

# Ponašanje klorogenskih i kafeinske kiseline u otopinama elektrolita za simuliranu probavu

---

Pőc, 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:109:967437>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-22**

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**

Kristina Póć

**Ponašanje klorogenskih i kafeinske kiseline u otopinama elektrolita  
za simuliranu probavu**

diplomski rad

Osijek, rujan 2023.

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.  
**Mentor:** prof. dr. sc. Lidija Jakobek Barron  
**Pomoć pri izradi:**

**Ponašanje klorogenskih i kafeinske kiseline u otopinama elektrolita za simuliranu probavu**  
Kristina Pőc, 0113143644

**Sažetak:**

Cilj je bio ispitati ponašanje klorogenskih i kafeinske kiseline u modelnim otopinama elektrolita za simuliranu probavu u ustima, želudcu i tankom crijevu pri različitim pH vrijednostima. Klorogenska, neoklorogenska, kriptoklorogenska i kafeinska kiselina pripremljene su u otopinama elektrolita, te analizirane pomoću RP-HPLC (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography) metode na početku i nakon 4 h inkubacije na 37°C. Provedena je i ekstrakcija polifenolnih spojeva iz jabuke te simulirana probava jabuke *in vitro*, da bi se vidjelo ponašanje klorogenske kiseline u realnom uzorku. Nije došlo do vidljivih promjena u kiselinama odmah nakon otapanja u modelnim otopinama elektrolita ( $t=0$ ). Nakon 4 h inkubacije u otopini elektrolita za simuliranu probavu u ustima i tankom crijevu (pH 7) vidljiva je izomerizacija svih klorogenskih kiselina, dok kafeinska kiselina nije pokazala prisustvo drugih kiselina, i gotovo je potpuno nestala (elektroliti tankog crijeva). Postotna raspodjela nakon 4 h pri pH 7 (usta, tanko crijevo) bila je kako slijedi: nakon inkubacije klorogenske kiseline (53 - 78 % klorogenske, 7 - 11 % neoklorogenske, 14 - 15 % kriptoklorogenske kiseline), nakon inkubacije neoklorogenske (33 do 44 % neoklorogenske, 13 % klorogenske, 24 - 31 % kriptoklorogenske kiseline), nakon inkubacije kriptoklorogenske (16 do 23 % kriptoklorogenske, 20 - 30 % neoklorogenske i 13 - 17 % klorogenske kiseline). Kafeinske kiseline je u izvornom obliku preostalo samo 1 - 30 %. U simuliranoj otopini elektrolita za želudac, može se predložiti veća stabilnost ispitivanih kiselina. U jabuci su prije probave identificirane klorogenska i *p*-kumaroil-kina kiselina. Uz iste kiseline, identificirani su dodatni izomeri (nakon probave u želudcu kriptoklorogenska kiselina, nakon probave u tankom crijevu neoklorogenska, kriptoklorogenska te neidentificirana fenolna kiselina) što pokazuje da se događa izomerizacija klorogenske kiseline i u realnom uzorku. Rezultati mogu biti važni za bioefekte klorogenskih i kafeinske kiseline u ljudskom organizmu.

**Glavne riječi:** *neoklorogenska kiselina, kriptoklorogenska kiselina, jabuka, simulacija probave*

**Rad sadrži:** 47 stranice  
28 slika  
1 tablica  
0 priloga  
27 literaturnih referenci

**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. dr. sc. Petra Matić, znan. sur. član
4. doc. dr. sc. Ivana Tomac zamjena člana

**Datum obrane:** 29.9.2023

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** 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 Behaviour of Chlorogenic Acids and Caffeic Acid in the Electrolyte Solutions for Simulated Gastrointestinal Digestion Kristina Póć 0113143644

#### Summary:

The aim was to study the behavior of chlorogenic and caffeic acids in solutions of electrolytes for simulated digestion in the mouth, stomach and small intestine, at different pH values. Chlorogenic, neochlorogenic, cryptochlorogenic, and caffeic acids were prepared in electrolyte solutions, and analyzed using the RP-HPLC (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography) method at the beginning and after 4 h of incubation at 37°C. Extraction of polyphenolic compounds from apples and simulated digestion of apples *in vitro* were also carried out, in order to see the behavior of chlorogenic acid in the real sample. There were no visible changes in acids immediately after dissolution in model electrolyte solutions (t=0). After 4 h of incubation in the electrolyte solution for simulated digestion in the mouth and small intestine (pH 7), the isomerization of all chlorogenic acids was visible, while caffeic acid did not show the presence of other acids, however it almost completely disappeared (electrolytes of the small intestine). The percentage distribution after 4 h at pH 7 (mouth, small intestine) was as follows: after incubation of chlorogenic acid (53 - 78% chlorogenic, 7 - 11% neochlorogenic, 14 - 15% cryptochlorogenic acid), after incubation of neochlorogenic (33 to 44% neochlorogenic, 13% chlorogenic, 24 - 31% cryptochlorogenic acid), after incubation of cryptochlorogenic (16 to 23% cryptochlorogenic, 20 - 30% neochlorogenic, and 13 - 17% chlorogenic acid). Only 1-30% of caffeic acid remained in its original form. In the simulated gastric electrolyte solution, a higher stability of the tested acids can be suggested. Chlorogenic and *p*-coumaroylquinic acid were identified in the apple before digestion. In addition to those acids, additional isomers were identified (after digestion in the stomach cryptochlorogenic acid, after digestion in the small intestine neochlorogenic, cryptochlorogenic, and unidentified phenolic acid) which shows that isomerization of chlorogenic acid also occurs in the real sample. The results might be important for the bioeffects of chlorogenic and caffeic acids in the human body.

