobek i Blesso, 2023; Lorenzo i sur., 2019; Jakobek i sur., 2021). U debelom crijevu polifenolni spojevi mogu imati pozitivan utjecaj kako ulaze u dodir s mikroflorom. Osim toga, u debelom crijevu djelomično prelaze u katabolite koji se jednostavnije apsorbiraju i mogu se naći u krvi (Rodríguez-Daza i sur., 2021). Ostatak polifenola koji se ne apsorbira, izbacuje se iz organizma.

Komentirano [VB3]: Može li se navest samo matriks bez X? Ne znam koja bi hrvatska riječ bolje odgovarala

Komentirano [VB4]: pH klorovodične kiseline u želucu je između 1.5 i 3.5. Hidroliza glikozida odvija se s kiselinama tako da se glikozidi hidroliziraju na šećer i aglikon. (pitanje za obranu)

Složene molekule poput prehrambenih vlakana mogu "zarobiti" polifenolne spojeve što sprečava transformaciju u jednostavnije oblike u probavnom sustavu. Prehrambena vlakna i polifenolni spojevi vežu se putem nekovalentnih veza, a to su hidrofobne interakcije, vodikove veze i van der Waalove sile (Jakobek i Matić, 2019). Prehrambena vlakna imaju potencijal prenošenja polifenolnih spojeva u debelo crijevo čime se koncentracija polifenolnih spojeva u debelom crijevu može povećati što može imati potencijalno pozitivan učinak na zdravlje (Jakobek i Blesso, 2023).

2.5. KEMIJSKA KINETIKA

Kemijska kinetika se bavi istraživanjem brzine nestajanja reaktanata i nastajanja produkata u nekoj kemijskoj reakciji, te proučavanjem na koji način različiti parametri utječu na njenu brzinu. Pomoću nje procjenjuje se vrijeme u kojem određena kemijska reakcija stupa u ravnotežno stanje, definira se brzina reakcije te se utvrđuju koraci odvijanja same reakcije (Atkins, 2001). Podjela kemijskih reakcije zasniva se na redu reakcije i većinom su to reakcije nultog, prvog i drugog reda (Atkins, 2001; Herak i sur., 1992). Parametri koji su bitni za izračunavanje i koje je moguće odrediti pomoću eksperimentalnih mjerenja su brzina reakcije, vrijeme polureakcije, konstanta brzine reakcije, red reakcije i jednadžba za brzinu reakcije (Atkins, 2001).

Brzina kojom se mijenjaju količine produkata ili reaktanata u jedinici vremena naziva se brzina reakcije i nužno je uzeti u obzir i trenutnu brzinu koja označava brzinu reakcije u određenom trenutku. Nagib krivulje u dijagramu ovisnosti količine reaktanta u vremenu daje informacije o brzini reakcije. Strmija krivulja daje podatak da se radi o većim brzinama reakcije. Vrijeme polureakcije je definirano kao vrijeme koje je potrebno da se količina reaktanta ili produkta smanji na polovicu u odnosu na njihovu početnu vrijednost. U reakciji prvog reda ona nije ovisna o početnoj količini reaktanta, dok u reakciji drugog reda je (Atkins, 2001).

2.5.1. Kemijska kinetika otpuštenih polifenolnih spojeva u simuliranom probavnom procesu

Proces nastajanja produkata tj. otpuštanja spojeva iz matrixa hrane tijekom probave može se analizirati pomoću kemijske kinetike. Nakon razgradnje hrane u ustima, dolazi do porasta koncentracije otpuštenih polifenolnih spojeva u želudcu. Nakon toga, može se desiti da se koncentracija otpuštenih polifenolnih spojeva u tankom crijevu smanjuje u usporedbi s početnom koncentracijom. Zbog činjenice da koncentracija polifenolnih spojeva u različitim fazama probave može rasti ili se smanjivati, uobičajene jednadžbe brzine reakcije prvog i drugog reda mogu se modificirati da odgovaraju i povećanju i sniženju polifenolnih spojeva. Modifikacija jednadžbi prvog i drugog reda objašnjena je u ranijem radu Jakobek i sur. (2023). Modificirane jednadžbe prvog (jednadžba 1) i drugog reda (jednadžba 2) su (Jakobe i sur., 2023):

$$c_t = (c_0 - c_{\infty})e^{-kt} + c_{\infty} \quad (1)$$

$$c_t = \frac{c_0 - c_{\infty}}{1 + |c_0 - c_{\infty}|kt} + c_{\infty} \quad (2)$$

Jednadžbe za vrijeme poluživota za reakcije prvog (jednadžba 3) i drugog reda (jednadžba 4) su:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \quad (3)$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{k|c_0 - c_{\infty}|} \quad (4)$$

c_t = koncentracija reaktanta u vremenu t (mg kg^{-1})

c_0 = koncentracija reaktanta u vremenu $t=0$ (mg kg^{-1})

c_{∞} = koncentracija reaktanta na kraju reakcije (mg kg^{-1})

k = konstanta brzine reakcije prvog ili drugog reda (za prvi red (min^{-1}), za drugi red ($\text{kg mg}^{-1} \text{min}^{-1}$))

t = vrijeme (min)

$t_{1/2}$ = vrijeme polureakcije (min)

Modificirane jednadžbe upotrijebljene su u ovom radu za analiziranje otpuštanja polifenolnih spojeva jabuke u simuliranom probavnom procesu.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je ispitati kinetiku otpuštanja polifenolnih spojeva iz jabuke tijekom probave u želudcu te tankom crijevu. Prema tome, u ovom radu bilo je potrebno:

- ekstrahirati polifenole iz jabuke kemijskom i enzimima potpomognutom ekstrakcijom te analizirati ekstrakte upotrebom RP-HPLC metode kako bi se odredila količina ukupnih polifenola, pojedinih polifenolnih spojeva te polifenolnih skupina prije probave,
- provesti simuliranu probavu jabuke u želudcu i tankom crijevu, *in vitro*, u različitim vremenskim periodima (želudac 5, 10, 15, 20, 30, 60 i 120 minuta; tanko crijevo 5, 10, 15, 20, 30, 60 i 120 minuta), te analizirati sve uzorke RP-HPLC metodom kako bi se identificirali i kvantificirali ukupni polifenoli, pojedinačni polifenolni spojevi te polifenolne skupine tijekom otpuštanja u fazama probave,
- analizirati količine polifenolnih skupina nelinearnom regresijom modificiranih jednadžbi brzina reakcija prvog i drugog reda,
- odrediti konstante brzine reakcije, vrijeme polureakcije te mogući red reakcije za otpuštanje polifenolnih skupina tijekom probave.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Kemikalije

Kemikalije koje su upotrijebljene u ovom diplomskom radu su:

- SSF (otopina za fazu probave u ustima, engl. Simulated Salivary Fluid),
- α -amilaza (1000 mg l^{-1}),
- kalcijev klorid ($0,3 \text{ mol l}^{-1}$),
- SGF (otopina za fazu probave u želudcu, engl. Simulated Gastric Fluid),
- klorovodična kiselina (1 mol l^{-1}),
- pepsin (31660 mg l^{-1}),
- SIF (otopina za fazu probave u tankom crijevu, engl. Simulated Intestinal Fluid),
- natrijev hidroksid (1 mol l^{-1}),
- pankreatin ($8\,000 \text{ mg l}^{-1}$),
- žučne soli ($25\,000 \text{ mg l}^{-1}$).

- floretin (Extrasynthese, Genay, Francuska),
- procijanidin B1 (Extrasynthese, Genay, Francuska),
- cijanidin-3-galaktozid klorid (Extrasynthese, Genay, Francuska),
- procijanidin B2 (Extrasynthese, Genay, Francuska),
- kvercetin-3-galaktozid (Extrasynthese, Genay, Francuska),
- kvercetin-3-ramnozid (Extrasynthese, Genay, Francuska),
- floretin-2-*O*-glukozid (Extrasynthese, Genay, Francuska),
- (-)-epikatehin (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, Sjedinjene Američke Države),
- klorogenska kiselina (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, Sjedinjene Američke Države),
- (+)-katehin (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, Sjedinjene Američke Države),
- kvercetin (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, Sjedinjene Američke Države),
- kvercetin-3-glukozid (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, Sjedinjene Američke Države)

SSF, SGF i SIF napravljene su od otopina elektrolita prema ranije opisanom postupku (Bergantin i sur., 2017; Minekus i sur., 2014).

