

# Kinetika otpuštanja polifenola aronije u simuliranom probavnom procesu

---

**Beljan, Kristina**

**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:109:039567>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-15**

REPOZITORIJ

PTF OS

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**

**Kristina Beljan**

**KINETIKA OTPUŠTANJA POLIFENOLA ARONIJE 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** Prehrambeno inženjerstvo  
**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Fizikalna kemija  
**Tema rada:** Prihvaćena je na X. redovitoj sjednici Fakultetskog Vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 17. srpnja 2023. godine  
**Mentor:** prof. dr. sc. *Lidija Jakobek Barron*  
**Komentor:** doc. dr. sc. *Valentina Bušić*  
**Pomoć pri izradi:**

### Kinetika otpuštanja polifenola aronije u simuliranom probavnom procesu

Kristina Beljan, 0113146095

**Sažetak:** Cilj je bio ispitati kinetiku otpuštanja polifenolnih spojeva iz aronije tijekom probave u želudcu i tankom crijevu. Da bi se odredila količina polifenolnih spojeva prije probavnog procesa, provedena je kemijska ekstrakcija aronije i ekstrakcija pomognuta enzimima. *In vitro* probava aronije provena je simuliranjem probave u želudcu i tankom crijevu, u različitim vremenskim periodima (5, 10, 15, 20, 30, 60 i 120 min). Identifikacija i kvantifikacija polifenolnih spojeva provedena je RP-HPLC metodom (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography). U aroniji su prije i nakon probave u želudcu i tankom crijevu identificirane fenolne kiseline (neoklorogenska i klorogenska kiselina), antocijani (cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-arabinozid i cijanidin-3-ksilozid) i flavonoli (kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-galaktozid i kvercetin-3-glukozid). Prije probave u najvećem postotku u aroniji su bili prisutni antocijanini (66 %), zatim fenolne kiseline (26 %) te flavonoli (8 %). Slična postotna raspodjela pronađena je nakon probave u želudcu (antocijanini 58 %, fenolne kiseline 36 %, flavonoli 6 %), dok se postotna raspodjela u tankom crijevu razlikovala (fenolne kiseline 56 %, antocijanini 27 %, flavonoli 17 %). Ove promjene moguće su zbog različite pH vrijednosti tijekom probave u želudcu i tankom crijevu. Dobiveni podatci (količina polifenolnih skupina otpuštena tijekom probave ( $c_t$ ) vs vrijeme ( $t$ )) analizirani su nelinearnom regresijom upotrebljavajući modificirane jednadžbe prvog i drugog reda. Predviđeno je brzo vrijeme otpuštanja polifenola ( $t_{1/2}$  prvi red: želudac 0,94 - 2,31 min, tanko crijevo 0,82 - 4,10 min; drugi red: želudac 0,63 do 1,02 min, tanko crijevo 0,77 do 2,50 min). Visoka korelacija između  $c_{\infty}$  predviđenih modelom i eksperimentalnim vrijednostima ukazuje na mogućnost upotrebe modela za analiziranje simulirane probave.

**Ključne riječi:** želudac, tanko crijevo, kinetika, jednadžbe brzine reakcije, *Aronia melanocarpa*

**Rad sadrži:** 41 stranica  
24 slike  
2 tablice  
0 priloga  
32 literaturne reference

**Jezik izvornika:** Hrvatski

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

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. doc. dr. sc. Ivana Tomac                         | predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek Barron</i>       | član-mentor   |
| 3. prof. dr. sc. Ivica Strelec                      | član          |
| 4. dr. sc. <i>Petra Matić</i> , znanstveni suradnik | zamjena člana |

**Datum obrane:** 22. rujna 2023.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, 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** Food 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.X. held on July 17. 2023.  
**Mentor:** Lidija Jakobek Barron, PhD, Full Professor  
**Comentor:** Valentina Bušić, PhD, Assistant Professor  
**Technical assistance:**

### The Kinetics of the Release of Phenolic Compounds From Aronia in the Simulated Gastrointestinal Digestion

Kristina Beljan, 011346095

**Summary:** The aim was to study the kinetics of the release of polyphenolic compounds from chokeberry during digestion in the stomach and small intestine. In order to determine the amount of polyphenolic compounds before the digestion, chemical and enzyme-assisted extraction were performed. *In vitro* digestion of chokeberry was conducted by simulating digestion in the stomach and small intestine, in different time periods (5, 10, 15, 20, 30, 60 and 120 min). Identification and quantification of polyphenolic compounds was performed using the RP-HPLC method (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography). Phenolic acids (neochlorogenic and chlorogenic acid), anthocyanins (cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabinoside and cyanidin-3-xyloside) and flavonols (quercetin-3-rutinoside, quercetin-3-galactoside and quercetin-3-glucoside) were identified in chokeberry before and after the digestion in the stomach and small intestine. Before digestion, anthocyanins (66 %) were present in the highest percentage in chokeberry, followed by phenolic acids (26%) and flavonols (8%). A similar percentage distribution was found after digestion in the stomach (anthocyanins 58%, phenolic acids 36%, flavonols 6%), while the total distribution in the small intestine differed (phenolic acids 56%, anthocyanins 27%, flavonols 17%). These changes are possible due to different pH values during digestion in the stomach and small intestine. The obtained data (the amount of polyphenolic groups released during digestion ( $c_t$ ) vs time ( $t$ )) were analyzed by non-linear regression using modified equations of the first and second order. The rapid release time of polyphenols was predicted ( $t_{1/2}$  first order: stomach 0.94 - 2.31 min, small intestine 0.82 - 4.10 min; second order: stomach 0.63 to 1.02 min, small intestine 0.77 to 2.50 min). The high correlation between  $c_\infty$  predicted by the model and experimental values indicated the possibility of using equations to analyze simulated digestion.

**Keywords:** stomach, small intestine, kinetics, rate law, *Aronia melanocarpa*

**Thesis contains:** 41 pages  
24 figures  
2 tables  
0 supplements  
32 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

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

**Defense date:** September 22, 2023.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1 Aronija.....	4
2.2 Polifenolni spojevi.....	4
2.2.1 Flavonoidi.....	4
2.2.2 Flavonoli.....	5
2.2.3 Antocijanini.....	5
2.2.4 Fenolne kiseline.....	6
2.3 Polifenolni spojevi aronije.....	6
2.4 Potencijalno pozitivno djelovanje polifenola aronije.....	8
2.5 Kemijska kinetika.....	9
2.5.1 Brzina reakcije, jednadžba za brzinu reakcije, red reakcije.....	9
2.5.2 Modificirane jednadžbe prvog i drugog reda.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1 Zadatak rada.....	13
3.2 Materijali i metode.....	13
3.2.1 Kemikalije.....	13
3.2.2 Priprema simuliranih probavnih tekućina.....	14
3.2.3 Priprema uzoraka aronije.....	14
3.2.4 Kemijska ekstrakcija polifenola aronije.....	14
3.2.5 Enzimaska ekstrakcija polifenola aronije.....	14
3.2.6 Simulirana probava.....	15
3.2.7 Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija.....	15
3.2.8 Kinetika procesa simulirane probave.....	16
3.2.9 Statistička obrada podataka.....	16
4. REZULTATI.....	17
4.1 Polifenolni spojevi aronije.....	18
4.2 Polifenolni spojevi u simuliranom probavnom procesu .....	23
4.3 Kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva tijekom probave.....	27
5. RASPRAVA.....	30
6. ZAKLJUČAK.....	34

7. LITERATURA.....	37
--------------------	----

## **1. UVOD**

Polifenoli su vrlo brojna skupina spojeva (Jakobek, 2007) u kojoj se bilježi više od 8000 različitih molekula (Harbone i sur., 2000). Struktura se sastoji od hidroksilnih skupina koje su vezane na aromatske skupine, jednu ili više njih (Vermerris i Nicholson, 2006). S obzirom na strukturu dijele se na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (Manach i sur., 2004).

Polifenoli su značajni u ljudskoj prehrani zbog potencijalno pozitivnih utjecaja na zdravlje. Apsorpcijom u određenim granicama mogu imati pozitivan utjecaj na organizam (Manach i sur., 2004). Svojom antioksidacijskom aktivnošću doprinose pozitivnom djelovanju i smanjenju štetnih učinaka na ljudsko zdravlje (Shivashankara i Acharya, 2010). Uključeni su i u interakcije sa sastojcima hrane, odnosno komponentama kao što su ugljikohidrati, lipidi i proteini (Jakobek, 2015). Također se smatraju važnima u metabolizmu biljaka gdje služe za obranu od UV zračenja, za pigmentaciju i razmnožavanje (Manach i sur., 2004).

Jedan od najvažnijih izvora polifenola je bobičasto voće (Jakobek, 2007). Aronija (*Aronia melanocarpa*), poznatija i kao crnoplodna aronija, svojim kemijskim sastavom doprinosi nizu pozitivnih utjecaja. Njezino djelovanje očituje se u zaštiti stanica od oksidacijskog stresa te detoksikaciji. Nadalje, bogata je polifenolnim spojevima i prepoznatljiva po bijelim cvjetovima, a njezini plodovi su bobice tamnije boje koji se prerađuju u sokove i džemove zbog karakterističnog kiselog okusa (Kokotkiewicz, 2010). Da bi polifenoli aronije pokazali potencijalno pozitivno djelovanje u ljudskom organizmu, moraju se otpustiti iz matriksa hrane u probavnom traktu. Iako se istražuje njihovo pozitivno djelovanje na druge dijelove organizma, oni i unutar probavnog trakta mogu pokazati pozitivno djelovanje. Kinetika otpuštanja polifenola tijekom probave može dati odgovore na oblik polifenolnih spojeva aronije koji su prisutni u probavi, ali i njihovu pojavnost tijekom vremena probave što može dati doprinos objašnjenju pozitivnog utjecaja u probavnom traktu.

Cilj ovog rada bio je ispitati kinetiku otpuštanja polifenolnih spojeva iz aronije tijekom probave u želudcu i tankom crijevu. Da bi se odredila količina polifenolnih spojeva prije probavnog procesa, provedena je kemijska ekstrakcija aronije i ekstrakcija pomognuta enzimima. *In vitro* probava aronije provedena je simuliranjem probave u želudcu i tankom crijevu, u različitim vremenskim periodima (5, 10, 15, 20, 30, 60 i 120 min). Dobiveni podatci (količina polifenolnih skupina otpuštena tijekom probave ( $c_t$ ) vs vrijeme ( $t$ )) analizirani su nelinearnom regresijom, a kao jednadžbe su korištene modificirane jednadžbe prvog i drugog reda.



## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. ARONIJA

Aronija (Slika 1) vrsta je listopadnog grma s područja Sjeverne Amerike iz porodice ruža (*Rosaceae*). Razlikuju se dvije osnovne vrste aronije: *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot i *Aronia arbutifolia* (L.) Pers. Vrsta koja je našla široku primjenu u Europi, ali i diljem svijeta je *Aronia melanocarpa* (Tolić i sur., 2017). Okolni faktori poput klimatskih uvjeta uzgoja, tla te vlažnosti utječu na uspješnost uzgoja aronije (Tolić i sur., 2017). Aronija je vrlo dostupna vrsta bobičastog voća, a plodovi se konzumiraju svježi, suhi ili zamrznuti. Osim toga, vrlo često se prerađuje u vino, kompot, džem.



Slika 1. *Aronia melanocarpa* (crnoplodna aronija)

(<https://prirodni-sokovi.hr/aronija-i-sve-o-njoj/>)

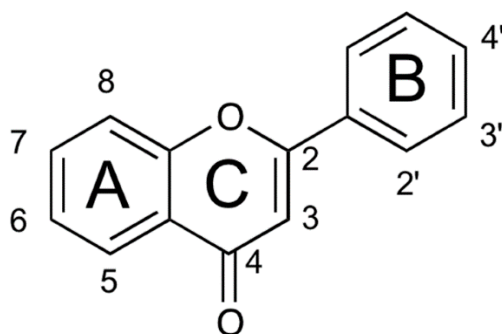
## 2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenoli su spojevi iz heterogene skupine, klasificirani prema strukturi, broju ugljikovih atoma te biološkoj aktivnosti. Riječ je o jednostavnim molekulama kao što su fenolne kiseline, ali i molekulama kompleksnije građe i velike molekulske mase poput tanina (Bravo, 1998; Wollgast i Anklam 2000; Jakobek, 2007).