**Keywords:** *neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, apple, gastrointestinal digestion simulation*

**Thesis contains:** 47 pages  
28 figures  
1 tables  
0 supplements  
27 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

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

**Defense date:** September 29. 2023.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	4
2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI .....	5
2.2. FENOLNE KISELINE.....	6
2.2.1. Klorogenske kiseline.....	7
2.2.2. Kafeinska kiselina .....	8
2.3. PROBAVNI SUSTAV .....	9
2.4. JABUKA .....	10
2.4.1. Probavni proces polifenola jabuke.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	13
3.1. ZADATAK.....	14
3.2. MATERIJAL I METODE.....	14
3.2.1. Kemikalije .....	14
3.2.2. Simulirane otopine elektrolita.....	15
3.2.3. Priprema otopina, klorogenskih i kafeinske kiseline .....	15
3.2.4. Inkubacija klorogenskih i kafeinske kiseline u simuliranoj tekućini elektrolita.....	16
3.2.5. Priprema uzorka jabuka.....	16
3.2.6. Kemijska ekstrakcija polifenola jabuke .....	16
3.2.7. Enzimaska ekstrakcija polifenola u jabuke.....	17
3.2.8. Simulirana probava.....	17
3.2.9. Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija.....	18
3.2.10. Statistička obrada podataka .....	19
4. REZULTATI.....	20
4.1. Kromatogrami i UV/Vis spektri klorogenskih i kafeinske kiseline u simuliranim otopinama elektrolita .....	21
4.2. Promjene u klorogenskim i kafeinskoj kiselini tijekom 4 sata inkubacije .....	29
4.3. Simulirana probava jabuke.....	30
5. RASPRAVA.....	35
6. ZAKLJUČAK.....	41
6. LITERATURA.....	43

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Lidiji Jakobek Barron na pomoći, vodstvu i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Hvala svim prijateljima i kolegama koji su bili uvijek uz mene unatoč svim preprekama.*

*Najviše zahvaljujem mojim roditeljima i sestri na podršci i razumijevanju tijekom svih ovih godina studiranja.*

## **1. UVOD**

Vrlo brojne skupine koje su prisutne u biljkama i sastavni su dio naše prehrane su polifenolni spojevi (Bravo, 1998). Njihova bioraspoloživost i učinkovitost u velikoj mjeri ovisi o kemijskoj strukturi. Ovisno o broju i povezanosti fenolnih prstenova, mogu se podijeliti u 4 glavne skupine: fenolne kiseline, lignane, stilbene i flavonoide. Imaju potencijal spriječiti razne negativne učinke na ljudski organizam kao što su: oksidativni stres, upale i infekcije (Amawi i sur., 2017).

Nakon flavonoida, fenolne kiseline su najčešće prisutna skupina polifenola, te ih se može pronaći u većim količinama u crnom čaju i kavi (Amawi i sur., 2017). Fenolne kiseline sadrže benzenski prsten, karboksilnu skupinu i jednu ili više metoksi ili hidroksilnih skupina (Belščak-Cvitanović i sur., 2018). Skupine u koje su podijeljene fenolne kiseline su derivati benzojeve i cimetine kiseline (Amawi i sur., 2017). Doprinosu organoleptičkim svojstvima hrane kao što su okus, boja i oporost (Rashmi i Negi, 2020).

Klorogenske kiseline pripadaju hidroksicimetnim kiselinama. One su grupa estera između kina kiseline i jedne ili više kafeinske, ferulične i *p*-kumarinske kiseline (Narita i Inouye, 2013). 3-*O*-kafeoil-kina kiselina ili klorogenska kiselina (sigmaaldrich.com) je ester kafeinske kiseline i kina kiseline. U velikoj mjeri je prisutna u voću, povrću i kavi. Također ima mnogobrojne biološke aktivnosti u koje se ubrajaju antioksidativna i antikancerogena svojstva (Narita i Inouye, 2013). Izomeri klorogenske kiseline se razlikuju po rasporedu kafeinske kiseline na kina kiselini. To su neoklorogenska kiselina (5-*O*-kafeoil-kina kiselina) i kriptoklorogenska kiselina (4-*O*-kafeoil-kina kiselina) (sigmaaldrich.com) (Xu i sur., 2012). Biološke i fizikalno-kemijske karakteristike neoklorogenske kiseline nisu dovoljno istražene (Navarro-Orcajada, 2021), kao niti svojstva kriptoklorogenske kiseline (Zhao i sur., 2020). Klorogenske kiseline mogu se pronaći i u jabukama (Jakobek i sur., 2020). Kafeinska kiselina pripada također podgrupi hidroksicimetnih kiselina. Može se pronaći u voću, povrću i raznim pićima. Ima širok spektar potencijalno pozitivnih zdravstvenih učinaka (Birkova i sur. 2020).