3.2.2. Priprema uzorka jabuke

Jabuka je zajedno s mesom i korom narezana na manje komadiće, odstranjena je sredina zajedno s košticama. Komadići jabuke usitnjeni su štapnim mikserom. Homogenizirana jabuka stavljena je u vrećicu i skladištena u zamrzivaču jedan dan, prije analize.

3.2.3. Kemijska ekstrakcija polifenola jabuke

U kivete je izvagano 0,2 g usitnjene jabuke te otpipetirano 1,5 ml 80 % metanola. Kivete su stavljene u ultrazvučnu kupelj (Bandelin Sonorex RK 100, Berlin, Njemačka) na 15 minuta. Uzorak je centrifugiran u centrifugi (Eppendorf Minispin, Hamburg, Njemačka) 10 minuta (10 000 rpm). Ekstrakt je odvojen od ostatka. Ostatak je ekstrahiran još jednom s 0,5 ml 80 % metanola. Dva ekstrakta su spojena u jedan ukupnog volumena 2 ml. Ekstrakt je filtriran kroz PTFE filter (0,2 µm) i analiziran na HPLC uređaju.

3.2.4. Enzimska ekstrakcija polifenola jabuke

U ostatak nakon kemijske ekstrakcije otpipetirano je 1,05 ml vode, 60 μ L žučnih soli, 30 μ L pankreatina i 15 μ L pepsina te je potom kiveta stavljena u inkubator (IN 30 Memmert, Schwabach, Njemačka) u vremenu od 2 sata na 37 °C. Nakon provedene inkubacije, uzorak je ohlađen u ledenoj vodi 5 minuta, centrifugiran 5 minuta na 10 000 rpm i zatim ohlađen u ledenoj kupelji. Ekstrakt je odvojen od ostatka i analiziran na HPLC uređaju. Količina polifenola prije probave dobivena je zbrajanjem količina nakon kemijske i enzimima potpomognute ekstrakcije.

3.2.5. Simulirana probava

Faza u želudcu

Simulirana probava počela je simuliranjem faze u ustima koja je trajala 2 min, nakon čega je odmah nastavljena faza u želudcu u različitim vremenskim periodima (5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 min).

U 7 kiveta izvagano je 0,2 g jabuke, otpipetirano 175 μ L SSF, 49 μ L vode, 1,3 μ L 0,3 M kalcijevog klorida. Reakcijske smjese su homogenizirane na vortexu (PV-1, Grant Instruments, Cambridgeshire, UK) te je dodano 25 μ L α -amilaze. Reakcijske smjese još jednom su homogenizirane vortexom te smještene u termoblok (Bio TDB-100, Biosan, Riga, Latvia) na inkubaciju na 37°C 2 min. Nakon toga, odmah je u reakcijskim smjesama nastavljena faza simulirane probave u želudcu pipetiranjem 375 μ L SGF, 15 μ L vode, 0.3 μ L 0,3 M kalcijevog klorida, 10 μ L 1 M klorovodične kiseline te 100 μ L pepsina. Nakon inkubacije reakcijskih smjesa u različitom periodu za svaku kivetu (5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 min) u termobloku na 37 °C, reakcijske smjese su ohlađene u ledenoj kupelji, centrifugirane 5 minuta na 10 000 rpm, ponovo ohlađene, profiltrirane kroz 0,2 PTFE filter i analizirane na HPLC uređaju.

Faza u tankom crijevu

Simulirana probava počela je simuliranjem faze u ustima 2 min, odmah nastavljena simuliranjem probave u želudcu prema ranije opisanom postupku, ali u periodu 2 h. Nakon toga, odmah je nastavljena faza simulirane probave u tankom crijevu u različitim vremenskim periodima (5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 min).

U 7 kiveta izvagano je 0,2 g jabuke. Prema prije opisanom postupku u 7 kiveta provedena je faza probave u ustima (2 min), faza probave u želudcu (2 h). U kivete je nakon toga otpipetirano 550 μ l SIF, 180.5 μ l vode, 2 μ l 0,3 M kalcijevog klorida, 7,5 μ l NaOH (1 M), 10 μ l žučnih soli te 250 μ l pankreatina. Reakcijske smjese stavljene su u vortex da se homogeniziraju, a zatim u termoblok na 37 °C na određeni vremenski period (5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 min). Nakon određenih vremenskih perioda, reakcijske smjese su stavljene u ledenu kupelj, centrifugirane 5 minuta na 10 000 rpm, profiltrirane kroz 0,2 mm PTFE filter i analizirane na HPLC uređaju.

3.2.6. Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija

Za identifikaciju i određivanje ukupne količine polifenola, ukupnih polifenolnih skupina i pojedinačnih polifenolnih spojeva otpuštenih prije i tijekom probave primijenjen je HPLC uređaj (1260 Infinity II, Agilent Technology, Santa Clara, SAD) opremljen PDA detektorom (photodiodearray detector), kvarternom pumpom i vialsamplerom. Proces separacije polifenola izvršen je upotrebom kolone Poroshell 120 EC C-18 (unutrašnjeg promjera 4,6 x 100 mm, promjer čestica 2,7 μ m) s pretkolonom (Poroshell 120 EC C-18, 4,6 mm) (Agilent, Santa Clara, SAD) primjenom 0,1 % fosfatne kiseline kao mobilne faze A, te 100 %-tnog metanola kao mobilne faze B. Protok je bio 0,5 ml min⁻¹, a uzorci su injektirani u volumenu 10 μ l. Gradijent je bio kako slijedi: 0 min 5 % B, 5 min 25 % B, 14 min 34 % B, 25 min 37 % B, 30 min 40 % B, 34 min 49 % B, 35 min 50 % B, 58 min 51 % B, 60 min 55 % B, 62 min 80 % B, 65 min 80 % B, 67 min 5 % B, 72 min 5 % B. UV/Vis spektri autentičnih standarda su upotrijebljeni za identifikaciju polifenolnih spojeva, a njihove kalibracijske krivulje za kvantifikaciju.

3.2.7. Kinetika procesa simulirane probave

Dobiveni podaci koji daju informacije o količini otpuštenih polifenolnih spojeva (mg kg⁻¹) tijekom probave u vremenu od 5, 10, 15, 20, 30, 60 i 120 minuta (c_t) analizirani su u programu MS Excel, alat solver (Redmond, Washington, Sjedinjene Američke Države). Pomoću modificirane jednadžbe prvog reda (Jednadžba 1) opisana je ovisnosti c_t (koncentracija otpuštenih polifenola u vremenu) o vremenu (t), te su nelinearnom regresijom određeni parametri k (konstanta brzine reakcije) i c_∞ (koncentracija otpuštenih polifenola na kraju reakcije). Prema jednadžbi 3 dobiveno je vrijeme polureakcije $t_{1/2}$ za prvi red. Podaci o količini

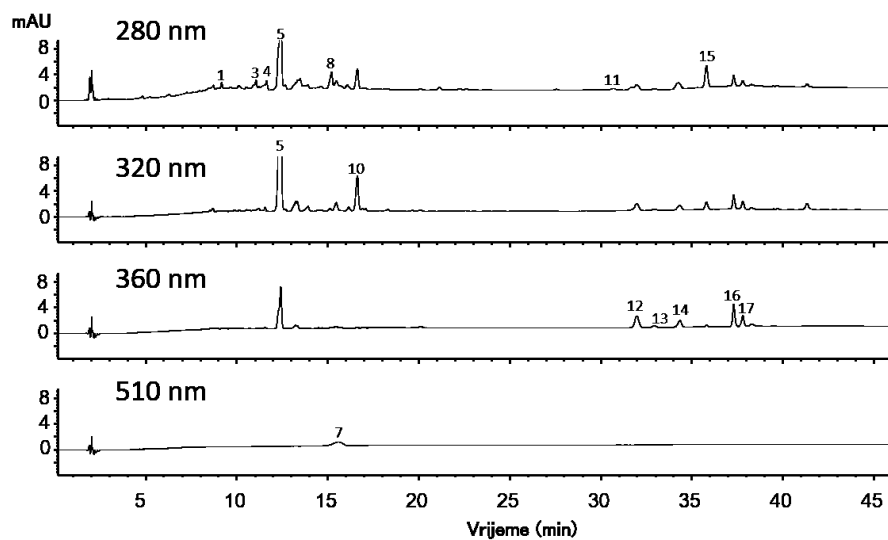
otpuštenih polifenola su isto tako analizirani pomoću modificirane jednadžbe drugog reda (Jednadžba 2) pri čemu je opisana ovisnost c_t o t . Nelinearnom regresijom izračunati su k i c_∞ . Prema jednadžbi 4 dobiveno vrijeme polureakcije $t_{1/2}$ za drugi red.