### 2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva osnovne strukture (Slika 2) primarno građene od atoma ugljika međusobno povezanih u jezgru od dva aromatska prstena i jednim

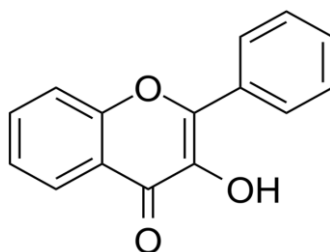
heterocikličnim prstenom (A, B i C) i hidroksilnim skupinama (OH). Skupini flavonoida pripadaju flavanoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanini, flavonoli i dr. Ove skupine različite su prema stupnju oksidacije prstena C, stupnju nezasićenosti te broju i položaju hidroksilnih skupina (Wollgast i Anklam 2000). Flavonoidi su aktivne komponente prisutne u biljkama, u kojima djeluju antioksidacijski, antimikrobno te pružaju zaštitu od UV zračenja. Odgovorni su za boju plodova, latica, vrlo često i listova. Glavni flavonoidi u aroniji su flavonoli i antocijanini.



**Slika 2.** Osnovna struktura flavonoida  
(Crozier i sur., 2006)

### 2.2.2 Flavonoli

Flavonoli (**Slika 3**) su flavonoidi osnovne kemijske strukture C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> u formi glikozida. Na hidroksilne skupine vezane su molekule šećera. Glukoza je glavni izvor šećera koji sudjeluje u vezanju, iako se vežu i drugi šećeri poput galaktoze, ramnoze, arabinoze, ksiloze (Jakobek, 2007). Karakterizira ih slaba topljivost u vodi, a odgovorni su za žutu boju.

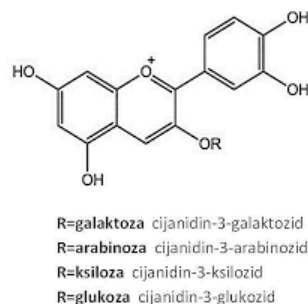


**Slika 3.** Kemijska struktura flavonola

### 2.2.3 Antocijanini

Antocijanini (**slika 4**) su skupina polifenola topivih u vodi (Jakobek, 2007).

Karakteristični su po boji, a voće i povrće boje u tamne nijasne crvene i plave. U bazgi, crnom ribizu, borovnicama i crnom grožđu zabilježene su velike količine antocijanina. Karakterizira ih pozitivan naboj na kisiku u heterocikličnom prstenu C (Jakobek, 2007). Na molekuli antocijanidina vezana je glukoza, galaktoza, ramnoza ili neka druga molekula šećera.



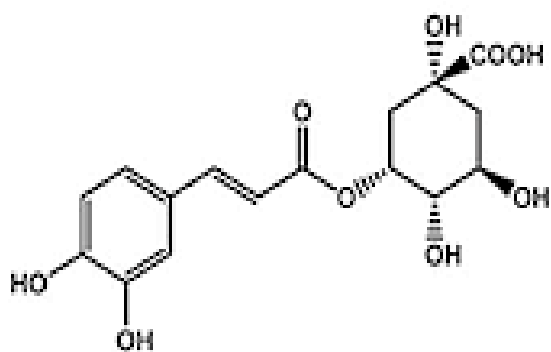
**Slika 4** Kemijska struktura antocijanina (Ho i sur., 2014)

#### 2.2.4. Fenolne kiseline

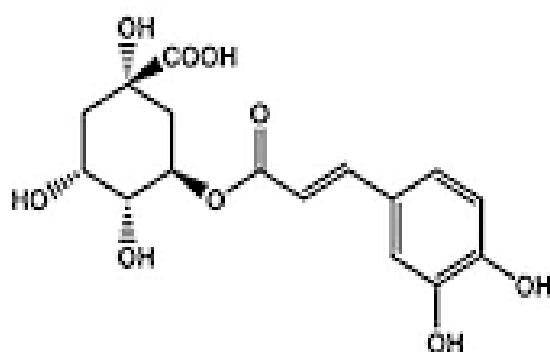
Fenolne kiseline količinski su najzastupljenija skupina polifenolnih spojeva u ljudskoj prehrani. Nalaze se u biljnim namirnicama poput orašastih plodova, voća ili povrća. Građene su od benzenskog prstena s karboksilnom skupinom (Lafay i sur., 2008). Prisutne su u vezanom obliku kao glikozidi ili esteri. Na temelju osnovne kemijske strukture dijele se u dvije kategorije: derivati benzojeve (hidroksibenzojeve kiseline) i cimetine kiseline (hidroksicimetine kiseline). Glavni predstavnici derivata hidroksibenzojeve kiseline su galna, protokatehinska, vanilinska, siringinska i elaginska kiselina, a hidroksicimetine kiseline su kafeinska, kumarinska, ferulična i sinapična kiselina (Robbins i sur., 2003).

### 2.3. POLIFENOLNI SPOJEVI ARONIJE

Glavni predstavnici fenolnih kiselina koje su prirodno prisutne u bobicama aronije su klorogenska i neoklorogenska kiselina (**Slika 5**). Iz podskupine flavonola izdvajaju se kvercetin-3-galaktosid, kvercetin-3-glukozid i kvercetin-3-rutinosid (**Slika 6**), a cijanidin-3-galaktosid, cijanidin-3-arabinozid, cijanidin-3-ksilozid i cijanidin-3-glukozid (**Slika 7**) dio su podskupine antocijana (Oszmiański i Wojdyło, 2005).



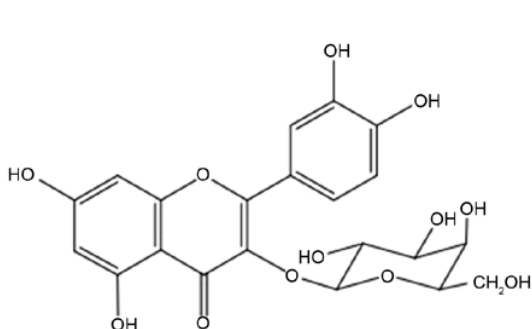
Klorogenska kiselina



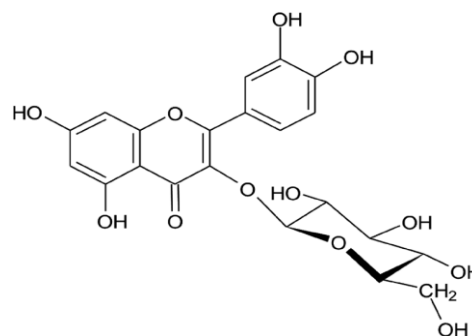
Neoklorogenska kiselina

**Slika 5** Kemijska struktura fenolnih kiselina aronije

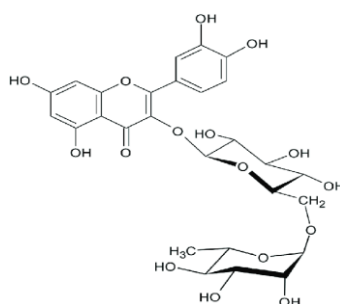
(Liu i sur., 2017)



Kvercetin-3-galaktozid

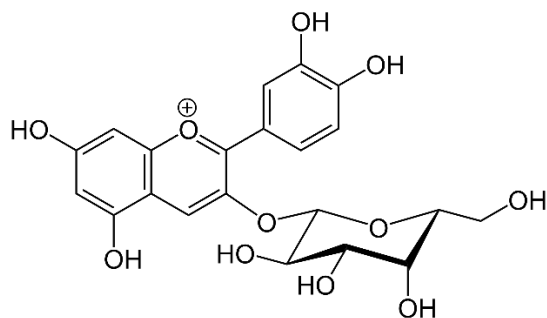


Kvercetin-3-glukozid

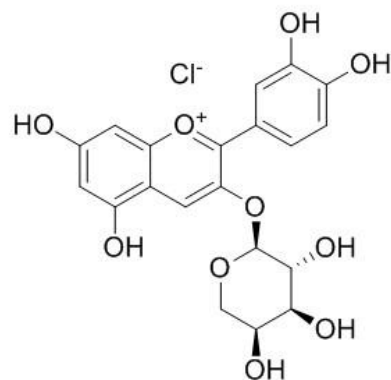


Kvercetin-3-rutinozid

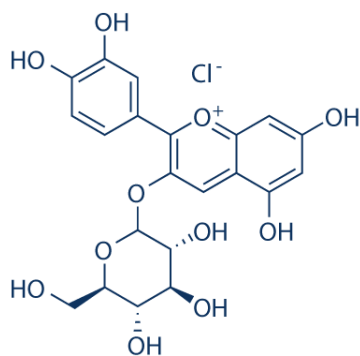
**Slika 6** Kemijske strukture derivata kvercetina pronađenih u aroniji



Cijanidin-3-galaktozid



Cijanidin-3-arabinozid



Cijanidin-3-glukozid

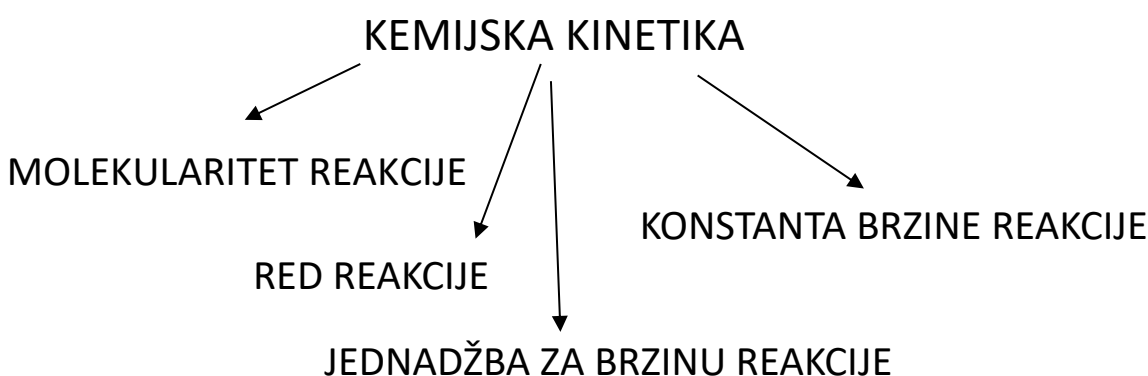
**Slika 7** Kemijska struktura antocijanina pronađenih u aroniji

## 2.4. POTENCIJALNO POZITIVNO DJELOVANJE POLIFENOLA ARONIJE

Aronija je izuzetno bogata polifenolnim spojevima, a većim unosom prehranom ima mogućnost smanjiti rizik od pojave kroničnih bolesti. Provedena su brojna istraživanja o pozitivnom djelovanju polifenola pri čemu se ispostavilo da zaštitno djelovanje ovisi o biodostupnosti polifenolnih spojeva koja je još uvijek predmet opsežnih istraživanja (Shivashankara i Acharya, 2010). Svojim antioksidativnim djelovanjem štiti stanice od mogućih oštećenja izazvanih slobodnim radikalima. Velike količine slobodnih radikala mogu dovesti do oksidativnog stresa, koji dovodi do različitih bolesti srca i raka (Kulling i sur., 2008). Ranija istraživanja dovela su do spoznaje da antocijanini prisutni u bobicama aronije zaustavljaju rast stanica raka debelog crijeva (Malik i sur., 2009).

## 2.5. KEMIJSKA KINETIKA

Znanstvena disciplina koja istražuje brzinu kemijskih reakcija i promjene stanja u ovisnosti o vremenu naziva se kemijska kinetika. Brzina reakcije uvjetuje sposobnost odvijanja kemijske reakcije. U istraživanju kemijske kinetike provode se eksperimenti u kojima se mjeri nestajanje reaktanta ili nastajanje produkta u vremenu. Na temelju eksperimentalnih podataka moguće je odrediti parametre karakteristične u kemijskoj kinetici kao što su: jednadžba za brzinu reakcije, konstanta brzine reakcije, red reakcije i molekularitet reakcije (Atkins, 2001) (**Slika 8**). S obzirom na red reakcije razlikuju se reakcije prvog i drugog reda (Atkins, 2001; Filipović i Lipanović, 1995).