Zbog uvjeta koji vladaju u različitim fazama probave, klorogenske kiseline mogu prelaziti u različite forme tijekom probave. Poznavanje formi koje se pojavljuju u ustima, želudcu ili tankom crijevu, važno je zbog njihovih potencijalnih bioefekata.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati ponašanje klorogenskih i kafeinske kiseline u otopinama elektrolita za simuliranu probavu u ustima, želucu i tankom crijevu, pri pH 7, 3 i 7 (redosljedom). Identifikacija i kvantifikacija provela se pomoću RP-HPLC metode (engl.



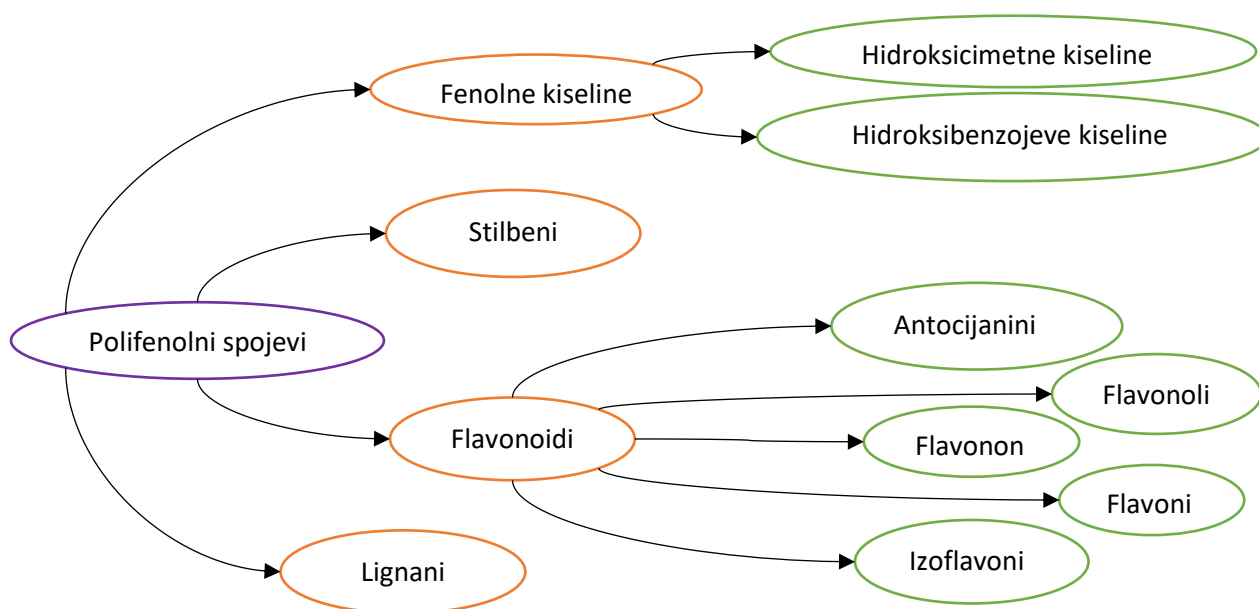
Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography). Osim toga, provedena je simulirana probava jabuke da bi se dobio uvid u ponašanje klorogenskih kiselina iz realnog uzorka.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenolni spojevi su jedna od najrasprostranjenijih i vrlo složenih skupina spojeva koji se nalaze u biljnom svijetu, te je do danas poznato preko 8000 spojeva koji ulaze u ovu skupinu (Bravo, 1998; Pandey i Rizvi 2009). Ovi spojevi se mogu naći u raznovrsnoj biljnoj hrani (žitarice, povrće, voće) i različitim pićima (čaj, pivo, kakao, vino) (Bravo, 1998)

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji mogu nastati iz zajedničkog intermedijera, fenilalanina, ili prekursora, šikiminske kiseline (Bravo, 1998; Pandey i Rizvi 2009). Polifenoli se dijele na sljedeće glavne skupine: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (Manach i sur., 2004) (Slika 1).

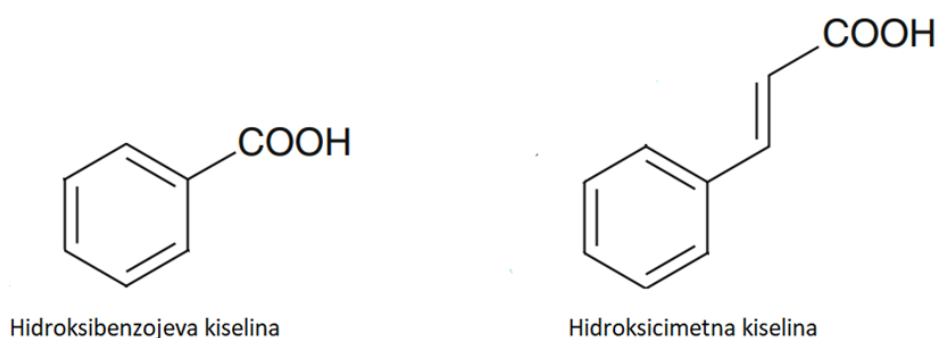


**Slika 1** Klasifikacija polifenolnih spojeva (Manach i sur., 2004)

Sve je veći interes za polifenolne spojeve zbog njihovog potencijalno pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje i velike antioksidativne sposobnosti (sposobnost hvatanja slobodnih radikala) (Bravo, 1998).