3.2.8. Statistička obrada podataka

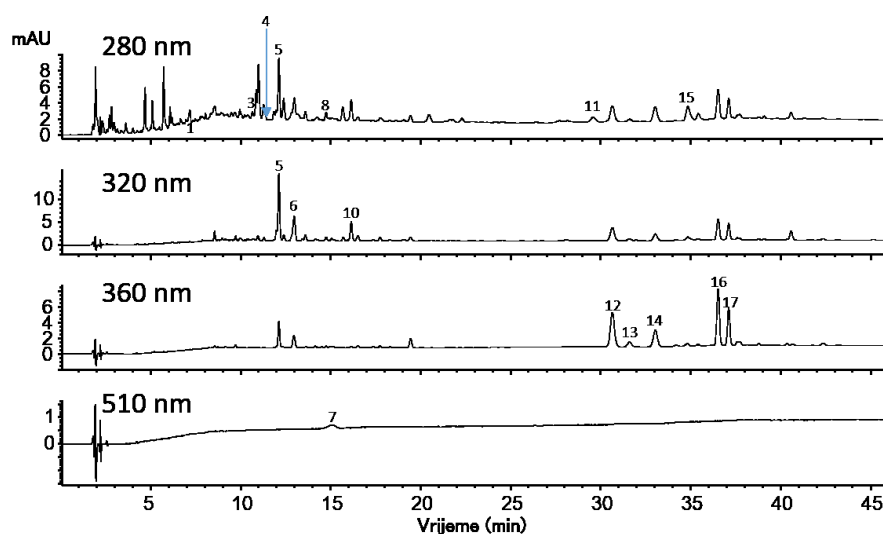
Za kemijsku i enzimsku ekstrakciju pripremljena su dva ekstrakta koja su analizirana dva puta na HPLC uređaju ($n=4$), a za simuliranu probavu u želudcu i tankom crijevu pripremljen je po jedan uzorak koji su analizirani dva puta ($n=2$). Nakon provedenih mjerenja pomoću metode RP-HPLC, rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti $\pm$ standardno odstupanje.

4. REZULTATI

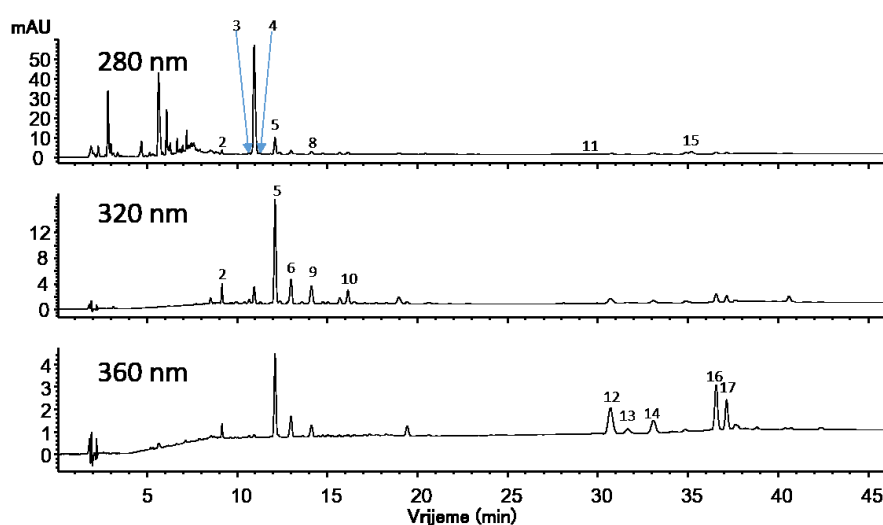
4.1. Polifenolni spojevi jabuke



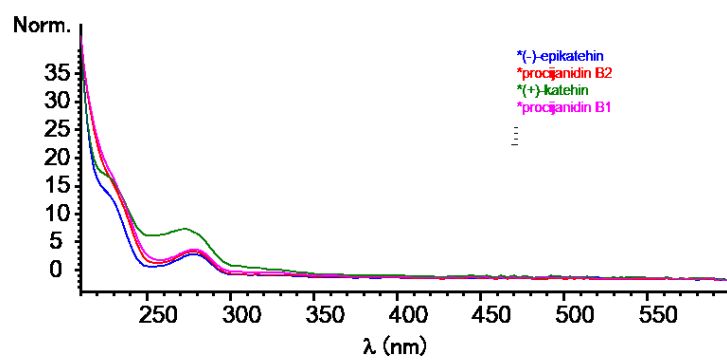
Slika 10 Kromatogram ekstrakta jabuke prije probave sniman na 280, 320, 360 i 510 nm s identificiranim spojevima 1 – procijanidin B1, 3 – (+)-katehin, 4 – procijanidin B2, 5 – klorogenska kiselina, 7 – cijanidin-3-galaktozid, 8 – (-)-epikatehin, 10 – *p*-kumaroil-kina kiselina*, 11 – floretin-2-*O*-ksiloglukozid*, 12 – kvercetin-3-galaktozid, 13 – kvercetin-3-glukozid, 14 – derivat kvercetina*, 15 – floretin-2-*O*-glukozid, 16 – kvercetin-3-ksilozid*, 17 – kvercetin-3-ramnozid (* djelomično identificirano)



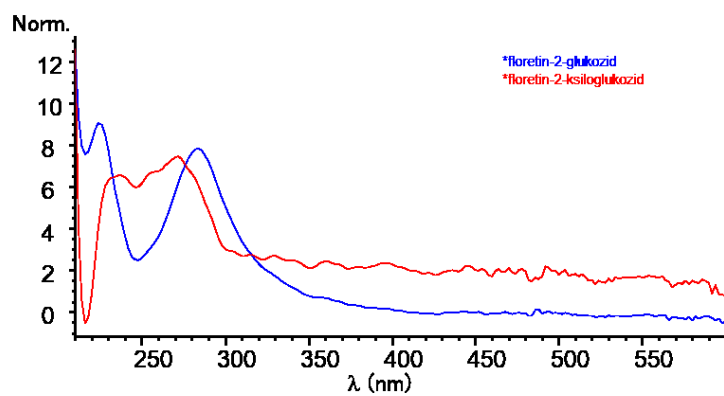
Slika 11 Kromatogram ekstrakta jabuke nakon probave u želudcu sniman na 280, 320, 360 i 510 nm s identificiranim spojevima 3 – (+)-katehin, 4 – procijanidin B2, 5 – klorogenska kiselina, 6 – kriptoklorogenska kiselina, 7 – cijanidin-3-galaktozid, 8 – (-)-epikatehin, 10 - *p*-kumaroilkina kiselina*, 11 – floretin-2-*O*-ksiloglukozid*, 12 – kvercetin-3-galaktozid, 13 – kvercetin-3-glukozid, 14 – derivat kvercetina*, 15 – floretin-2-*O*-glukozid, 16 – kvercetin-3-ksilozid*, 17 – kvercetin-3-ramnozid (* djelomično identificirano)



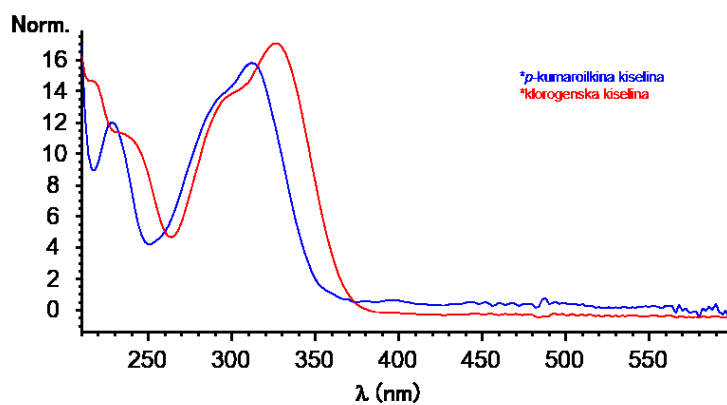
Slika 12 Kromatogram ekstrakta jabuke nakon probave u tankom crijevu sniman na 280, 320 i 360 nm s identificiranim spojevima 2 – neoklorogenska kiselina, 3 – (+)-katehin, 4 – procijanidin B2, 5 – klorogenska kiselina, 6 – kriptoklorogenska kiselina, 8 – (-)-epikatehin, 9 – izomer klorogenske kiseline*, 10 – *p*-kumaroilkinska kiselina*, 11 – floretin-2-*O*-ksiloglukozid, 12 – kvercetin-3-galaktozid, 13 – kvercetin-3-glukozid, 14 – derivat kvercetina*, 15 – floretin-2-*O*-glukozid, 16 – kvercetin-3-ksilozid*, 17 – kvercetin-3-ramnozid (* djelomično identificirano)