**Slika 8** Parametri koji se određuju u kemijskoj kinetici

### 2.5.1. Brzina reakcije, jednadžba za brzinu reakcije, red reakcije

Brzina kemijske reakcije stanje je u kojem dolazi do promjene koncentracije reaktanata ili produkata s vremenom (Henderson i Rettener, 2003). Ona ovisi o:

1. koncentraciji reaktanata
2. temperaturi
3. prisutnosti katalizatora i sl.

Prepoznaje se iz nagiba krivulje u dijagramu ovisnosti koncentracije reaktanta ili produkta u jedinici vremena. Veću brzinu karakterizira strmija krivulja (Atkins, 2001).

Jednadžba za brzinu reakcije dana je općenitim izrazom  $v = k * [A]^a * [B]^b$  pri čemu je  $v$  brzina reakcije,  $k$  konstanta brzine reakcije, dok su  $[A]$  i  $[B]$  koncentracije reaktanata A i B.

Red reakcije određuje se kao zbroj eksponenata na koje su podignute koncentracije u jednadžbi za brzinu reakcije i obično ne mora biti cijeli broj. Brzina reakcije u reakcijama prvog

reda ovisi o koncentraciji reaktanta, odnosno proporcionalna je koncentraciji tvari. S druge strane, u reakcijama drugog reda ovisi o koncentraciji dvaju reaktanata (Herak i sur., 1992; Atkins, 2001). Jednadžba za brzinu reakcije prvog reda može se pisati kao:

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

a drugog reda kao:

$$c_t = \frac{c_0}{1+c_0kt} \quad (2)$$

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

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

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

$t$  = vrijeme (min)

Vrijeme polureakcije ili vrijeme poluživota ( $t_{1/2}$ ) je vrijeme u kojem se koncentracija reaktanta smanji za polovicu svoje početne vrijednosti. Vrijeme poluživota za reakciju prvog reda može se izračunati po jednadžbi:

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

A drugog reda po jednadžbi:

$$t_{1/2} = \frac{1}{kc_0} \quad (4)$$

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

## 2.5.2. Modificirane jednadžbe prvog i drugog reda

U ranijem istraživanju Jakobek i sur. (2023) modificirali su jednadžbe prvog i drugog reda te ih prilagodili za otpuštanje polifenola u probavnom sustavu.

Modificirana jednadžba prvog reda:

$$c_t = (c_0 - c_\infty)e^{-kt} + c_\infty \quad (5)$$

Modificirana jednadžba drugog reda:

$$c_t = \frac{c_0 - c_\infty}{1 + |c_0 - c_\infty|kt} + c_\infty \quad (6)$$

Iz ove dvije jednadžbe može se izvesti vrijeme poluživota reakcije prvog i drugog reda. Vrijeme poluživota reakcije prvog reda je:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \quad (7)$$

Vrijeme poluživota reakcije drugog reda je:



$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{k|c_0 - c_{\infty}|} \quad (8)$$

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

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

$c_{\infty}$  = koncentracija reaktanta na kraju reakcije ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

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

$t$  = vrijeme (min)

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

Ove modificirane jednadžbe upotrijebljene su u ovom radu za analiziranje podataka otpuštanja polifenola aronije u simuliranom probavnom procesu.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK RADA

U ovom diplomskom radu zadatak je bio ispitati kinetiku otpuštanja polifenolnih spojeva iz aronije tijekom probave u želudcu te tankom crijevu. U tu svrhu u radu je bilo potrebno:

- ekstrahirati polifenole iz aronije kemijskom i enzimima potpomognutom ekstrakcijom
- primijeniti RP-HPLC metodu za identifikaciju i kvantifikaciju polifenola aronije u ekstraktima kako bi se odredili polifenoli prije simulirane probave
- provesti simuliranu probavu aronije 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)
- uzorke nakon simulirane probave analizirati RP-HPLC metodom da bi se identificirali i kvantificirali polifenolni spojevi tijekom probave u želudcu i tankom crijevu
- analizirati količine polifenolnih skupina nelinearnom regresijom modificiranih jednadžbi brzina reakcija prvog i drugog reda
- iz modela odrediti konstantu brzine reakcije, mogući red reakcije, vrijeme poluživota za otpuštanje polifenola aronije tijekom probave

### 3.2. MATERIJAL I METODE

#### 3.2.1. Kemikalije

U ovome radu kemikalije su kupljene od nekoliko tvrtki: Gram mol, Zagreb, Hrvatska (KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ); Kemika, Zagreb, Hrvatska ( $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ); Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska (NaCl); Fluka, Buchs, Švicarska (*o*-phosphoric acid 85% HPLC čistoće) J.T. Baker, Gliwice, Poljska (methanol), Fisher Scientific, Loughborough, UK (acetonitril) i Avantor, Arnhem, Nizozemska (HCl).  $\alpha$ -amilaza (13 U/mg), pepsin (632 U /mg), pancreatin (8 USP), kvercetin-3-rutinozid hidrat, kvercetin-3-glukozid, klorogenska kiselina i žučne soli, kupljeni su u tvrtki Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD. Nadalje, cijanidin-3-galaktozid klorid, cijanidin-3-glukozid klorid, i kvercetin-3-galaktozid nabavljeni su od Extrasynthese, Genay, Francuska.

### 3.2.2. Priprema simuliranih probavnih tekućina

Simulirana probavna tekućina za usta (engl. Simulated salivary fluid, SSF), simulirana probavna tekućina želuca (engl. Simulated gastric fluid, SGF) i simulirana probavna tekućina tankog crijeva (engl. Simulated intestinal fluid, SIF) pripremljene su u odmjerne tikvice od 100 ml tako da ukupna koncentracija elektrolita bude slijedeća:

SSF: 18,87 mM KCl, 4,62 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,056 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0,06 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Minekus i sur., 2014).

SGF: 8,62 mM KCl, 1,12 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 31,25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,62 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 59,00 mM NaCl, pH podešen na 3 s 1 M HCl (Minekus i sur., 2014).

SIF: 8,5 mM KCl, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 106,25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,41 mM MgCl<sub>2</sub>, 48,00 mM NaCl. pH je podešen na 7 s 1 M HCl (Minekus i sur., 2014).

Otopine enzima pripremljene su u koncentracijama  $\alpha$ -amilaza (1.00 g l<sup>-1</sup>), pepsin (31.66 g l<sup>-1</sup>), pankreatin (8.00 g l<sup>-1</sup>), u SSF, SGF i SIF, redosljedom. Žučne soli pripremljene su u koncentraciji 25.00 g l<sup>-1</sup> u SIF (Minekus i sur., 2014).

### 3.2.3. Priprema uzoraka aronije

Bobice aronije homogenizirane su štapnim mikserom, a potom smrznute u zamrzivaču dan prije upotrebe.

### 3.2.4. Kemijska ekstrakcija polifenola aronije

0,15 g homogenizirane aronije izvagano je u plastičnu kivetu za ekstrakciju u koju je dodano 1,5 ml 80 % metanola. Kiveta je postavljena u ultrazvučnu kupelj (Bandelin Sonorex RK 100, Berlin, Njemačka) u vremenskom periodu od 15 minuta kako bi se polifenoli ekstrahirali uz pomoć ultrazvuka. Nakon toga, kiveta je centrifugirana (Eppendorf Minispin, Hamburg, Njemačka) 10 minuta (10 000 rpm). Pipetiranjem je odvojen ekstrakt od ostatka. Ponovljen je postupak ekstrakcije ostatka u 0,5 ml 80 % metanola. Dva ekstrakta su spojena tako da je konačni volumen ekstrakta bio 2 ml. Ekstrakt je filtriran (PTFE filter (0,2  $\mu$ m)), a potom analiziran na HPLC uređaju.

### 3.2.5. Enzimaska ekstrakcija polifenola aronije

Nakon kemijske ekstrakcije u ostatak su otpipetirani voda, žučne soli, pankreatin,

pepsin u volumenima od 1,05 ml, 60  $\mu$ L, 30  $\mu$ L i 15  $\mu$ L spomenutim slijedom. Uzorak je inkubiran (IN 30 Memmert, Schwabach, Njemačka) 2 sata na 37 °C. Nakon toga, uzorak je ohlađen te centrifugiran na 10 000 rpm 5 minuta. Ekstrakt je odvojen od ostatka i analiziran na HPLC uređaju.

### **3.2.6. Simulirana probava**

#### Faza u želudcu

Simuliranje probave u želudcu započeto je simuliranjem probave u ustima (2 min) te je nastavljeno fazom probave u želudcu u vremenskim intervalima (5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 min).

0,15 g aronije izvagano je u 7 plastičnih kiveta. U aroniju je dodano 175  $\mu$ L SSF, 49  $\mu$ L vode, 1,3  $\mu$ L 0,3 M kalcijevog klorida te 25  $\mu$ L  $\alpha$ -amilaze. Reakcijske smjese su homogenizirane na vortexu (PV-1, Grant Instruments, Cambridgeshire, UK), a potom stavljene u termoblok (Bio TDB-100, Biosan, Riga, Latvia) na 37°C u trajanju od 2 min. Nakon 2 min u reakcijsku smjesu dodano je 375  $\mu$ L SGF, 15  $\mu$ L vode, 0,3  $\mu$ L 0,3 M kalcijevog klorida, 10  $\mu$ L 1 M klorovodične kiseline i 100  $\mu$ L pepsina da bi se nastavila probava u želudcu. Inkubacija je nastavljena u termobloku u različitim vremenskim periodima za svaku kivetu (5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 min). Nakon inkubacije, reakcijske smjese su ohlađene, centrifugirane 5 minuta na 10 000 rpm, ponovno ohlađene, profiltrirane kroz 0,2 PTFE filter i analizirane na HPLC uređaju.

#### Faza u tankom crijevu

Faza probave u tankom crijevu započeta je fazom probave u ustima (2 min) i želudcu (2 h) te nastavljena fazom u tankom crijevu u vremenskim intervalima (5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 min).

Nakon vaganja 0,15 g aronije u 7 plastičnih kiveta, provedena je simulirana probava u ustima i želudcu prema prije opisanom postupku. Dodatkom 550  $\mu$ L SIF, 180,5  $\mu$ L vode, 2  $\mu$ L 0,3 M kalcijevog klorida, 7,5  $\mu$ L NaOH (1 M), 10  $\mu$ L žučnih soli te 250  $\mu$ L pankreatina nastavljena je probava u tankom crijevu, za svaku kivetu u različitom periodu (5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 min). Kivete su inkubirane u termobloku. Nakon inkubacije, reakcijske smjese su centrifugirane 5 minuta na 10 000 rpm, filtrirane kroz 0,2 mm PTFE filter i analizirane na HPLC uređaju.

### **3.2.7. Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija**

Na uređaju 1260 Infinity II (Agilent Technology, Santa Clara, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države) sastavljenom od kvarterne pumpe, PDA detektora (engl. photodiodearray detector, PDA) i vialsamplera analizirani su polifenolni spojevi aronije. Na koloni Poroshell 120 EC C-18 (unutrašnjeg promjera 4,6 x 100 mm, promjer čestica 2,7  $\mu\text{m}$  koja je zaštićena pretkolumnom (Poroshell 120 EC-C18, 4,6 mm) (Agilent technology, Santa Clara, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države) provedeno je razdvajanje polifenola. Za analizu polifenola korištene su mobilne faze navedene u nastavku (0,5 % fosforna kiselina (A) te 100 %-ni acetonitril (B). Gradijentnom eluacijom razdvojeni su polifenoli s udjelima od 5 % B 0 min, 11 % B 5 min, 15 % B 7,5 min, 17,5 % B 17,5 min, 20 % B 20 min, 30 % B 30 min, 70 % B 32 min, 70 % B 34 min, 5 % B 36 min, 5 % B 38 min. gdje je protok iznosio 0,8 ml min<sup>-1</sup>, a volumen injektiranja 10  $\mu\text{l}$ .