## 2.2. FENOLNE KISELINE

Jedna od najistaknutijih skupina bioaktivnih spojeva s kemijskom strukturom koja u svom sastavu ima karboksilnu skupinu koja je vezana na benzenski prsten i sadrži jednu ili više hidroksilnih i/ili metoksi skupina, naziva se fenolnim kiselinama (Rashmi i Negi, 2020; Kumar i Goel, 2019; Belščak-Cvitanović i sur. 2018). Trećinu polifenolnih spojeva u našoj prehrani čine fenolne kiseline. Naročito su prisutne u voću kiselog okusa (Pandey i Rizvi 2009). Najzastupljenija je ferulična kiselina koja se može pronaći u žitaricama, odnosno u vanjskom dijelu zrna (Manach i sur., 2004). Prema kemijskoj strukturi dijele se u dvije skupine: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Manach i sur., 2004) (**Slika 2**). One su sekundarni aromatski metaboliti biljaka koji daju organoleptička svojstva velikom broju namirnica (Rashmi i Negi, 2020).



**Slika 2** Strukture hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Manach i sur., 2004)

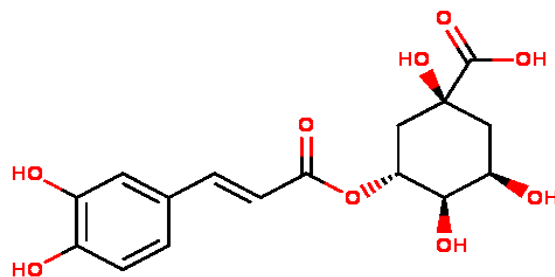
Hidroksibenzojeve kiseline pripadaju derivatima benzojeve kiseline sa sedam ugljikovih atoma C6-C1 strukture. Predstavnici ove skupine, koji se dijele prema razlici na aromatskom prstenu su: galna, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, protokatehinska, elaginska i salicilna kiselina. One se u jestivim biljkama nalaze u malim količinama, za razliku od crvenog voća, luka i crne rotkve gdje su prisutne u većim količinama. Ove kiseline su prisutne u slobodnom i esterificiranom obliku te su rjeđe u usporedbi s hidroksicimetnim kiselinama (Manach i sur., 2004; Rashmi i Negi, 2020).

Hidroksicimetne kiseline su derivati cimetne kiseline, imaju devet ugljikovih atoma C6-C3 strukture. U ove kiseline pripadaju sinapinska, kafeinska, ferulična, *p*-kumarinska, cimetna i *p*-hidroksicimetna kiselina. Hidroksicimetne kiseline zastupljene su u svim dijelovima voća

(najzastupljenije u vanjskim dijelovima zrelog voća). Kina i kafeinska kiselina se spajaju u klorogensku kiselinu koja je nalazi u kavi u većoj koncentraciji (Manach i sur., 2004; Rashmi i Negi, 2020).

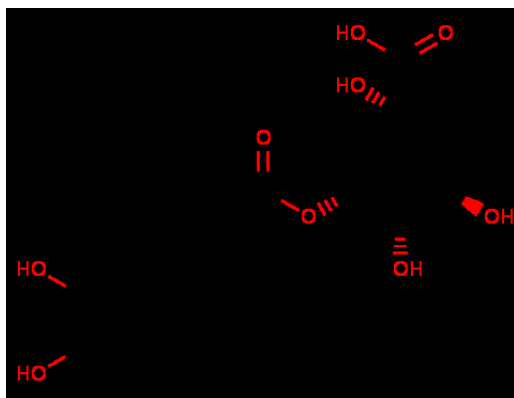
### 2.2.1. Klorogenske kiseline

Klorogenske kiseline se smatraju jednim od najzastupljenijih hidroksicimetnih kiselina u prehrani (Gonthier i sur. 2003). Mogu se pronaći u čaju, kavi, bobičastom voću, kruškama i jabukama (Naveed i sur. 2018). To su esteri nastali između kina kiseline i ferulične, kafeinske ili *p*-kumarinske kiseline (Narita i Inouye, 2013). Za klorogensku kiselinu uobičajeni naziv je 3-*O*-kafeoil-kinna kiselina (Sigmaaldrich.com) (**Slika 3**). Biološka svojstva klorogenske kiseline ovise o apsorpciji u crijevima i metabolizmu, dok joj se aktivnost gubi prilikom zagrijavanja i izlaganja svjetlu (Gonthier i sur., 2003). Najznačajnije potencijalne biološke aktivnosti koje posjeduje su: antioksidativno, protuupalno i antivirusno djelovanje. Ima široki antibakterijski spektar, djeluje inhibitorno na *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Aspergillus niger*. Osim toga, ima sposobnost održavanja koncentracije glukoze u krvi što može biti pozitivno kod dijabetesa (Miao i sur., 2020).