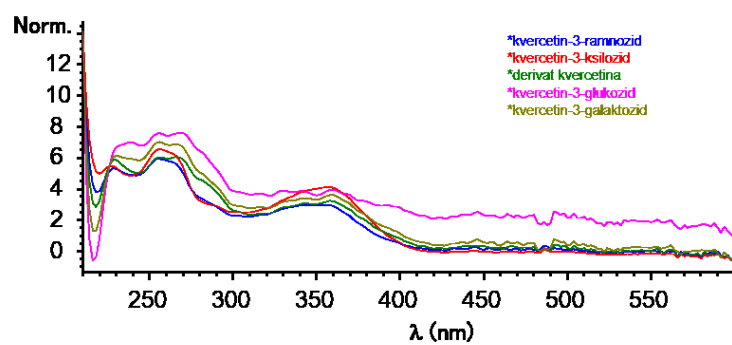
Slika 13 UV/Vis spektri flavan-3-ola jabuke



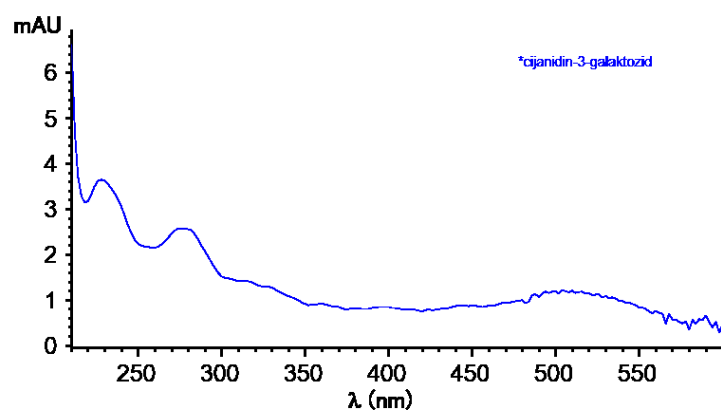
Slika 14 UV/Vis spektri dihidrokalkona jabuke



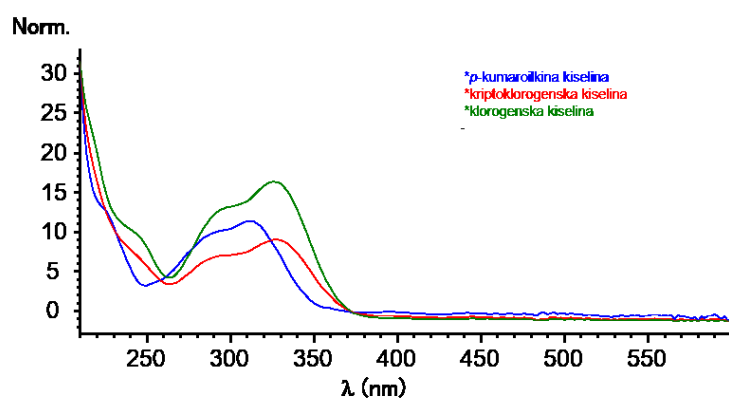
Slika 15 UV/Vis spektri fenolnih kiselina jabuke



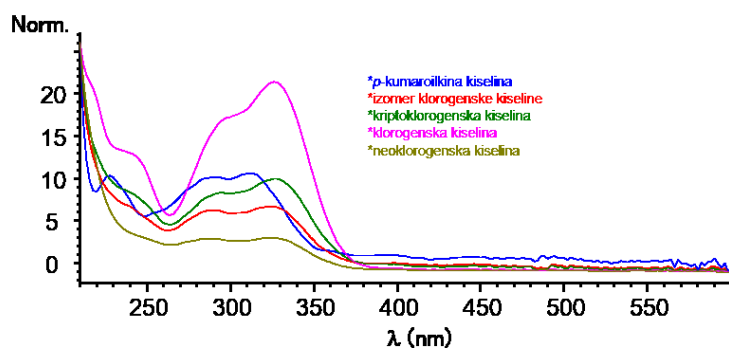
Slika 16 UV/Vis spektri flavonola jabuke



Slika 17 UV/Vis spektri antocijanina jabuke



Slika 18 UV/Vis spektri fenolnih kiselina jabuke nakon probave u želudcu



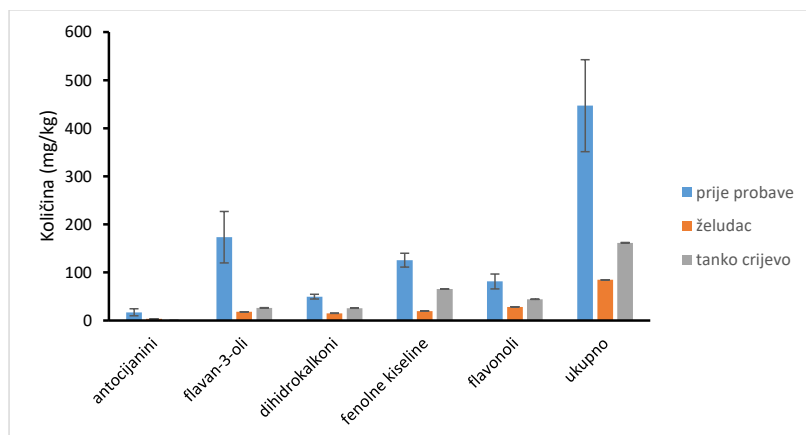
Slika 19 UV/Vis spektri fenolnih kiselina jabuke nakon probave u tankom crijevu

4.2. Polifenolni spojevi u simuliranom probavnom procesu

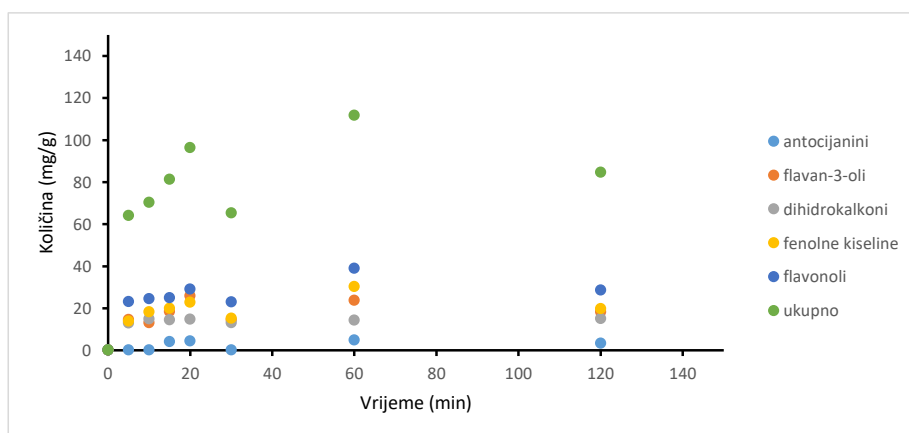
Tablica 1 Količina polifenolnih spojeva u jabuci prije probave i tijekom probave u želudcu i stomaku (mg kg⁻¹ svježe mase)