### 3.2.8. Kinetika simulirane probave

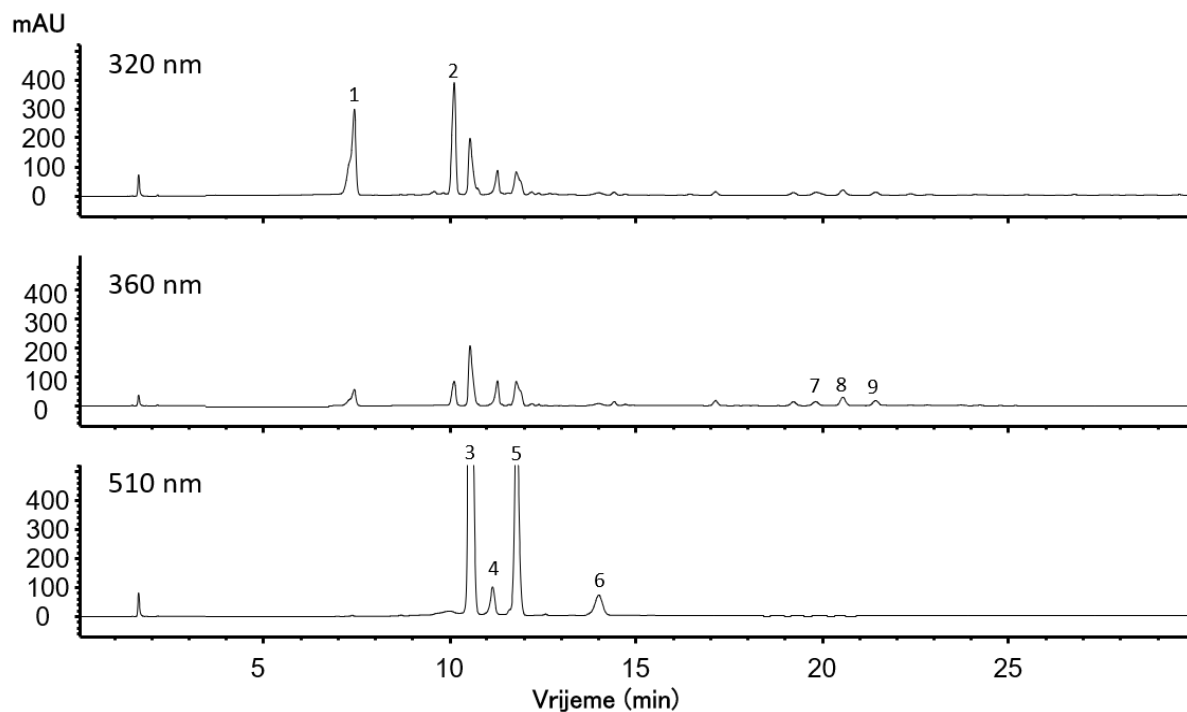
Korištenjem alata solver u MS Excelu (Redmond, Washington, Sjedinjene Američke Države) oblikovani su podaci o količini otpuštenih polifenolnih spojeva (mg kg<sup>-1</sup>) tijekom probave u različitim vremenskim intervalima (5, 10, 15, 20, 30, 60 i 120 minuta) ( $c_t$ ) u ovisnosti o vremenu ( $t$ ). Za analizu su upotrijebljene modificirane jednadžbe prvog i drugog reda (jednadžbe 5 i 6). Ovim postupkom određeni su parametri  $k$  (konstanta brzine reakcije) i  $c_\infty$  (koncentracija otpuštenih polifenola na kraju reakcije). Vrijeme polureakcije  $t_{1/2}$  za prvi i drugi red izračunato je prema jednadžbama 7 i 8.

### 3.2.9. Statistička obrada podataka

Pripremljena su dva ekstrakta polifenola aronije kemijskom ekstrakcijom i dva ekstrakta enzimskom ekstrakcijom. Ovi ekstrakti analizirani su dva puta na HPLC uređaju ( $n=4$ ). Količine pojedinačnih polifenola, polifenolnih skupina i ukupnih polifenola prije probave dobivene su zbrajanjem količine dobivene kemijskom i enzimskom ekstrakcijom, a podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardno odstupanje. Simulirana probava u želudcu i tankom crijevu provedena je jednom, a uzorci su analizirani dva puta ( $n=2$ ). Količine pojedinačnih polifenola, polifenolnih skupina i ukupnih polifenola tijekom probave prikazane su kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardno odstupanje.

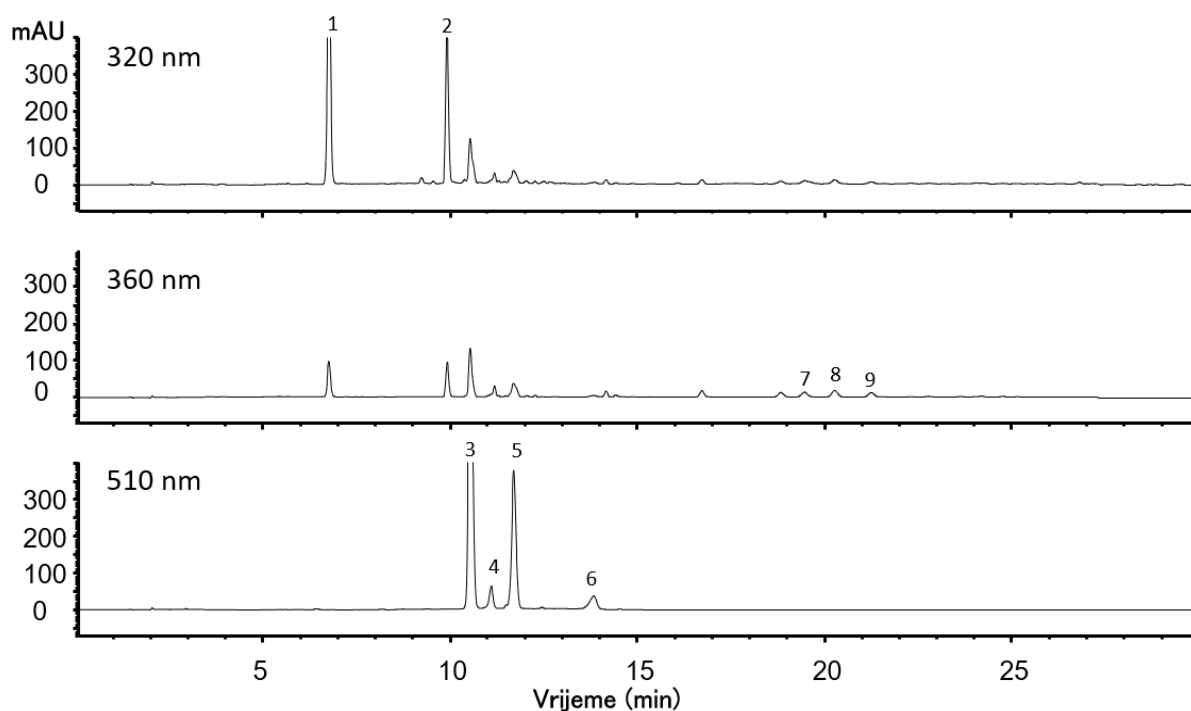
## **4. REZULTATI**

## 4.1. Polifenolni spojevi aronije

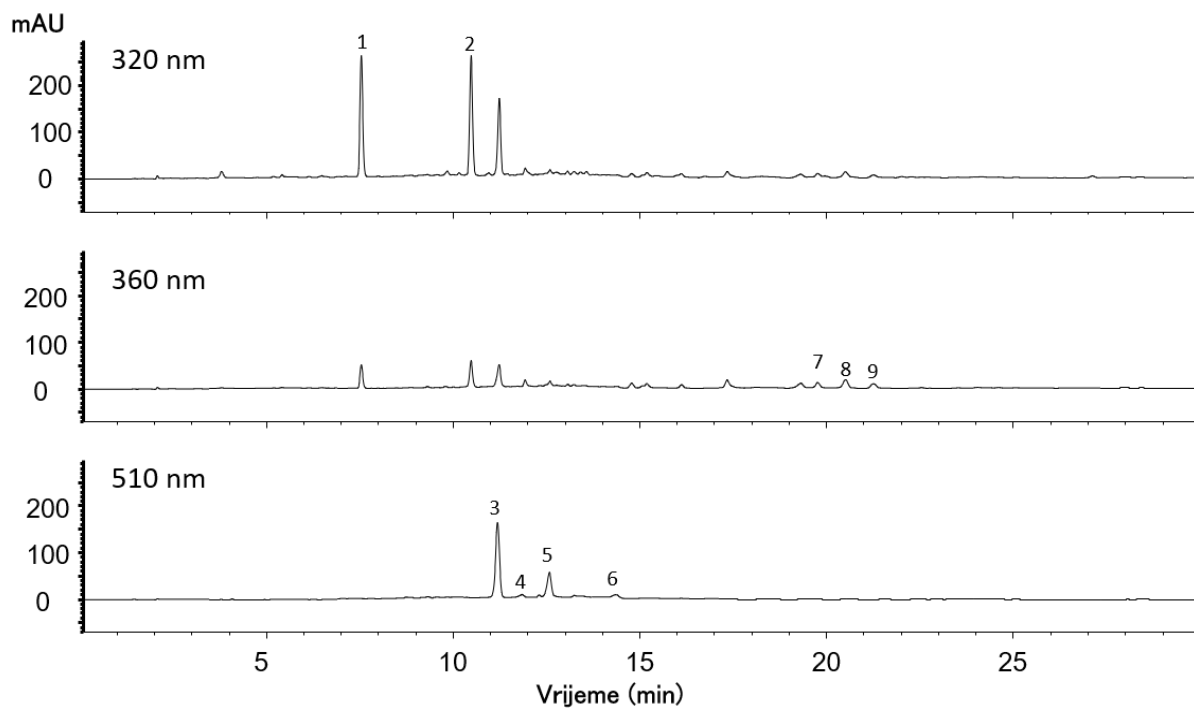


**Slika 9** Kromatogram ekstrakta aronije prije probave sniman na 320, 360 i 510 nm s identificiranim spojevima 1 – neoklorogenska kiselina\*, 2 – klorogenska kiselina, 3 – cijanidin-3-galaktozid, 4 – cijanidin-3-glukozid, 5 – cijanidin-3-arabinozid\*, 6 – cijanidin-3-ksilozid\*, 7 – kvercetin-3-rutinozid, 8 – kvercetin-3-galaktozid, 9 – kvercetin-3-glukozid (\* djelomično identificirano)