**Slika 3** Struktura klorogenske kiseline (WEB 1)

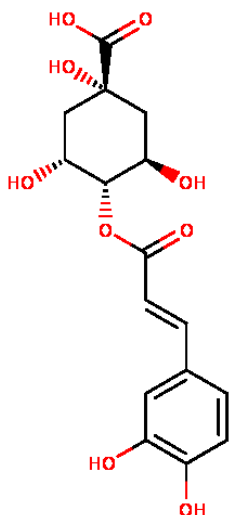
Neoklorogenska kiselina (5-*O*-kafeoil-kinna kiselina) je izomer klorogenske kiseline koja nastaje esterskom vezom između kafeinske kiseline i D-(-)-kina kiseline (**Slika 4**).



**Slika 4** Struktura neoklorogenske kiseline (WEB 2)

Nastaje kao produkt biosinteze u biljkama. Istraživanja pokazuju da neoklorogenska kiselina također ima antifungalne, antikarcinogene i protuupalne bioaktivnosti. Prema tome postoji mogućnost da bi se mogle koristiti kao supstrat za ugradnju u funkcionalnu hranu (Navarro-Orcajada i sur. 2021).

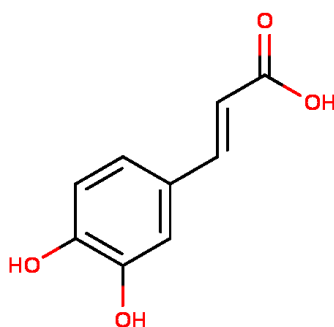
Kriptoklorogenska kiselina (4-*O*-kafeoil-kina kiselina) je izomer klorogenske kiseline (**Slika 5**). Ove kiseline se razlikuju s obzirom na kojem položaju se supstituira kafeinska kiselina na kina kiselinu, ali im je funkcija približno slična (Narita i Inouye, 2013).



**Slika 5** Struktura kriptoklorogenske kiseline (4-CQA) (WEB 3)

### 2.2.2. Kafeinska kiselina

Kafeinska kiselina (3,4-dihidroksicimetna kiselina) je glavni predstavnik hidroksicimetnih kiselina (**Slika 6**).



**Slika 6** Struktura kafeinske kiseline (WEB 4)

Najdjelotvorniji učinak kafeinske kiseline pripisuje se njezinim antioksidativnim svojstvima. Antioksidativna svojstva nastaju zbog prisutnosti hidroksilnih skupina na benzenskom prstenu koji omogućuje lako otpuštanje vodika koji kao takav stabilizira nastale fenoksilne radikale. Kafeinska kiselina se može pronaći u povrću, voću, uljima i orasima (Birková i sur. 2020).

### **2.3. PROBAVNI SUSTAV**

Nakon konzumacije hrane polifenolni spojevi se oslobađaju iz matriksa hrane što daje mogućnost njihove apsorpcije, ali i razgradnje. Polifenolni spojevi koji se apsorbiraju prolaze kroz vrlo intenzivan metabolizam faze I i II pri čemu nastaju brojni metaboliti sasvim drugačije strukture od kemijske strukture polifenola. Ove metabolite može se pronaći u krvi, organima, te u najvećoj količini u urinu. Polifenoli koji se ne apsorbiraju u probavnom traktu, dolaze u debelo crijevo, nakon čega se izbacuju iz organizma.

**Usna šupljina-** U ustima dolazi do usitnjavanja i miješanja hrane sa slinom (početna probavna faza). Nakon konzumacije hrane, polifenoli su izloženi slini koja sadrži  $\alpha$ -amilazu. Zadržavanje polifenolnih spojeva je kratko u ovoj fazi.

**Želudac** - Nakon gutanja, hrana podliježe kiselom mediju u želucu koji sadrži pepsin. Polifenoli se i ovdje oslobađaju iz matriksa hrane. Pokazalo se da je povećano oslobađanje polifenolnih spojeva kada se vrši mehanička sila.

**Tanko crijevo-** Nakon prolaska kroz želudac, preostali polifenoli ulaze u blago bazično okruženje (pH=6-7). Određeni polifenolni spojevi se oslobađaju u ovom dijelu probave, neki se razgrade, a neki apsorbiraju, nakon čega slijedi metabolizam faze I i II (Feng i sur., 2021).

## 2.4. JABUKA

Jabuka (*Malus domestica* Borkh.) pripada porodici ruža (*Rosaceae*) (**Slika 7**). Zbog svoje visoke hranjive vrijednosti te sezonske dostupnosti, jabuka je jedna od najčešće uzgajanih voćaka diljem svijeta. Od jabuke se proizvode razne prerađevine (Feng i sur., 2021).