Prije probave		Želudac							Tanko crijevo						
		5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	60 min	120 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	60 min	120 min
Antocijanini															
cijanidin-3-galaktozid	17,17 ±7,28								7,85 ±0,00						
Flavan-3-oli															
procijanidin B1	13,88 ±4,59														
(+)-katehin	27,47 ±5,61	2,09 ±0,80	1,69 ±0,10	1,80 ±0,05	1,87 ±0,00	1,61 ±0,00	1,85 ±0,04	1,79 ±0,04	4,08 ±0,20	4,08 ±0,00	6,05 ±0,21	4,94 ±0,11	4,97 ±0,00	5,41 ±0,00	4,96 ±0,19
procijanidin B2	69,09 ±25,40	10,80 ±0,45	11,28 ±0,42	12,36 ±0,13	15,39 ±0,12	11,14 ±0,12	13,48 ±0,00	12,07 ±0,05	17,99 ±0,27	17,16 ±0,14	16,29 ±0,00	16,96 ±0,15	15,44 ±0,00	16,87 ±0,16	14,27 ±0,26
(-)-epikatehin	62,87 ±18,49	1,56 ±0,26	0,00 ±	4,17 ±0,00	8,45 ±0,00	1,61 ±0,21	8,27 ±0,04	4,28 ±0,11	13,05 ±1,68	5,53 ±0,20	27,83 ±1,57	11,09 ±0,31	4,16 ±0,10	11,38 ±0,00	7,11 ±0,00
Dihidrochalkoni															
floretin-2-O-ksiloglukozid*	14,30 ±0,39	6,51 ±0,07	6,93 ±0,04	6,33 ±0,00	6,28 ±0,01	6,38 ±0,06	6,14 ±0,02	7,81 ±0,02	12,38 ±0,03	13,08 ±0,00	13,23 ±0,18	13,44 ±0,23	13,33 ±0,10	14,16 ±0,12	12,15 ±0,25
floretin-2-O-glukozid	35,33 ±4,55	6,24 ±0,05	7,84 ±0,05	7,94 ±0,01	8,41 ±0,01	6,62 ±0,06	8,02 ±0,01	7,16 ±0,01	14,36 ±0,00	14,65 ±0,02	16,10 ±0,05	15,27 ±0,04	14,55 ±0,02	17,77 ±0,02	13,64 ±0,12
Fenolne kiseline															
Neoklorogenska kiselina															
Klorogenska kiselina	115,51 ±13,93	9,20 ±0,04	12,44 ±0,02	13,69 ±0,00	16,04 ±0,02	10,00 ±0,01	16,75 ±0,01	13,41 ±0,02	3,21 ±1,09	2,12 ±0,12	7,93 ±0,20	4,13 ±0,19	5,20 ±0,15	5,75 ±0,20	5,88 ±0,33
Kriptoklorogenska kiselina															
Izomer klorogenske kiseline*															
p-kumaroilkina kiselina*	10,01 ±0,49	1,68 ±0,00	2,30 ±0,06	2,29 ±0,07	2,38 ±0,05	1,84 ±0,00	2,41 ±0,00	2,07 ±0,00	41,73 ±0,35	31,44 ±0,12	32,09 ±0,77	35,44 ±0,30	33,85 ±0,45	51,63 ±0,22	37,10 ±0,32
Flavonoli															
kvercetin-3-galaktozid	3,75 ±1,93	0,72 ±0,01	0,61 ±0,00	0,93 ±0,00	1,27 ±0,00	0,76 ±0,01	4,00 ±0,00	2,19 ±0,00	4,56 ±0,04	2,82 ±0,04	4,60 ±0,08	3,23 ±0,02	3,47 ±0,00	5,23 ±0,04	4,63 ±0,00
kvercetin-3-glukozid	22,91 ±6,36	7,27 ±0,05	7,94 ±0,01	7,33 ±0,08	7,37 ±0,00	7,02 ±0,01	7,57 ±0,01	6,62 ±0,01	16,37 ±0,59	11,31 ±0,11	9,63 ±0,00	10,32 ±0,07	14,18 ±0,19		
kvercetin derivat 1	19,91 ±1,48	5,08 ±0,00	5,45 ±0,00	5,26 ±0,01	5,70 ±0,01	4,96 ±0,00	6,49 ±0,01	5,22 ±0,00	4,16 ±0,06	3,79 ±0,02	3,51 ±0,03	3,88 ±0,03	3,79 ±0,02	4,61 ±0,03	3,65 ±0,02
kvercetin-3-ksilozid*	22,52 ±2,51	5,78 ±0,02	6,18 ±0,02	6,28 ±0,04	7,31 ±0,00	5,66 ±0,03	9,39 ±0,00	6,80 ±0,00	2,69 ±0,02	1,69 ±0,01	2,41 ±0,21	1,26 ±0,01	1,83 ±0,01	1,46 ±0,01	1,31 ±0,00
kvercetin -3-ramnozid	12,12 ±3,22	4,20 ±0,01	4,19 ±0,02	5,04 ±0,00	7,30 ±0,00	4,41 ±0,01	11,47 ±0,01	7,67 ±0,00	15,40 ±0,20	16,32 ±0,09	16,16 ±0,02	16,80 ±0,02	16,51 ±0,00	17,44 ±0,04	14,83 ±0,02

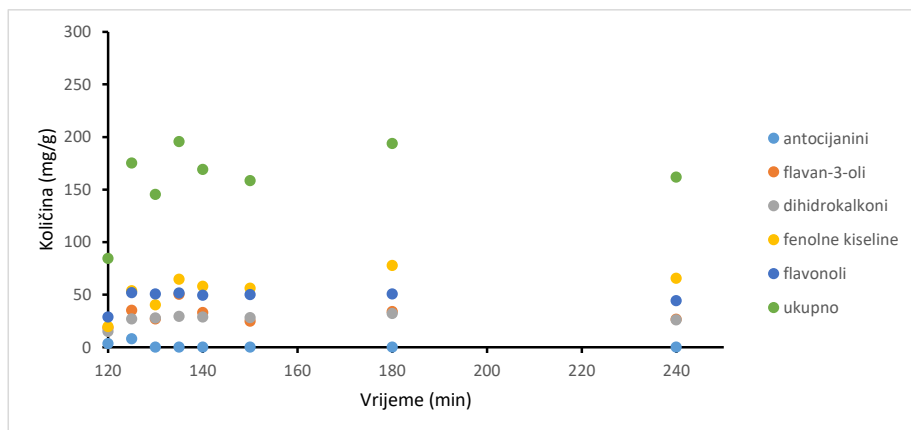
* djelomično identificirani spojevi, za kemijsku i enzimsku ekstrakciju pripremljena su dva ekstrakta koja su analizirana dva puta na HPLC uređaju (n=4), a za simuliranu probavu u želudcu i tankom crijevu pripremljen je po jedan uzorak koji su analizirani dva puta (n=2).



Slika 20 Količina pojedinih polifenolnih skupina i ukupnih polifenolnih spojeva u jabuci prije simulirane probave i nakon završene probave u želudcu i tankom crijevu

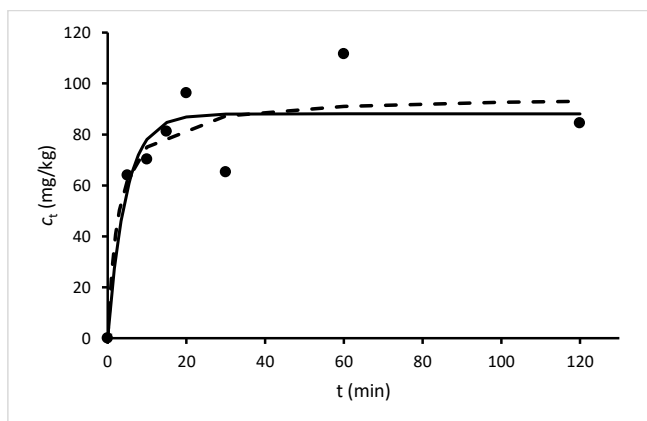


Slika 21 Količina pojedinih polifenolnih skupina i ukupnih polifenolnih spojeva u jabuci prije simulirane probave i tijekom 120 min probave u želudcu

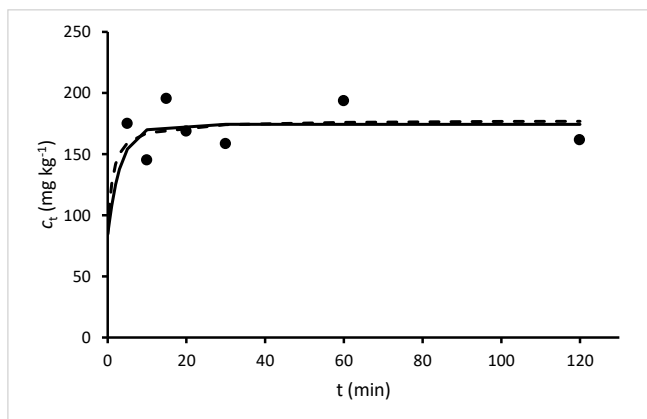


Slika 22 Količina pojedinih polifenolnih skupina i ukupnih polifenolnih spojeva u jabuci prije simulirane probave i tijekom 120 min probave u tankom crijevu (120 do 240 min ukupne probave)