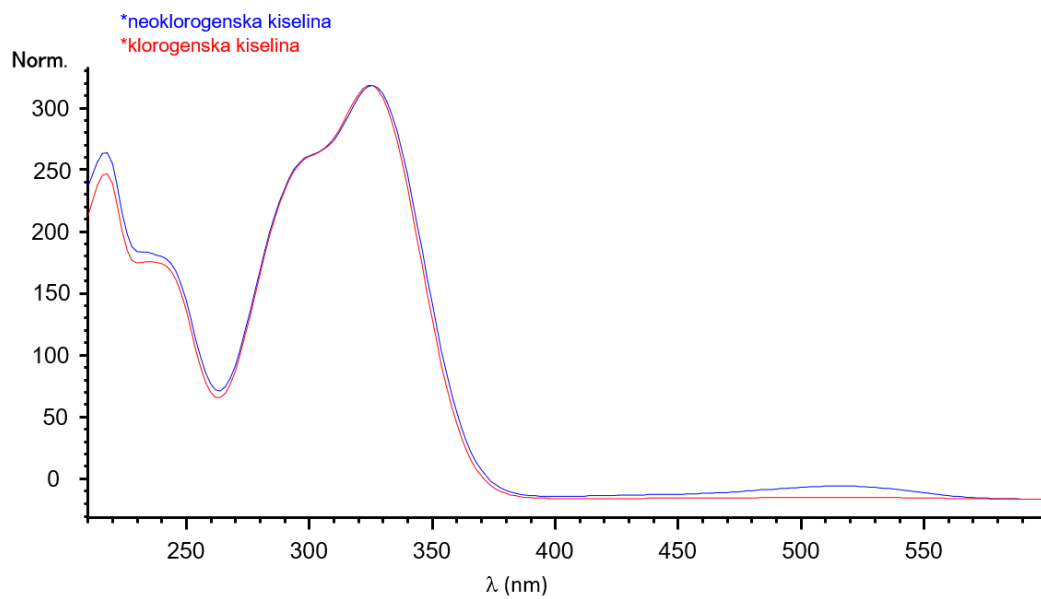




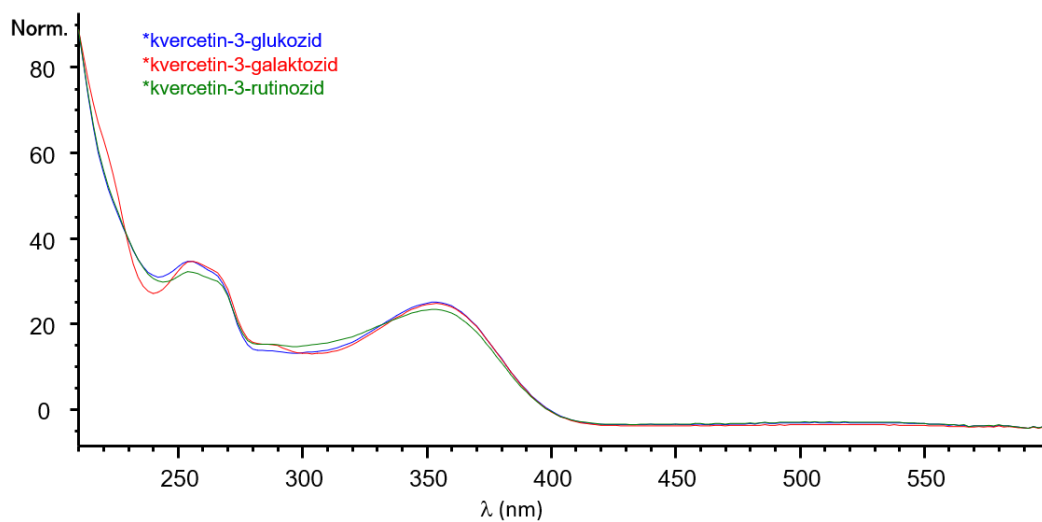
**slika 10** Kromatogram aronije nakon probave u želudcu sniman na 320, 360 i 510 nm s identificiranim spojevima 1 – neoklorogenska kiselina\*, 2 – klorogenska kiselina, 3 – cijanidin-3-galaktozid, 4 – cijanidin-3-glukozid, 5 – cijanidin-3-arabinozid\*, 6 – cijanidin-3-ksilozid\*, 7 – kvercetin-3-rutinozid, 8 – kvercetin-3-galaktozid, 9 – kvercetin-3-glukozid (\* djelomično identificirano)



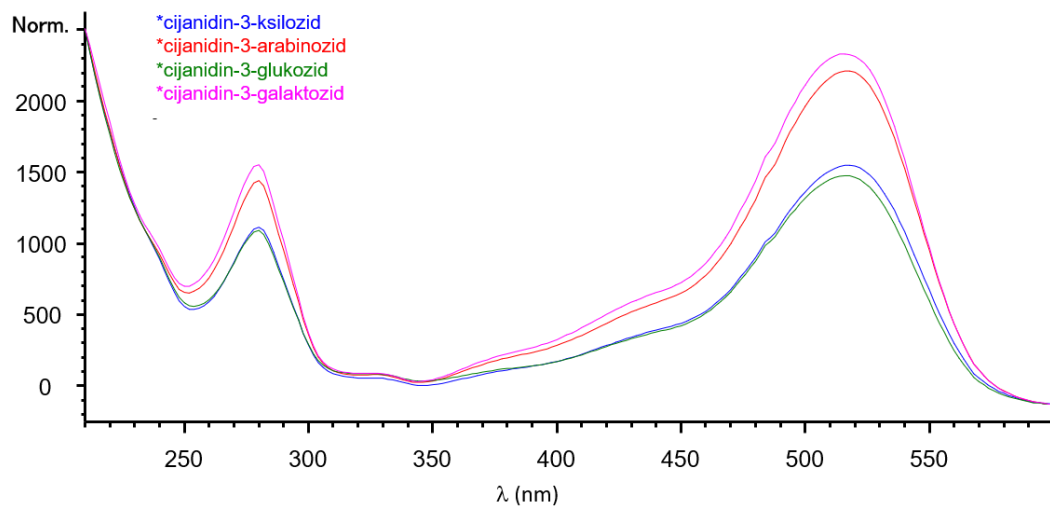
**Slika 11** Kromatogram aronije nakon probave u tankom crijevu sniman na 320, 360 i 510 nm s identificiranim spojevima 1 – neoklorogenska kiselina\*, 2 – klorogenska kiselina, 3 – cijanidin-3-galaktozid, 4 – cijanidin-3-glukozid, 5 – cijanidin-3-arabinozid\*, 6 – cijanidin-3-ksilozid\*, 7 – kvercetin-3-rutinozid, 8 – kvercetin-3-galaktozid, 9 – kvercetin-3-glukozid (\* djelomično identificirano)



Slika 12 UV/Vis spektri fenolnih kiselina aronije



Slika 13 UV/Vis spektri flavonola aronije



Slika 14 UV/Vis spektri antocijanina aronije

## 4.2. Polifenolni spojevi u simuliranom probavnom procesu

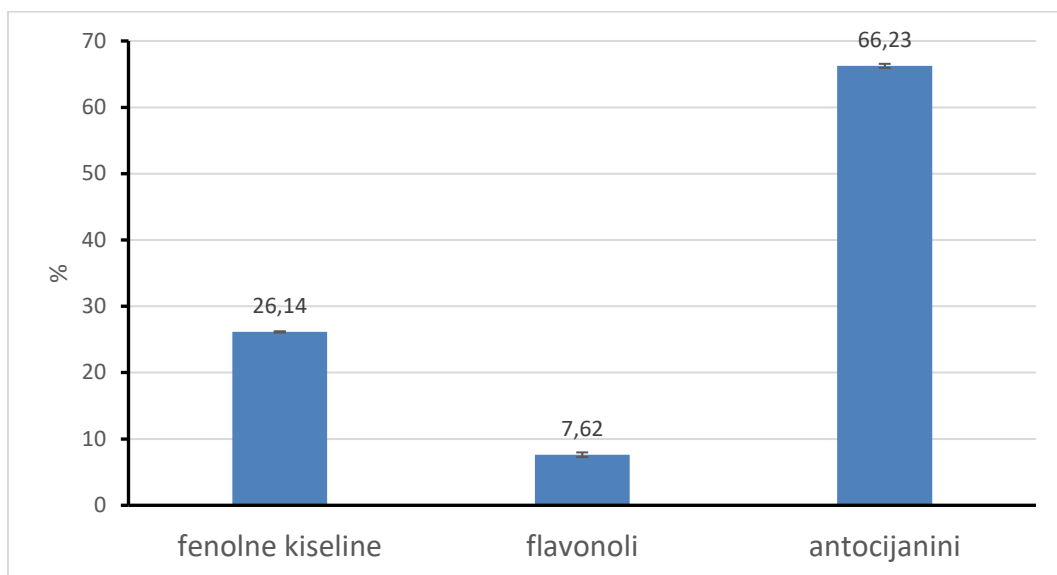
**Tablica 1.** Količina polifenolnih spojeva u aroniji prije probave i tijekom probave u želudcu i stomaku (mg kg<sup>-1</sup> svježe mase)

Polifenoli	Prije probave	Želudac mg kg <sup>-1</sup>							Tanko crijevo mg kg <sup>-1</sup>						
		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
<b>Fenolne kiseline</b>															
neoklorogenska kiselina	494,7±65,0	262,4±0,3	213,8±1,6	252,2±1,0	294,6±0,5	255,2±2,3	247,4±0,6	322,5±0,5	215,7±4,5	235,0±4,2	235,2±0,3	197,9±0,6	174,4±1,3	203,4±4,9	213,4±2,2
klorogenska kiselina	456,3±51,4	201,9±0,9	169,6±3,9	196,0±0,6	233,6±1,2	202,5±0,3	193,0±1,3	248,5±0,0	210,3±1,7	228,1±2,4	222,7±2,4	190,3±4,0	165,7±0,6	194,3±0,5	209,3±3,5
Ukupno	951,1±116,4	464,3±1,1	383,4±5,4	448,2±1,7	528,1±1,6	457,7±2,5	440,5±1,9	571,0±0,5	426,0±6,2	463,1±6,6	457,9±2,7	388,2±4,6	340,0±2,0	397,7±5,4	422,6±5,7
<b>Flavonoli</b>															
kvercetin-3-rutinozid	157,6±11,2	47,3±0,3	38,2±0,3	45,5±0,1	52,5±0,3	51,0±6,1	42,4±0,5	54,5±0,4	74,9±2,0	75,0±7,6	69,4±3,7	62,9±0,9	58,7±0,1	64,2±0,6	70,7±4,6
kvercetin-3-galaktozid	38,8±3,1	12,0±0,0	10,0±0,0	11,8±0,0	13,5±0,0	12,4±0,2	11,0±0,0	14,1±0,0	17,7±0,0	18,7±0,1	17,9±0,3	16,8±0,1	15,6±0,5	17,2±0,1	18,4±1,1
kvercetin-3-glukozid	79,7±6,6	22,9±0,4	19,5±0,5	22,4±0,2	26,3±1,1	22,9±0,5	20,6±0,2	26,6±0,1	35,8±1,0	38,3±0,3	35,5±0,8	34,3±0,0	33,2±0,2	34,6±0,0	37,7±0,1
Ukupno	276,2±20,9	82,2±0,8	67,7±0,8	79,6±0,3	92,3±1,4	86,3±6,8	74,0±0,7	95,2±0,6	128,4±3,1	131,9±8,0	122,8±4,8	113,9±1,1	107,5±0,7	116,0±0,7	126,9±5,7
<b>Antocijanini</b>															
cijanidin-3-galaktozid	924,1±115,0	300,3±0,1	261,1±0,2	295,6±0,6	344,1±0,2	324,9±0,8	286,4±0,4	368,6±0,9	84,7±5,7	106,9±4,1	123,6±4,2	110,7±7,2	80,9±2,2	69,0±5,2	72,7±3,0
cijanidin-3-glukozid	160,2±15,6	50,3±0,7	42,4±0,6	51,1±1,1	56,5±0,4	55,3±3,4	44,9±3,5	62,1±1,7	26,2±3,3	31,5±2,5	30,9±2,0	29,6±2,1	27,3±3,7	22,2±0,5	25,2±4,1
cijanidin-3-arabinozid*	1119,4±149,7	321,7±2,8	287,0±3,0	316,5±1,2	371,3±5,0	353,0±4,8	314,8±1,7	398,7±0,7	93,5±7,0	117,1±2,9	130,7±6,2	124,7±2,0	90,0±2,8	75,4±8,0	82,6±0,5
cijanidin-3-ksilozid*	206,8±22,7	58,7±0,2	53,1±1,3	58,9±0,7	68,8±1,4	65,7±7,2	62,7±7,2	73,7±1,0	26,0±3,5	32,5±6,3	35,3±3,1	31,5±1,1	26,2±0,2	24,5±0,8	27,1±1,6
Ukupno	2410,4±302,9	730,9±3,8	643,6±5,1	722,1±3,7	840,7±6,9	798,8±16,2	708,7±12,8	903,1±4,2	230,3±19,5	288,1±15,8	320,6±15,6	296,4±12,4	224,4±8,9	191,2±14,4	207,7±9,3
UKUPNO	3637,7±440,3	1277,4±5,7	1094,8±11,4	1249,9±5,6	1461,1±9,9	1342,9±25,6	1223,1±15,5	1569,3±5,3	784,6±28,8	883,1±30,4	901,2±23,1	798,6±18,1	672,0±11,7	704,8±20,6	757,3±20,7