**Slika 7** Prikaz jabuke (WEB 5)

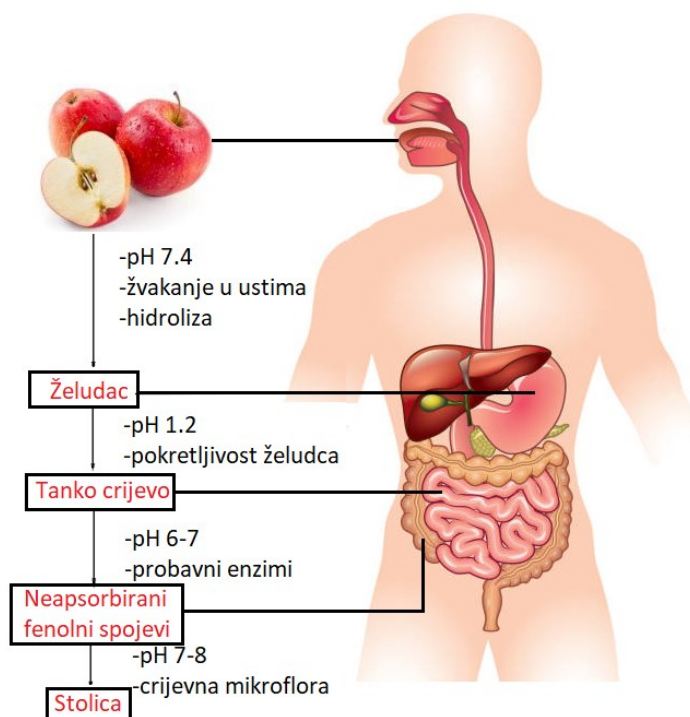
Zajedno s korom, jabuke imaju značajnu količinu vlakana. U jabuci se nalazi više od 84% vode u kojoj se nalaze razni minerali u otopljenom obliku (Feliciano i sur., 2010). Postotak ugljikohidrata je 14% (Feng i sur., 2021).

Polifenolni spojevi u jabuci pripadaju skupinama antocijanina, flavonola, flavan-3-ola, dihidrokalkona i fenolnih kiselina (Feng i sur., 2021). Istraživanja su pokazala da je ukupni sadržaj polifenola u kori jabuke znatno veći nego u mesu jabuke (Feng i sur., 2021; Jakobek i sur., 2020). Zbog uobičajenog konzumiranja jabuka te sadržaja polifenolnih spojeva, biološka svojstva jabuke se intenzivno istražuju. Istražuje se njihova antioksidativna, antimikrobna i antiupalna svojstva koja mogu imati potencijalno pozitivan utjecaj na zdravlje (Feng i sur., 2021; Feliciano i sur., 2010; Jakobek i sur.2020).



### 2.4.1. Probavni proces polifenola jabuke

Prikaz probavnog procesa polifenola iz jabuke prikazan je na **Slici 8**.



**Slika 8** Proces razgradnje polifenola jabuke u oralnoj, želučanoj i crijevnoj fazi (Feng i sur. 2021)

**Usna šupljina:** Istraživanja su pokazala da jabuka koja je izložena slini u *in vitro* uvjetima otpušta relativno veliki udio pojedinih spojeva: 35,1% kvercetin-3-*O*-rutinozida, 35,0% procijanidina i 27,3% floretin-2-*O*-glukozida (Feng i sur., 2021).

**Želudac:** Oko 65% ukupne količine flavonoida i fenolnih kiselina iz jabuka otpušta se u želučanoj fazi, dok se u tankom crijevu oslobađa manje od 10% ovih spojeva. Hidroksicimetne kiseline jabuke kao što je klorogenska kiselina mogu biti dominantne u želučanoj fazi. Osim nje u ovoj fazi su pronađeni i sljedeći spojevi: flavan-3-oli, flavonoli i dihidrokalkoni. Pokazalo se da su dihidrokalkoni i flavonoli iz jabuka otporni na kiselu hidrolizu, što im osigurava prolaz do crijeva u nepromijenjenom obliku. No, u želučanom mediju klorogenska kiselina se može hidrolizirati u manjoj količini. Male količine polifenolnih spojeva se apsorbiraju u netaknutom obliku. Jedan od ovih spojeva je i kafeinska kiselina (Feng i sur., 2021).

**Tanko crijevo:** Klorogenska kiselina se može djelomično razgraditi u slabo alkalnim uvjetima na što ukazuje njena smanjena koncentracija prelaskom iz želudca u tanko crijevo. Izomeri klorogenske kiseline kao što su neoklorogenska i kriptoklorogenska kiselina pronađeni su u tankom crijevu. Ovim se pokazalo da se klorogenska kiselina može transformirati izomerizacijom tijekom probave u tankom crijevu. Osim toga, klorogenske kiseline se u ovom dijelu probave lako hidroliziraju. Pokazalo se da se klorogenska kiselina vjerojatno apsorbira u relativno visokom postotku dok prolazi kroz tanko crijevo. Flavonoidi koji su pronađeni u ovoj fazi su dihidrokalkoni i flavonoli, dok monomeri flavan-3-ola nisu bili prisutni u simuliranoj probavi, zbog relativno brze apsorpcije u tankom crijevu. No, pojedini flavan-3-oli se mogu razgraditi u tankom crijevu. Tako se postotak procijanidina B2 smanjio u *in vitro* simuliranoj fazi u tankom crijevu što se objašnjava degradacijom na nepoznate razgradne produkte. Osim toga, u tankom crijevu dolazi do potpunog gubitka antocijanina iz jabuke, zbog povišenog pH (Feng i sur., 2021).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada je bio ispitati ponašanje klorogenskih i kafeinske kiseline u modelnim otopinama elektrolita za simuliranu probavu u ustima, želudcu i tankom crijevu.