4.3. Kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva tijekom probave



Slika 23 Primjer dijagrama s prikazom ovisnosti C_t (ukupni polifenoli u mg kg^{-1} voća) o t (min) za vrijeme 120 min probave u želudcu, i modeliranje podataka modificiranim jednadžbama prvog i drugog reda
(puna crta - prvi red, isprekidana crta drugi red)

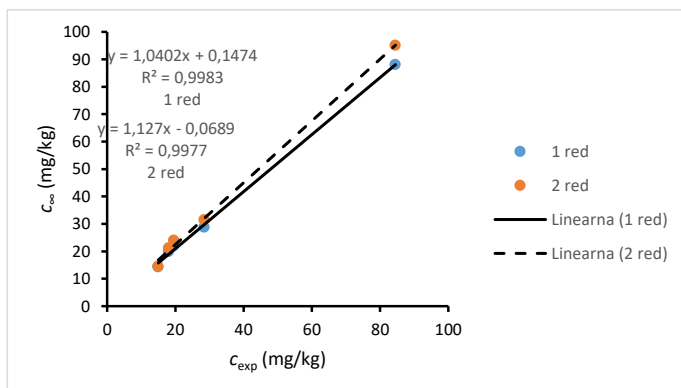


Slika 24 Primjer dijagrama s prikazom ovisnosti c_t (ukupni polifenoli u mg kg^{-1} voća) o t (min) za vrijeme 120 min probave u tankom crijevu, i modeliranje podataka modificiranim jednačbama prvog i drugog reda (puna crta - prvi red, isprekidana crta drugi red)

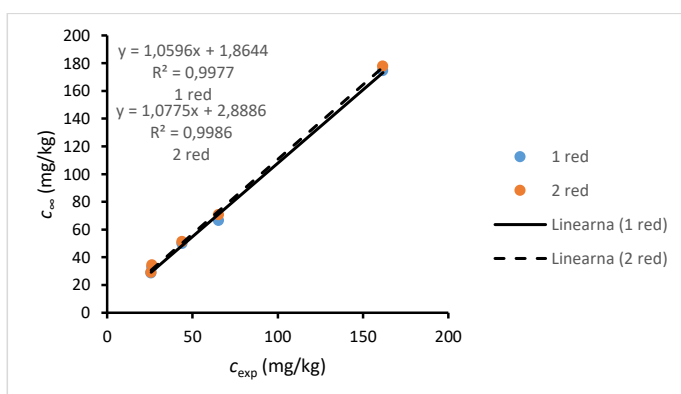
Tablica 2 Parametri modificiranih jednačbi prvog i drugog reda

	Prvi red				Drugi red				C_{exp} (mg kg^{-1})
	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	C_{∞} (mg kg^{-1})	SE	k ($\text{kg mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	$t_{1/2}$ (min)	C_{∞} (mg kg^{-1})	SE	
Želudac									
antocijanini									
flavan-3-oli	0,19	3,61	19,9	4,2	0,018	2,67	21,2	4,2	18,1
dihidroalkoni	0,46	1,51	14,3	0,7	0,133	0,52	14,6	0,8	15,0
Fenolne kiseline	0,18	3,82	22,0	4,5	0,012	3,52	24,0	4,4	19,6
flavonoli	0,26	2,66	28,8	5,2	0,013	2,51	31,5	4,7	28,5
ukupno	0,22	3,20	88,1	14,6	0,004	2,67	95,1	14,0	84,5
Tanko crijevo									
flavan-3-oli	3,30	0,21	32,8	9,5	0,031	2,00	34,3	10,0	26,4
dihidroalkoni	0,38	1,82	28,6	2,0	0,094	0,76	29,0	2,1	25,8
fenolne kiseline	0,12	5,86	66,5	10,7	0,004	5,15	70,6	9,9	65,4
flavonoli	2,45	0,28	49,7	2,8	0,035	1,25	51,2	4,0	44,1
ukupno	0,30	2,31	174,4	21,7	0,009	1,25	177,8	20,8	161,7

SE – standardna greška (engl. standard error)



Slika 25 Ovisnost c_{exp} (mg kg^{-1}) određenih eksperimentalno i c_{∞} (mg kg^{-1}) određenih modelima za otpuštene polifenolne skupine i ukupne polifenole tijekom probave u želudcu (c_{exp} predstavlja količinu polifenolnih spojeva otpuštenih na kraju probave u želudcu određenu eksperimentalno, dok c_{∞} predstavlja količinu otpuštenih polifenolnih spojeva na kraju probave u želudcu predviđenu modelima)



Slika 26 Ovisnost c_{exp} (mg kg^{-1}) određenih eksperimentalno i c_{∞} (mg kg^{-1}) određenih modelima za otpuštene polifenolne skupine i ukupne polifenole tijekom probave u tankom crijevu (c_{exp} predstavlja količinu polifenolnih spojeva otpuštenih na kraju probave u tankom crijevu određenu eksperimentalno, dok c_{∞} predstavlja količinu otpuštenih polifenolnih spojeva na kraju probave u tankom crijevu predviđenu modelima)

5. RASPRAVA

Jabuka je jedno od najkonzumiranijih vrsta voća na svijetu što čini polifenole jabuka prisutnima u prehrani ljudi. Zbog potencijalno pozitivnog utjecaja polifenola na zdravlje, ispitivanje otpuštanja polifenola u probavnom sustavu, kinetike otpuštanja te degradacije polifenola u probavnom sustavu važno je za određivanje utjecaja polifenola jabuke na ljudsko zdravlje. Cilj rada je bio ispitati kinetiku oslobađanja polifenola jabuke tijekom probave u želudcu i tankom crijevu.

Ekstrahirani su polifenolni spojevi iz jabuke kemijskom i enzimima potpomognutom ekstrakcijom te su polifenoli identificirani u ekstraktima jabuke prije probave. **Slika 10** prikazuje kromatogram ekstrakta jabuke prije probave sniman na 280, 320, 360 i 510 nm s identificiranim polifenolnim spojevima. Na 280 nm vidljivi su flavan-3-oli (procijanidin B1, (+)-katehin, procijanidin B2, (-)-epikatehin), te dihidrokalkoni (florethin-2-*O*-ksiloglukozid i florethin-2-*O*-glukozid). Isti spojevi identificirani su pri istoj valnoj duljini u prethodno istraživanom radu (Feliciano i sur., 2010). Na 320 nm vidljive su dvije fenolne kiseline (klorogenska kiselina i *p*-kumaroil-kina kiselina). Na 360 nm pronađeni su flavonoli (kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid, derivat kvercetina, kvercetin-3-ksilozid i kvercetin-3-ramnozid). Na 510 nm vidljivi su antocijanini (cijanidin-3-galaktozid).

Nakon provedene simulirane probave, identificirani su polifenoli koji su otpušteni u želudcu i tankom crijevu (**Slika 11 i 12**). **Slika 11** prikazuje kromatogram ekstrakta jabuke nakon probave u želudcu koji je sniman na 280, 320, 360 i 510 nm. Uspoređujući kromatogram ekstrakta jabuke prije probave s kromatogramom ekstrakta jabuke nakon probave u želudcu, može se vidjeti da su nakon probave u želudcu prisutni isti spojevi. Jedina razlika je u polifenolu procijanidinu B1 koji nakon probave u želudcu nije identificiran, te u kriptoklorogenskoj kiselini koja je vidljiva nakon probave u želudcu iako prije probave nije bila identificirana u jabuci. Pronađeni spojevi otpušteni tijekom faze u želudcu slični su identificiranim spojevima u prethodno istraženom radu (Liu i sur., 2020).

Slika 12 prikazuje kromatogram ekstrakta jabuke nakon probave u tankom crijevu koji je sniman na 280, 320 i 360 nm s identificiranim polifenolnim spojevima. U usporedbi s kromatogramom ekstrakta jabuke prije probave te nakon probave u želudcu, pojavila se neoklorogenska kiselina te izomer klorogenske kiseline. Cijanidin-3-galaktozid nije identificiran nakon probave u tankom crijevu (510 nm). Identificirani polifenolni spojevi prije i tijekom probave slični su polifenolima koji su pronađeni u prethodno istraženim radovima (Jakobek i sur., 2021; Feng i sur., 2021; Jakobek i sur., 2023).