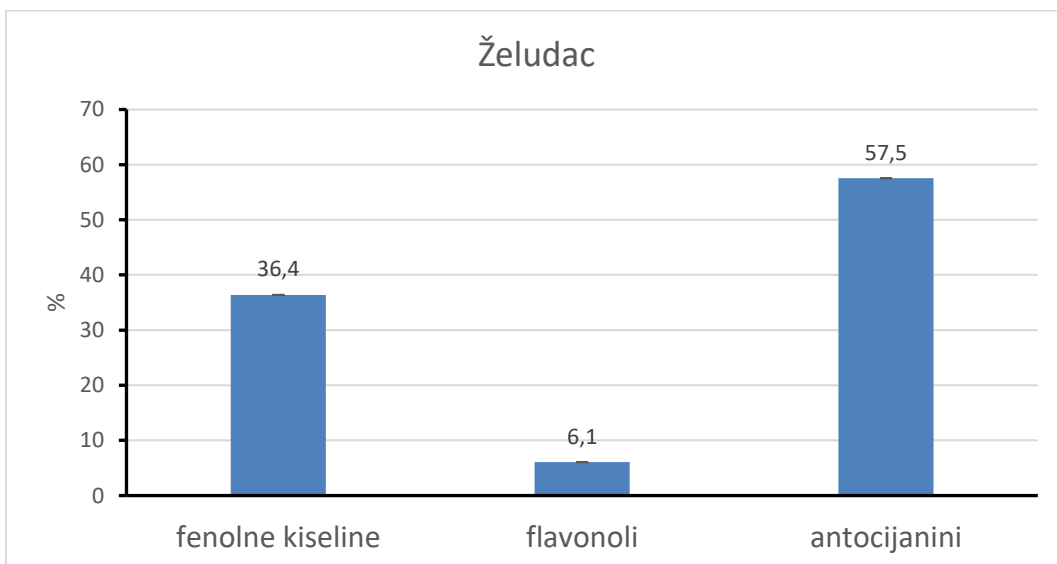
\* djelomično identificirani spojevi,

-uzorak za kemijsku i enzimsku ekstrakciju (prije probave) pripremljen u dva paralelna uzorka, svaki analiziran na RP-HPLC uređaju dva puta (n=4),

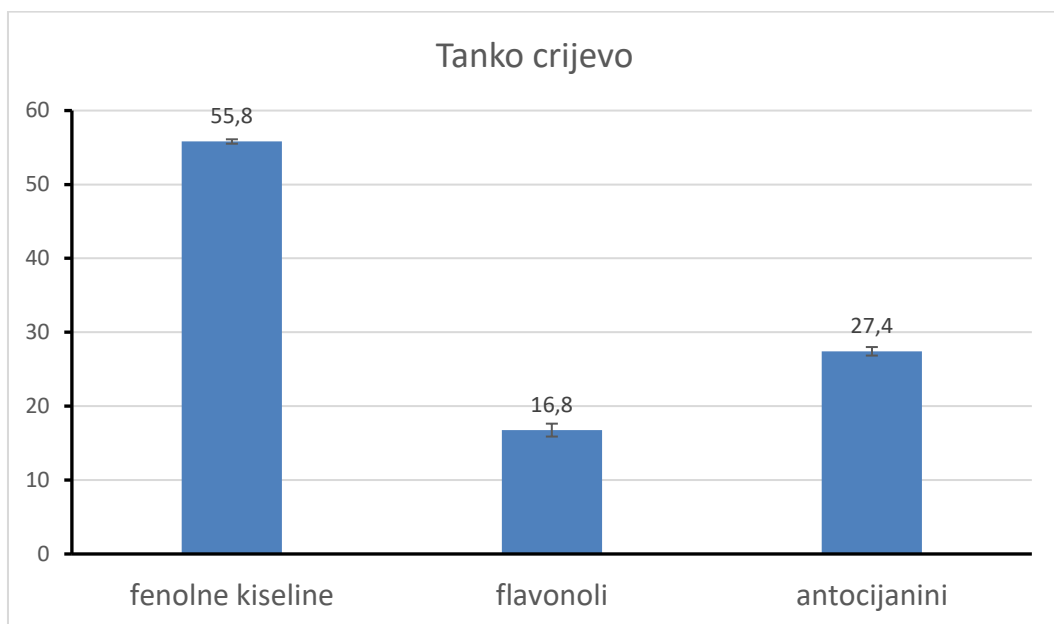
-uzorci za simuliranu probavu pripremljeni jednom, analizirani dva puta na RP-HPLC uređaju (n=2)



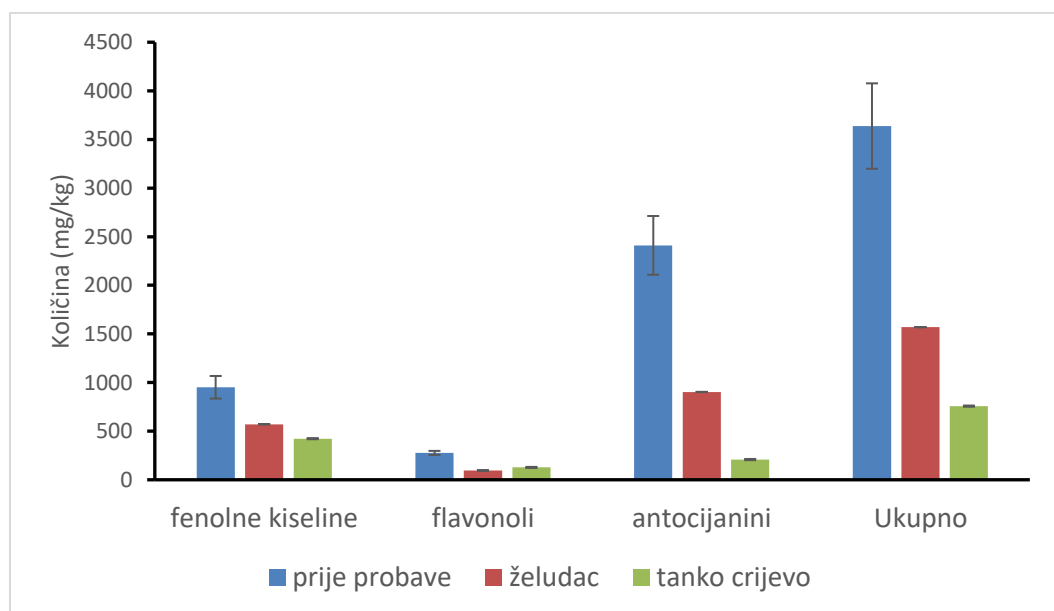
**Slika 15** Postotna raspodjela polifenolnih skupina aronije prije probave



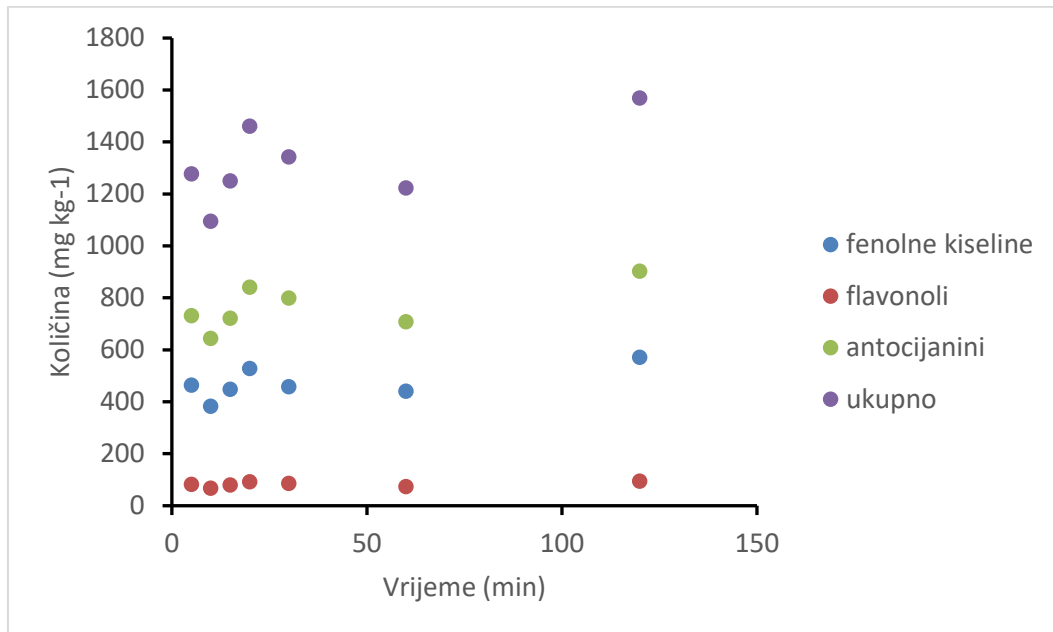
**Slika 16** Postotna raspodjela polifenolnih skupina aronije nakon probave u želudcu (120 min)



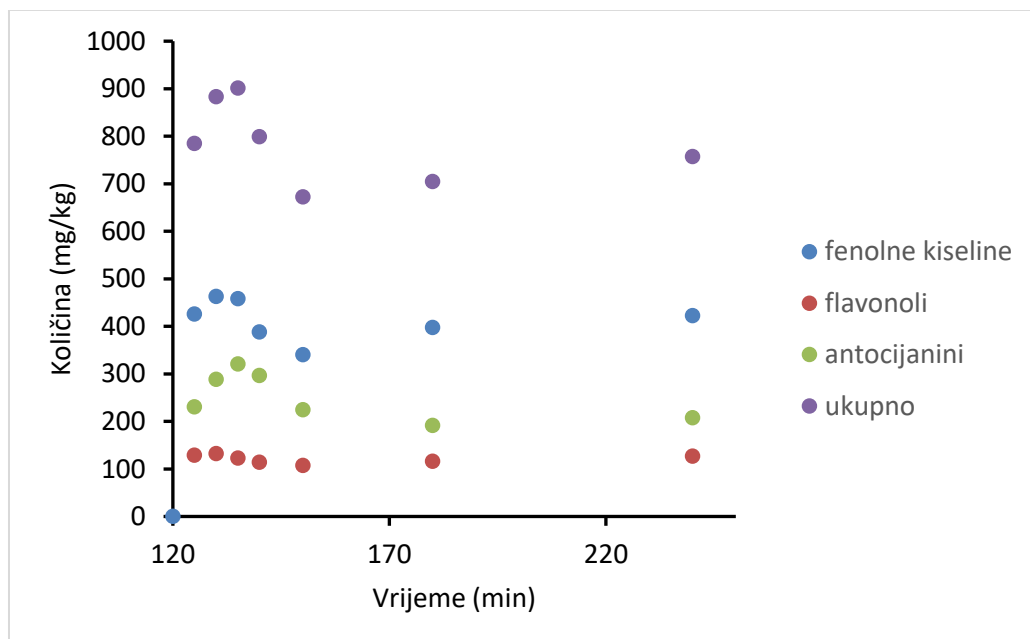
**Slika 17** Postotna raspodjela polifenolnih skupina aronije nakon probave u tankom crijevu (240 min ukupne probave, 120 min tankog crijeva)



**Slika 18** Količina pojedinih polifenolnih skupina i ukupnih polifenolnih spojeva u aroniji prije simulirane probave i nakon završene probave u želudcu i tankom crijevu



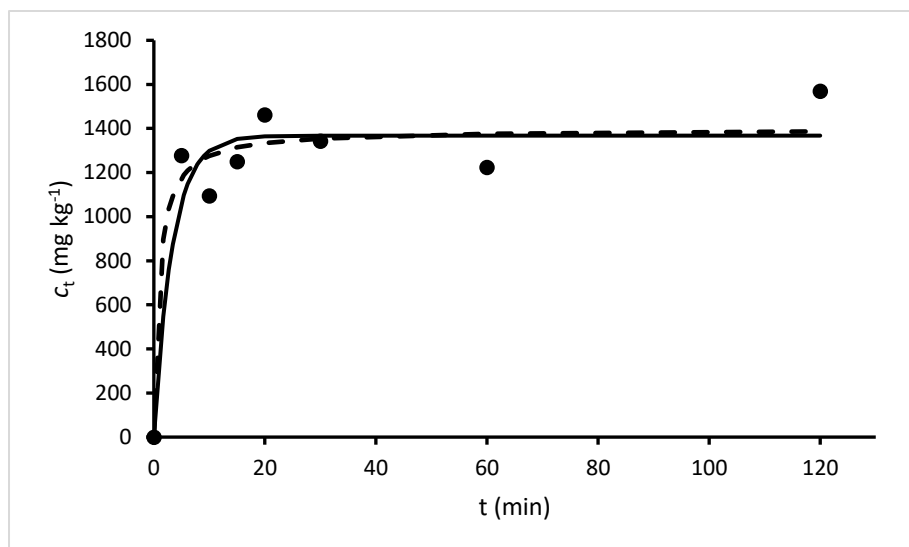
**Slika 19** Količina pojedinih polifenolnih skupina i ukupnih polifenolnih spojeva u aroniji prije simulirane probave i tijekom 120 min probave u želudcu