- Klorogenska, neoklorogenska, kriptoklorogenska te kafeinska kiselina pripremljene su u otopinama elektrolita za simuliranu probavu usta, želuca i tankog crijeva (pH 7, 3, 7 ,redosljedom)
- Analizirane su upotrebom RP-HPLC (engl. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography) metode na početku te nakon 4 h inkubacije na 37 °C.
- Određen je postotak razgradnje kiselina, identificirani su spojevi nastali razgradnjom uz pomoć UV/Vis spektra i vremena zadržavanja.
- Provedena je ekstrakcija polifenolnih spojeva iz jabuke kemijskom te enzimima potpomognutom ekstrakcijom
- Provedena je simulirana probava jabuke u želudcu i tankom crijevu *in vitro*,
- Uzorci na kraju faza probave analizirani su RP-HPLC metodom.
- Uspoređene su klorogenske kiseline jabuke prije probave i otpuštenih tijekom simulirane probave s klorogenskim kiselinama u simuliranim otopinama elektrolita, s ciljem razjašnjenja ponašanja ovih kiselina u realnom uzorku.

### 3.2. MATERIJAL I METODE

#### 3.2.1 Kemikalije

U ovom diplomskom radu koristile su se sljedeće kemikalije:

- SSF (otopina za fazu probave u ustima, engl. Simulated Salivary Fluid),
- SGF (otopina za fazu probave u želudcu, engl. Simulated Gastric Fluid),
- SIF (otopina za fazu probave u tankom crijevu, engl. Simulated Intestinal Fluid),
- klorogenska kiselina, neoklorogenska kiselina, kriptoklorogenska kiselina (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, Sjedinjene Američke Države),

- kafeinska kiselina (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, Sjedinjene Američke Države)
- KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O (Gram mol, Zagreb, Hrvatska)
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- NaCl (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, Francuska)
- α-amilaza (13 U/mg), pepsin (632 U/mg), pankreatin (8 USP), žučne soli (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD).
- Orto-fosforna kiselina (85 % HPLC čistoće) (Fluka, Buchs, Švicarska)
- Methanol (J.T. Baker, Gliwice, Poljska)
- HCl (Avantor, Arnhem, Nizozemska).

### 3.2.2. Simulirane otopine elektrolita

Prema postupku opisanom u radovima Minekus i sur. (2014) te Bergantin i sur. (2017) pripremljene su simulirane otopine elektrolita (SSF, SGF i SIF). Ukratko, elektroliti su pripremljeni u koncentracijama kako slijedi: KCl (0,5 M), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5 M), NaHCO<sub>3</sub> (1 M), MgCl<sub>2</sub> (0,15 M), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,5 M), NaCl (2 M) i CaCl<sub>2</sub> (0,3 M). U odmjerne tikvice od 100 mL otpipetirani su određeni volumeni pripremljenih elektrolita, a destilirana voda dosipana je do konačnog volumena da bi se dobile konačne koncentracije elektrolita:

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>, 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).

### 3.2.3. Priprema otopina, klorogenskih i kafeinske kiseline

Otopine enzima pripremljene su u koncentracijama: α-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).

Pripremljene su stock otopine klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline:

- klorogenska kiselina 836 mg L<sup>-1</sup>,
- neoklorogenska kiselina 967,7 mg L<sup>-1</sup>,
- kriptoklorogenska kiselina 976,2 mg L<sup>-1</sup> i
- kafeinska kiselina 1168,2 mg L<sup>-1</sup>.

### **3.2.4. Inkubacija klorogenskih i kafeinske kiseline u simuliranoj tekućini elektrolita**

U dvije plastične kivete dodano je 30 µL stock otopine klorogenske kiseline i 1470 µL otopine za simuliranu probavu u ustima (SSF) (konačna koncentracija 16,72 mg L<sup>-1</sup>). Odmah nakon razrjeđenja otopine su homogenizirane na vortexu (PV-1, Grant Instruments, Cambridgeshire, UK). Otopina klorogenske kiseline iz prve kivete odmah je analizirana na HPLC-u, a druga je stavljena u inkubator na 37°C, 4h (IN 30 Memmert, Schwabach, Njemačka) te nakon 4 h odmah analizirana na HPLC uređaju. Isti postupak ponovljen je za klorogensku kiselinu u SGF i SIF.

Neoklorogenska, kriptoklorogenska i kafeinska kiselina pripremljene su i analizirane na isti način. Konačne koncentracije nakon razrjeđenja u SSF, SGF i SIF bile su: neoklorogenska kiselina 19,35 mg L<sup>-1</sup>, kriptoklorogenska kiselina 19,52 mg L<sup>-1</sup> i kafeinska kiselina 23,4 mg L<sup>-1</sup>.

### **3.2.5. Priprema uzorka jabuka**

Jabuka je s korom i mesom narezana na sitne komadiće. Koštice sa sredinom su odstranjene. Štapnim mikserom su dodatno usitnjeni i homogenizirani komadići jabuke da bi se dobila jednolična kaša. Uzorak je stavljen u vrećicu i skladišten u zamrzivaču 24 sata prije analize.