Slike 13, 14, 15, 16 i 17 prikazuju UV/Vis spektre identificiranih polifenolnih spojeva jabuke koji dogovaraju spektrima autentičnih spojeva. Kod flavan-3-ola vidljiv je maksimum na 280 nm, kod dihidrokalkona na 280 - 290 nm, kod fenolnih kiselina tipičan maksimum na oko 330-340 nm za klorogensku kiselinu, te oko 310-320 nm za *p*-kumaroilkina kiselinu. Dva tipična maksimuma vidljiva su kod flavonola na oko 270 i 360 nm, te kod antocijanina na oko 280 i 510 nm. Ovi podaci odgovaraju onima dobivenim u ranijem istraživanju (Ištuk, 2022). S obzirom da su tijekom probave identificirani dodatni spojevi, njihovi UV/Vis spektri prikazani su na slikama 18 i 19. **Slika 18** prikazuje UV/Vis spektre fenolnih kiselina jabuke nakon probave u želudcu. U ovoj fazi identificirana je kriptoklorogenska kiselina s maksimumom na oko 330 nm. **Slika 19** prikazuje UV/Vis spektre fenolnih kiselina jabuke nakon probave u tankom crijevu gdje su se uz kriptoklorogensku kiselinu pojavile neoklorogenska kiselina i izomer klorogenske kiseline pri maksimumu na oko 330 nm.

Nakon identifikacije, određena je količina pojedinih polifenola prije i tijekom probave. **Tablica 1** prikazuje količinu pojedinih polifenolnih spojeva u jabuci prije probave i tijekom probave u želudcu i tankom crijevu. Količine pojedinih polifenolnih spojeva nakon probave u želudcu (120 min) manje su u usporedbi s količinama koje se nalaze prirodno u jabuci (prije probave). Isto tako, količine pojedinih polifenolnih spojeva nakon probave u tankom crijevu (120 min) manje su od količina koji se nalaze prirodno u jabuci. Manje količine polifenolnih spojeva tijekom procesa probave u usporedbi s količinama prije probave, u skladu su s ranijim istraživanjima. Rezultati istraživanja (Jakobek i sur., 2023; Jakobek i sur., 2021) ukazuju na to da je količina polifenolnih spojeva tijekom probavnog procesa u želudcu i tankom crijevu niža od količine koja se nalazi prirodno u jabuci.

Vidljive su određene razlike u pojedinim polifenolnim spojevima koji su identificirani u želudcu i tankom crijevu s obzirom na prirodne polifenole u jabuci. U želudcu, procijanidin B1 nije identificiran, a od uobičajeno prisutnih fenolnih kiselina, dodatno je identificirana kriptoklorogenska kiselina. Razlike u polifenolnim spojevima u želudcu moguće su zbog različitih pH vrijednosti u probavi. Naime, polifenolni spojevi u simuliranoj probavi u ustima prolaze kroz pH vrijednost 7 te se nakon toga pH vrijednost smanjuje na 3 u simuliranoj probavi želuca. Prema ranijim istraživanjima pH potiče izomerizaciju klorogenske kiseline u kriptoklorogensku kiselinu koja je ovdje identificirana nakon probave u želudcu.

U tankom crijevu, nije identificiran procijanidin B1 i cijanidin-3-galaktozid. U tankom crijevu pH vrijednost raste na pH 7 što uzrokuje nestajanje antocijanina zbog prelaska u druge

strukturne forme. Naime, antocijanini mijenjaju formu s obzirom na pH vrijednost. Pri niskim pH vrijednostima prisutni su u obliku flavilijeovog kationa, dok na višim pH vrijednostima kao u tankom crijevu prelaze u bezbojnu karbinol pseudo bazu koja nije identificirana. Flavan-3-oli se mogu degradirati pri višim pH vrijednostima što je dovelo do nestanka procijanidina B1. Uz uobičajene fenolne kiseline, identificirana je kriptoklorogenska kiselina, neoklorogenska kiselina te jedan novi izomer klorogenske kiseline. Pojava neoklorogenske kiseline te izomera klorogenske kiseline u tankom crijevu navodi na pretpostavku da se i ovdje desila izomerizacija klorogenske kiseline u kriptoklorogensku i neoklorogensku kiselinu te u jedan novi, neidentificirani izomer. Ovi rezultati slični su rezultatima istraživanja Jakobek i sur. (2023).

Nakon identifikacije i ponašanja pojedinih polifenola prije i tijekom probave u želudcu i tankom crijevu, prikazane su i količine ukupnih polifenolnih skupina i ukupnih polifenola tijekom probave. Ovi ukupni polifenoli daju jasniji uvid u ponašanje polifenola tijekom probavnog procesa, a prikazani su na **slikama 20, 21 i 22**. **Slika 20** prikazuje ukupnu količinu polifenolnih skupina i ukupnih polifenolnih spojeva u jabuci prije simulirane probave i nakon potpuno završene probave u želudcu i tankom crijevu. Vidljivo je da se tijekom probave nisu oslobodile sve količine polifenola. Jedan dio se oslobodio tijekom probave u želudcu, a jedan dio u tankom crijevu, ali je otpuštena količina manja od količine prije probave.

Slika 21 i 22 prikazuju oslobađanje ukupnih polifenolnih skupina i ukupnih polifenola tijekom 120 min probave u želudcu i 120 min probave u tankom crijevu. Polifenolni spojevi se u želudcu postepeno oslobađaju tijekom 20 min nakon čega se njihova količina stabilizira. Slično, postepeno oslobađanje polifenola u tankom crijevu vidi se tijekom prvih 10 do 20 min nakon čega se količina stabilizira.

Daljnji podaci o polifenolnim spojevima tijekom probave dobiveni istraživanjem kinetike ovog procesa, analiziranjem podataka c_t vs t nelinearnom regresijom pomoću modificiranih jednadžbi brzina reakcija prvog i drugog reda (jednadžba 1 i 2). **Slika 23 i 24** prikazuju primjere dijagrama s prikazom ovisnosti c_t (ukupni polifenoli u mg kg^{-1} voća) o t (min) za vrijeme 120 min probave u želudcu i u tankom crijevu s krivuljama prvog i drugog reda dobivenim nelinearnom regresijom. Krivulje koje prolaze kroz eksperimentalne podatke dale su parametre jednadžbi: k , i c_∞ . Nakon toga su izračunata vremena polureakcije prema jednadžbama 3 i 4.

Tablica 2 prikazuje parametre jednadžbi te izračunata vremena polureakcije. Promatrajući predviđeno vrijeme polureakcije prema jednadžbi prvog reda, vidljivo je da je

ono u želudcu od 1,51 do 3,82 minute, a u tankom crijevu od 0,21 do 5,86 minuta. Vrijeme polureakcije za drugi red daje slične vrijednosti oslobađanja polifenola, u želudcu od 0,52 do 3,52 minute, a u tankom crijevu od 0,76 do 5,15 minuta. Prema tome, jednadžbe prvog i drugog reda predviđaju oslobađanje polovice polifenola u prvih nekoliko minuta probave i predviđaju slične vrijednosti. Promatrajući c_{∞} koji predviđa količinu polifenola oslobođenih na kraju probave vidljivo je da se prema prvom redu reakcije u želudcu može osloboditi 14,3 do 28,8 mg kg⁻¹ polifenola, a u tankom crijevu od 28,6 do 66,5 mg kg⁻¹ polifenola, ovisno o polifenolnoj skupini. Predviđene količine slične su prema reakciji drugog reda. Naime, prema drugom redu u želudcu se potencijalno može osloboditi 14,6 do 31,5 mg kg⁻¹ polifenola, a u tankom crijevu od 29,0 do 70,6 mg kg⁻¹ polifenola, ovisno o polifenolnoj skupini. S obzirom na ove rezultate vidljivo je da su modificirane jednadžbe prvog i drugog reda dale su slične vrijednosti parametara c_{∞} i $t_{1/2}$.

Da bi se vidjelo slaganje vrijednosti c_{∞} predviđenih modelima s eksperimentalno određenim vrijednostima (c_{exp}), ove vrijednosti su stavljene u korelaciju. **Slika 25 i 26** prikazuju ovisnost c_{exp} (mg kg⁻¹) i c_{∞} (mg kg⁻¹) za otpuštene polifenolne skupine i ukupne polifenole tijekom probave u želudcu i tankom crijevu. Vrijednosti koeficijenta determinacije r^2 su visoke za probavu u želudcu (prvi red 0,9983, drugi red 0,9977) te probavu u tankom crijevu (prvi red reakcije 0,9977, drugi red 0,9986). Može se zaključiti da su količine polifenolnih spojeva otpuštenih na kraju probave u želudcu i tankom crijevu određenih eksperimentalno c_{exp} slične količinama predviđenim modelima c_{∞} .