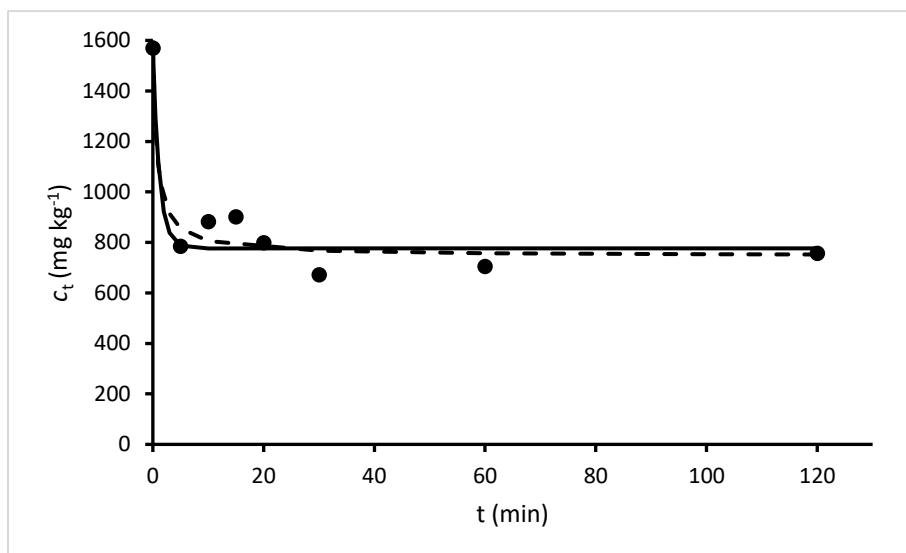
**Slika 20** Količina pojedinih polifenolnih skupina i ukupnih polifenolnih spojeva u aroniji tijekom 120 min probave u tankom crijevu (120 do 240 min ukupne probave)



### 4.3 Kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva tijekom probave



**Slika 21** Primjer dijagrama s prikazom ovisnosti  $c_t$  (ukupni polifenoli u mg kg<sup>-1</sup> 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)

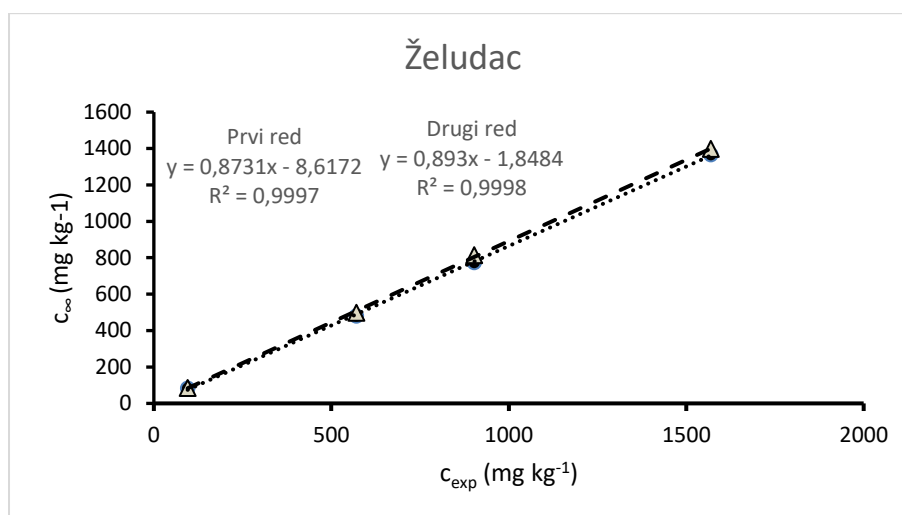


**Slika 22** Primjer dijagrama s prikazom ovisnosti  $c_t$  (ukupni polifenoli u mg kg<sup>-1</sup> voća) o  $t$  (min) za vrijeme 120 min probave u tankom crijevu, i modeliranje podataka modificiranim jednadžbama prvog i drugog reda (puna crta - prvi red, isprekidana crta drugi red)

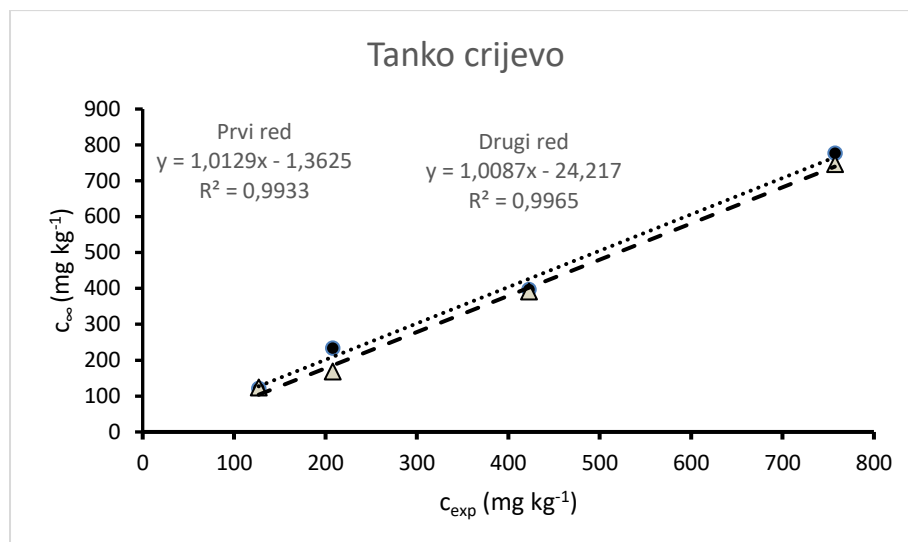
**Tablica 2.** Parametri jednadžbi prvog i drugog reda

	Prvi red				Drugi red				$C_{exp}$ (mg kg <sup>-1</sup> )
	$k$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)	$c_{\infty}$ (mg kg <sup>-1</sup> )	SE	$k$ (kg mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)	$c_{\infty}$ (mg kg <sup>-1</sup> )	SE	
<b>Želudac</b>									
fenolne kiseline	0,40	1,73	480,5	62,9	0,0022	0,89	497,7	56,8	571,0
flavonoli	0,74	0,94	83,5	9,8	0,0185	0,63	85,9	9,3	95,2
antocijanini	0,50	1,40	774,0	86,3	0,0012	1,02	814,1	77,2	903,1
ukupno	0,30	2,31	1367,7	168,4	0,0008	0,95	1397,7	141,8	1569,3
<b>Tanko crijevo</b>									
fenolne kiseline	0,17	4,10	396,9	40,3	0,0024	2,35	391,2	39,0	422,6
flavonoli	0,50	1,39	121,3	9,2	0,0138	2,50	124,1	10,8	126,9
antocijanini	0,35	1,98	233,9	69,4	0,0006	2,22	168,6	75,4	207,7
ukupno	0,85	0,82	776,4	85,5	0,0016	0,77	746,8	78,1	757,2

SE – standardna greška (engl. standard error)



**Slika 23** Ovisnost  $c_{exp}$  (mg/kg) određenih eksperimentalno i  $c_{\infty}$  (mg/kg) 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  $c_{\infty}$  predstavlja količinu otpuštenih polifenolnih spojeva na kraju probave u želudcu predviđenu modelima)



**Slika 24** Ovisnost  $c_{exp}$  (mg/kg) određenih eksperimentalno i  $c_{\infty}$  (mg/kg) 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  $c_{\infty}$  predstavlja količinu otpuštenih polifenolnih spojeva na kraju probave u tankom crijevu predviđenu modelima)

## **5. RASPRAVA**

U ovome radu ispitana je kinetika otpuštanja polifenolnih spojeva iz aronije tijekom probave u želudcu i tankom crijevu. Za određivanje količine polifenolnih spojeva provedena je kemijska ekstrakcija aronije kao i ekstrakcija pomognuta enzimima. Za analizu polifenola korištena je RP-HPLC metoda.

Na **slikama 9, 10 i 11** prikazani su kromatogrami ekstrakta aronije prije probave i kromatogrami aronije nakon probave u želudcu i tankom crijevu. Kromatogram na **slici 9** prikazuje identificirane polifenolne spojeve praćene na 320, 360 i 510 nm prije probave. Oni pripadaju skupinama fenolnih kiselina (neoklorogenska i klorogenska kiselina), antocijana (cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-arabinozid, cijanidin-3-ksilozid) te flavonola (kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid). Nakon probave u želudcu i tankom crijevu identificirani su isti spojevi. U ranijim istraživanjima (Koponen i sur. 2007, Wu i sur. 2006) pronađeni su isti polifenolni spojevi u aroniji.

UV/Vis spektar pruža dodatni uvid u identifikaciju polifenolnih spojeva. Na **slikama 12, 13 i 14** prikazani su UV/Vis spektri pronađenih spojeva u aroniji. Fenolne kiseline pokazale su maksimum na oko 330 nm (**Slika 12**). Flavonoli su pokazali dva maksimuma u granicama od 250 do 260 i 350 do 360 nm (**Slika 13**), dok su antocijani pokazali maksimum na 280 i 520 nm (**Slika 14**). Pojedini spektri spojeva iz aronije pokazali su slaganje sa spektrima autentičnih standarda.

Nakon identifikacije polifenola, određene su njihove količine. **Tablica 1** prikazuje podatke o količini pojedinačnih polifenolnih spojeva, polifenolnih skupina i ukupnih polifenola prije probave te tijekom probave u želudcu i tankom crijevu. Ukupna količina antocijanina u aroniji prije probave iznosila je 2410,4 mg kg<sup>-1</sup>, a količinski se ističu cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-arabinozid. Flavonoli se nalaze u aroniji u količini od 276,2 mg kg<sup>-1</sup>, a količinom se ističe kvercetin-3-rutinozid. Ukupna količina fenolnih kiselina iznosila je 951,1 mg kg<sup>-1</sup> među kojima su neoklorogenska i klorogenska kiselina. Količina polifenola prije probave odgovara količini pronađenih u literaturi (Jakobek i sur., 2021). Nakon završene probave u želudcu količine svih polifenolnih spojeva bile su manje od količine prirodno prisutnih u aroniji prije probave. Nakon potpune probave u tankom crijevu količina svih polifenolnih spojeva bile su manje od količine prirodno prisutnih u aroniji prije probave. Ovo smanjenje količine slično je ranijim istraživanjima (Jakobek i sur., 2022).

**Slike 15, 16 i 17** prikazuju postotnu raspodjelu polifenolnih skupina u aroniji. Prije

probave u najvećem postotku u aroniji su bili prisutni antocijanini (66 %), a slijede ih fenolne kiseline (26 %) te flavonoli (8 %). Nakon probave u želudcu postotna raspodjela bila je slična: antocijanini 58 %, fenolne kiseline 36 %, flavonoli 6 %. No nakon probave u tankom crijevu vidljiva je promjena u postotnoj raspodjeli polifenolnih skupina. U najvećem postotku nakon probave u tankom crijevu bile su prisutne fenolne kiseline (56 %), a slijedili su ih antocijanini (27 %) te flavonoli (17 %). Ove promjene u postotnoj raspodjeli moguće su zbog različite pH vrijednosti tijekom probave u želudcu i tankom crijevu. Antocijanini u tankom crijevu prelaze u drugu strukturnu formu zbog različitih pH vrijednosti. Pri nižoj pH vrijednosti kao što je pH vrijednost tijekom simulirane probave u želudcu (pH 3) antocijanini se nalaze u formi flavilijevog kationa. Prelaskom u tanko crijevo raste pH vrijednost na pH 7 pri čemu antocijanini prelaze u drugu strukturnu formu – bezbojnu karbinol pseudobazu koja nije identificirana. Zbog toga se količina antocijanina u tankom crijevu smanjuje što utječe na manji postotni udio antocijanina nakon probave u tankom crijevu.