U ovom radu ispitana je kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva iz jabuke tijekom probave u želudcu i tankom crijevu. Analizom je utvrđeno da je količina polifenolnih spojeva tijekom probave niža od količina koja se nalazi prirodno u jabuci. U određenim fazama su identificirani novi spojevi, došlo je i do degradacije ili do prelaska u nove strukturne forme zbog različite pH vrijednosti tijekom probave. Ova saznanja daju dodatan uvid u ponašanje polifenola u probavnom traktu, dijelu ljudskog organizma koji je iznimno važan za pozitivno djelovanje polifenola. Ispitivanje rezultata oslobađanja polifenola kroz vrijeme pomoću novih, modificiranih jednadžbi prvog i drugog reda pokazalo je da su ove jednadžbe dobre, daju vrijednosti koje su vrlo slične eksperimentalnim vrijednostima.

6. ZAKLJUČAK

U ovome radu doneseni su idući zaključci na temelju rezultata istraživanja:

1. U jabukama su identificirani flavan-3-oli (procijanidin B1, (+)-katehin, procijanidin B2, (-)-epikatehin), dihidrokalkoni (florelin-2-*O*-ksiloglukozid i florelin-2-*O*-glukozid) fenolne kiseline (klorogenska kiselina i *p*-kumaroilkinska kiselina), flavonoli (kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid, derivat kvercetina, kvercetin-3-ksilozid i kvercetin-3-ramnozid), i antocijanini (cijanidin-3-galaktozid), spojevi koji su uobičajeno prisutni u jabukama prema ranijim istraživanjima
2. Tijekom probave u želudcu identificirani su isti spojevi, uz dodatnu identifikaciju kriptoklorogenske kiseline. Procijanidin B1 nije identificiran.
3. Tijekom probave u tankom crijevu identificirani su isti spojevi, uz dodatnu identifikaciju kriptoklorogenske kiseline, neoklorogenske kiseline, izomera klorogenske kiseline. Nije identificiran antocijanin cijanidin-3-galaktozid i flavan-3-ol procijanidin B1.
4. Pojava dodatnih klorogenskih kiselina u želudcu i tankom crijevu ukazuje na izomerizaciju klorogenske kiseline pri različitim pH vrijednostima u želudcu i tankom crijevu. Izostanak procijanidina B1 ukazuje na degradaciju flavan-3-ola. Izostanak identifikacije cijanidin-3-galaktozida u tankom crijevu ukazuje na prelazak antocijanina u drugačije strukturne forme.
5. Količina polifenolnih spojeva tijekom probave u želudcu i tankom crijevu manja je od količine koja se prirodno nalazi u jabuci.
6. Polifenolni spojevi se postepeno oslobađaju tijekom probave.
7. Analiza podataka c_t vs t pomoću modificiranih jednadžbi prvog i drugog reda omogućila je određivanje parametara jednadžbi: vrijeme polureakcije te količina oslobođenih polifenola na kraju procesa probave. Vrijeme polureakcije dalo je uvid u oslobađanje polifenola tijekom probave koje je najintenzivnije u prvim nekoliko minuta probave. Predviđene konačne količine oslobođenih polifenola na kraju probave odgovaraju eksperimentalno određenim vrijednostima što se vidi po visokom koeficijentu determinacije.
8. Modificirane jednadžbe prvog i drugog reda mogu se upotrebljavati za analizu podataka oslobađanja polifenola tijekom simulirane probave.

6. LITERATURA

Atkins P: *The elements of physical chemistry*. Oxford University Press, Oxford, 2001.

Berend S, Grabarić Z: Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u protok. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 59: 205-212, 2008.

Bergantin C, Maietti A, Cavazzini A, Pasti L, Tedeschi P, Brandolini V, Marchetti N: Bioaccessibility and HPLC-MS/MS chemical characterization of phenolic antioxidants in Red Chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of Functional Foods* 33:94-102, 2017.

Bouayed J, Hoffman L, Bohn T: Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry* 128:14-21, 2011.

Bravo L: Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* 56: 317-333, 1998.

Butterworth PJ, Warren FJ, Grassby T, Patel H, Ellis PR: Analysis of starch amylolysis using plots for first-order kinetics. *Carbohydrate Polymers* 87:2189–2197, 2012.

Feliciano RP, Antunes C, Ramos A, Serra AT, Figuera ME, Duarte CMM, Carvalho A de, Bronze MR: Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical and sensory evaluation. *Journal of Functional Foods* 2:35-45, 2010.

Feng S, Jianyong Y, Xuan L, Xinye W, Yuanyuan Z, Youchuan M, Jinfeng B: Systematic review of phenolic compounds in apple fruits: Compositions, distribution, absorption, metabolism, and processing stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69:7–27, 2021.

Gao X, Zhang S, Wang L, Yu L, Zhao X, Ni H, Wang Y, Wang J, Shan C, Fu Y: Anti-inflammatory effects of neochlorogenic acid extract from mulberry leaf (*Morus alba* L.) against LPS-stimulated inflammatory response through mediating the AMPK/Nrf2 signaling pathway in A549 cells. *Molecules* 25: 1385, 2020.

Herak M, Kušec LJ, Marković M, Petreski A, Škorić K, Galas D: *Osnove fizikalne kemije*. Školska knjiga, Zagreb, 1992.

Ištuk J: Utjecaj β -glukana na bioraspoloživost polifenola voća ispitivanjem kinetičkih modela simuliranih probavnih procesa. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2022.

Jakobek, L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

Jakobek L, Matić P: Non-covalent dietary fiber - polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology* 83, 235–247, 2019.

Jakobek L, Ištuk J, Buljeta I, Voća S, Šic Žlabur J, Skendrović Babojelić M: Traditional, indigenous apple varieties, a fruit with potential for beneficial effects: their quality traits and bioactive polyphenol contents. *Foods* 9:52, 2020.

Jakobek L, Ištuk J, Matić P, Skendrović Babojelić M: Interactions of polyphenols from traditional apple varieties 'Bobovac', 'Ljepocvjetka' and 'Crvenka' with β -Glucan during in vitro simulated digestion. *Food Chemistry* 363: 130283, 2021.

Jakobek L, Ištuk J, Barron AR, Matić P: Bioactive phenolic compounds from apples during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion: Kinetics of their release. *Applied Sciences* 13:8434, 2023.

Jakobek, L. Blesso, C. Beneficial effects of phenolic compounds: native phenolic compounds vs metabolites and catabolites. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, First online, 2023.

Lorenzo, J.M., Estévez, M., Barba, F.J., Thirumdas, R., Franco, D., Munekata, P.E.S.: Polyphenols: Bioaccessibility and bioavailability of bioactive components. U *Innovative*

thermal and non-thermal processing, bioaccessibility and bioavailability of nutrients and bioactive compounds, 309–332. Elsevier Inc. 2019.

Liu D, Dhital S, Wu P, Chen XD, Gidley JM: In vitro digestion of apple tissue using a dynamic stomach model: grinding and crushing effects on polyphenol bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68: 574-583, 2020.

Matić P: Ravnotežna i kinetička istraživanja adsorpcije polifenolnih spojeva na β -glukanu. Doktorska disertacija. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2021.

Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carrière F, Boutrou R, Corredig M, Dupont D, Dufour C, Egger L, Golding M, Karakaya S, Kirkhus B, Le Feunteun S, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie A, Marze S, McClements DJ, Ménard O, Recio I, Santos CN, Singh RP, Vegarud GE, Wickham MSJ, Weitschies W, Brodkorb A: A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function* 5: 1113-1124, 2014.

Rodríguez-Daza, M. C., Pulido-Mateos, E. C., Lupien-Meilleur, J., Guyonnet, D., Desjardins, Y., Roy, D. (2021): Polyphenol-mediated gut microbiota modulation: toward prebiotics and further. *Frontiers in Nutrition* 8: 689456, 2021.

Vongsak B, Gritsanapan W, Sithisarn P: Simultaneous Determination of crypto-chlorogenic acid, isoquercetin, and astragalin contents in *Moringa oleifera* leaf extracts by TLC-densitometric method. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 917609, 2013.

Zovko P: Utjecaj podneblja na tehnologiju i zaštitu kod uzgoja jabuke u voćnjacima Dobro-Petrić d.o.o. i Voćarstvo Boić. *Završni rad*. Poljoprivredni odjel, Požega, 2017.