Da bi se jasnije vidjelo ponašanje polifenolnih skupina i ukupnih polifenola prije probave i nakon završenih faza probave u želudcu i tankom crijevu, prikazane su ukupne količine na **slici 18**. Iz slike je vidljivo da se količina fenolnih kiselina, antocijana i ukupnih polifenola smanjuje od faze u želudcu do faze u tankom crijevu, dok je količina flavonola stabilna prelaskom iz želudca u tanko crijevo. Osim toga, polifenolni spojevi su se intenzivnije oslobađali tijekom 20 min probave u želudcu (**Slika 19**) nakon čega se vidi pad količine, ali i dostizanje stanja ravnoteže. U tankom crijevu polifenoli su se oslobađali tijekom 15 minuta nakon čega se vidi njihova degradacija te stanje ravnoteže (**Slika 20**).

Količine polifenolnih skupina i ukupnih polifenola oslobođenih u želudcu i tankom crijevu kroz određeno vrijeme ( $c_t$ ) analizirane su modificiranim jednadžbama kemijske kinetike prvog i drugog reda. **Slike 21 i 22** prikazuju primjer modeliranja podataka. **Tablica 2** prikazuje određene parametre prvog i drugog reda: predviđeno vrijeme polureakcije za prvi i drugi red ( $t_{1/2}$ ), konstantu brzine reakcije ( $k$ ) te predviđenu količinu koja se može osloboditi na kraju probave u želudcu i tankom crijevu ( $c_\infty$ ). Prema reakciji prvog reda, u želudcu je vrijeme polureakcije iznosilo od 0,94 do 2,31 minute, a u tankom crijevu od 0,82 do 4,10 minute s obzirom na polifenolne skupine. S druge strane, vrijeme polureakcije prema jednadžbi drugog reda iznosilo je 0,63 do 1,02 min za probavu u želudcu te 0,7 do 2,50 min za probavu u tankom crijevu, s obzirom na polifenolnu skupinu. Vrijednosti su slične, a može se zaključiti da parametar predviđa da se polovica polifenola oslobodi/razgradi u prvih nekoliko minuta

probave. Predviđena je i količina koja se može osloboditi u želudcu (83,5 do 1367,7 mg kg<sup>-1</sup>) te tankom crijevu (121,3 do 776,4 mg kg<sup>-1</sup>) prema prvom redu reakcije te u želudcu (85,9 do 1397,7 mg kg<sup>-1</sup>) i tankom crijevu (124,1 do 746,8 mg kg<sup>-1</sup>) prema drugom redu reakcije (s obzirom na polifenolnu skupinu). Vrijednosti predviđene jednadžbom prvog i drugog reda slične su.

Vrijednosti  $c_{\infty}$  predviđenih modelom uspoređene su s eksperimentalno dobivenim vrijednostima (**Slika 23 i 24**). Ove vrijednosti pokazale su visoku korelaciju za oslobođene polifenole želuca ( $r^2 = 0,9997$  i  $0,9998$  za prvi i drugi red, redosljedom) i tankog crijeva ( $r^2 = 0,9933$  i  $0,9965$  za prvi i drugi red, redosljedom). Visoka korelacija upućuje na to da su modeli predvidjeli vrijednosti bliske eksperimentalnima te da se mogu upotrebljavati za analiziranje simulirane probave.

Parametri dobiveni jednadžbama drugog reda, pokazali su manju standardnu grešku u odnosu na parametre dobivene prvim redom (**Tablica 2**). No nije moguće sa sigurnošću potvrditi da je otpuštanje polifenola aronije reakcija drugog reda. Potrebna su dodatna istraživanja. U ranijem istraživanju oslobađanja polifenola korištena je samo jednadžba brzine reakcije prvog reda (Villanueva-Carvajal i sur., 2013).

## **6. ZAKLJUČAK**



Na temelju rezultata provedenih u ovome diplomskom radu, izvode se sljedeći zaključci:

1. U uzorku aronije prije i nakon probave u želudcu i tankom crijevu identificirani su polifenolni spojevi iz skupine fenolnih kiselina, antocijana i flavonola. U sastavu fenolnih kiselina bile su prisutne neoklorogenska i klorogenska kiselina. Antocijani su obuhvaćali cijanidin-3-galaktozid, cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-arabinozid i cijanidin-3-ksilozid, a kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-3-galaktozid i kvercetin-3-glukozid pripadaju skupini flavonola.
2. Ukupna količina antocijanina u aroniji prije probave iznosila je 2410,4 mg kg<sup>-1</sup>. Flavonoli su se nalazili u aroniji u količini od 276,2 mg kg<sup>-1</sup>, a fenolne kiseline u količini od 951,1 mg kg<sup>-1</sup>. U najvećem postotku u aroniji su bili prisutni antocijanini (66 %), a slijede ih fenolne kiseline (26 %) te flavonoli (8 %).
3. Nakon završene probave u želudcu i tankom crijevu, količine svih polifenolnih spojeva bile su manje od količine prirodno prisutnih u aroniji prije probave.
4. Nakon probave u želudcu postotna raspodjela polifenolnih skupina u ukupno otpuštenoj količini (antocijanini 58 %, fenolne kiseline 36 %, flavonoli 6 %) bila je slična postotnoj raspodjeli prije probave. No nakon probave u tankom crijevu vidljiva je promjena u postotnoj raspodjeli polifenolnih skupina (fenolne kiseline 56 %, antocijanini 27 %, flavonoli 17 %). Ove promjene moguće su zbog različite pH vrijednosti tijekom probave u želudcu i tankom crijevu. Antocijanini u tankom crijevu prelaze u drugu strukturnu formu zbog različitih pH vrijednosti.
5. Količine polifenolnih skupina i ukupnih polifenola oslobođenih u želudcu i tankom crijevu u određenom vremenu ( $c_t$ ) analizirane su modificiranim jednadžbama kemijske kinetike prvog i drugog reda.
6. Prema vremenu polureakcije ( $t_{1/2}$ ), predviđeno vrijeme u kojem se polovica polifenola oslobodi/razgradi iz matriksa hrane iznosi svega nekoliko minuta (prvi red: želudac 0,94 - 2,31 min, tanko crijevo 0,82 - 4,10 min; drugi red: želudac 0,63 do 1,02 min, tanko crijevo 0,77 do 2,50 min) s obzirom na polifenolne skupine.
7. Predviđena je količina koja se može osloboditi u želudcu  $c_\infty$  (83,5 do 1367,7 mg kg<sup>-1</sup>) te tankom crijevu (121,3 do 776,4 mg kg<sup>-1</sup>) prema prvom redu reakcije te u želudcu (85,9 do 1397,7 mg kg<sup>-1</sup>) i tankom crijevu (124,1 do 746,8 mg kg<sup>-1</sup>) prema drugom redu reakcije (s obzirom na polifenolnu skupinu).

8. Visoka korelacija među vrijednostima  $c_{\infty}$  predviđenih modelom i eksperimentalno dobivenih vrijednosti  $c_{\text{exp}}$  za želudac ( $r^2 = 0,9997$  i  $0,9998$  prvi i drugi red, redosljedom) i tanko crijevo ( $r^2 = 0,9933$  i  $0,9965$  za prvi i drugi red, redosljedom) upućuje na to da su modeli predvidjeli vrijednosti bliske eksperimentalnima te da se mogu upotrebljavati za analiziranje simulirane probave.

## **7. LITERATURA**

Anouar, E.H., Giercshner, J., Duroux, J.R., Trouillas, P. (2012): UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. *Food Chemistry* 131, 79–89.

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

Bravo L: Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutritional Reviews* 56: 317-333, 1998.

Crozier A, Jaganath IB Clifford MN: Phenols, polyphenols and tannins: An overview: Plant Secondary Metabolites. *Blackwell Publishing Ltd*, Oxford, UK, 1–24, 2006.

Harborne JB, Williams C: Advances in flavonoid research since. *Phytochemistry* 55: 481-504, 2000.

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

Henderson, D.J, Rettner, C.T: Physical chemistry, U: *Encyclopedia of Physical Science and Technology*. Elsevier, 159–176, 2003.

Ho GT, Bräunlich M, Austarheim I, Wangensteen H, Malterud KE, Slimestad R, Barsett H: Immunomodulating activity of Aronia melanocarpa polyphenols. *International journal of molecular sciences* 15(7): 11626-11636, 2014.

Jakobek L: Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry* 175, 556–567, 2015.

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

Jakobek L, Matic P, Ištuk J, Barron AR: Study of interactions between individual phenolics of aronia with barley  $\beta$ -glucan. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 71:187-196, 2021.

Jakobek L, Ištuk J, Tomac I, Matić P:  $\beta$ -glucan and aronia (*Aronia melanocarpa*) phenolics: Interactions during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion and adsorption. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 72:371-380, 2022.

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.

Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M: Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *Journal of medicinal food* 13(2): 255- 269, 2010.

Koponen JM, Happonen AM, Mattila PH, Törrönen AR: Contents of anthocyanins, and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:1612-1619, 2007.

Kulling SE, Rawel HM: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)-A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta medica* 74(13): 1625-1634, 2008.

Filipović I, Lipanović S: *Opća i anorganska kemija*. Školska knjiga, Zagreb, 1995.

Lafay S, Gil-Izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*: 301-311, 2008.

Liu B, Cao L, Zhang L, Yuan X, Zhao B: Preparation, phytochemical investigation, and safety evaluation of chlorogenic acid products from *Eupatorium adenophorum*. *Molecules* 22(1): 67, 2017.

Malik M, Zhao C, Schoene N, Guisti MM, Moyer MP, Magnuson BA. Anthocyanin-rich extract from *Aronia melanocarpa* E. induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. *Nutrition and Cancer*:186-196, 2009.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79, 727-747, 2004.

Mikulic-Petkovsek, M., Ivancic, A., Todorovic, B., Veberic, R., Stampar, F. (2015): Fruit Phenolic Composition of Different Elderberry Species and Hybrids. *Journal of Food Science* 80, C2180–C2190.

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

Oszmianski J, Wojdylo A: Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 1, 1-5, 2005.

Robbins RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2866-2887, 2003.

Shivashankara KS, Acharya SN: Bioavailability of dietary polyphenols and the cardiovascular diseases. *The Open Nutraceuticals Journal* 3:227-241, 2010.

Tolić MT, Krbavčić Panjkota I, Vujević P, Milinović B, Jurčević Landeka I, Vahčić N: Effects of weather conditions on phenolic content and antioxidant capacity in juice of chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.). *Polish journal of food and nutrition sciences* 67(1): 67-74, 2017.

Vermerris W, Nicholson R: Phenolic compounds and their effects on human health. *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer, Dordrecht, 235-255, 2006.

Villanueva-Carvajal A, Bernal-Martínez LR, García-Gasca T, Dominguez-Lopez A: In vitro

gastrointestinal digestion of Hibiscus sabdariffa L: The use of its natural matrix to improve the concentration of phenolic compounds in gut. *LWT - Food Science and Technology* 51: 260–265, 2013.

Wollgast J, Anklam E: Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33:423-447, 2000.

Wu T, Grootaert C, Voorspoels S, Jacobs G, Pitart J, Kamiloglu S, Possemiers S, Heinonen M, Kardum N, Glibetic M, Smagghe G, Raes K, Camp JV: Aronia (*Aronia melanocarpa*) phenolics bioavailability in a combined in vitro digestion/Caco-2 cell model is structure and colon region dependent. *Journal of Functional Foods* 38, 128–139, 2017.

Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL: Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:4069-4075, 2006.

Prirodni-sokovi.hr: Aronija i sve o njoj <https://prirodni-sokovi.hr/aronija-i-sve-o-njoj/> (10.07.2023.) (slika 1)

ResearchGate: Quercetin 3-O-glucoside (3, isoquercitrin)  
[https://www.researchgate.net/figure/Quercetin-3-O-glucoside-3-isoquercitrin\\_fig4\\_348190038](https://www.researchgate.net/figure/Quercetin-3-O-glucoside-3-isoquercitrin_fig4_348190038) (12.07.2023.)

ResearchGate: Quercetin 3-O-rutinoside (2, rutin)  
[https://www.researchgate.net/figure/Quercetin-3-O-rutinoside-2-rutin\\_fig3\\_348190038](https://www.researchgate.net/figure/Quercetin-3-O-rutinoside-2-rutin_fig3_348190038) (12.07.2023.)

ResearchGate: Structure of hyperoside (quercetin-3-O-galactoside)  
[https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-hyperoside-quercetin-3-O-galactoside\\_fig1\\_317387815](https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-hyperoside-quercetin-3-O-galactoside_fig1_317387815) (12.07.2023.)