### **3.2.6. Kemijska ekstrakcija polifenola jabuke**

0,15 g usitnjene, homogenizirane jabuke je izvagano u dvije plastične kivete. Izvaganj u količini dodano je 1,5 ml metanola (80 %-tni metanol u vodi). Reakcijske smjese u kivetama

stavljene su 15 minuta u ultrazvučnu kupelj (Bandelin Sonorex RK 100, Berlin, Njemačka). Nakon toga su reakcijske smjese centrifugirane 10 minuta (10000 rpm) u centrifugi (Eppendorf Minispin, Hamburg, Njemačka) pri čemu je ekstrakt odvojen od ostatka. Provedena je još jedna ekstrakcija ostataka s 0,5 ml metanola (80 %-tni metanol u vodi) istim opisanim postupkom. Ovi ekstrakti povezani su s prethodnima da bi se dobili ekstrakti ukupnog volumena 2 mL. Pomoću PTFE filtra (0,2  $\mu$ m) ekstrakti su filtrirani i analizirani na HPLC-u.

### **3.2.7. Enzimska ekstrakcija polifenola u jabuke**

U ostatke koji su zaostali u dvije plastične kivete nakon kemijske ekstrakcije, otpipetirana je otopina žučne soli (60  $\mu$ L), pankreatin (30  $\mu$ L), pepsin (15  $\mu$ L) i voda (1,05 mL). Nakon toga reakcijske smjese su inkubirane (37°C, 2 sata). Nakon završene inkubacije uzorci su hlađeni 5 minuta u ledenoj kupelji, centrifugirani (10 000rpm) 5 minuta i ponovo potopljeni u ledenu kupelj. Ekstrakti su otpipetirani, filtrirani kroz PTFE filter (0,2  $\mu$ m) te analizirani na HPLC uređaju. Dobivene količina polifenola u dvije ekstrakcije, kemijskoj i enzimskoj, zbrojene su da bi se dobila ukupna količina polifenola prije probave.

### **3.2.8. Simulirana probava**

#### **Faza u želudcu**

Provedena je simulirana probava u ustima u vremenskom periodu od 2 minute, a zatim u želudcu 2 h. Kratak opis postupka: izvagano je 0,15 g homogenizirane jabuke u kivetu. Zatim je u kivetu otpipetirano 1,3  $\mu$ L 0,3 M kalcijevog klorida, 49  $\mu$ L vode i 175  $\mu$ L SSF. Reakcijska smjesa homogenizirana je u vortexu. Zatim je dodano 25  $\mu$ L  $\alpha$ -amilaze da bi se pokrenula simulacija probave. Smjesa je ponovo homogenizirana i postavljena u termoblok (Bio TDB-100, Biosan, Riga, Latvija), gdje je izvršena inkubacija 2 minute na 37°C. Nakon ove faze u ustima, u kiveti je odmah nastavljena faza simulirane probave u želudcu pipetiranjem 15  $\mu$ L vode, 375  $\mu$ L SGF, 0,3  $\mu$ L 0,3 M kalcijevog klorida, 10  $\mu$ L 1 M klorovodične kiseline i 100  $\mu$ L pepsina. Reakcijska smjesa je tada inkubirana u termobloku na 37 °C 2 sata. Smjesa je ohlađena u ledenoj kupelji, centrifugirana (10 000 rpm) 5 minuta da bi se otopina odvojila od krutog ostatka, ohlađena u ledenoj kupelji, filtrirala pomoću PTFE filtra (0,2  $\mu$ m) i analizirana pomoću HPLC-a. Postupak je proveden dva puta.

### **Faza u tankom crijevu**

Da bi se potpuno simulirala faza probave u tankom crijevu, provedena je faza probave u ustima koja je trajala 2 minute, faza u želudcu koja je trajala 2 sata prema opisanom prethodnom postupku. Na to je odmah nastavljena simulirana probava u fazi tankog crijeva u trajanju od 2 h. Ukratko: ponovno je 0,15 g jabuke izvagano u kivetu te je provedena faza probave u ustima (2 min) i želudcu (2 h). U reakcijsku smjesu otpipetirano je 180,5 µl vode, 550 µl SIF, 2 µl 0,3 M kalcijevog klorida, 7,5 µl NaOH (1 M), 10 µl žučnih soli te 250 µl pankreatina da bi počela faza probave u tankom crijevu. Pripremljena reakcijska smjesa homogenizirana je vortexom, inkubirana u termobloku na 37°C, 2 h. Nakon 2 h reakcijska smjesa je stavljena u ledenu kupelj na hlađenje da bi se zaustavilo djelovanje enzima, centrifugirana na 10 000 rpm 5 minuta, filtrirana kroz PTFE filtar (0,2 µm) i pomoću HPLC uređaja analizirana. Postupak je proveden dva puta.

### **3.2.9. Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija**

Klorogenske i kafeinska kiselina prije i nakon inkubacije u simuliranim otopinama elektrolita, fenolne kiseline u jabuci nakon kemijske i enzimske ekstrakcije te nakon probave jabuke odredile su se pomoću HPLC uređaja (1260 Infinity II, Agilent Technology, Santa Clara, SAD). Uređaj se sastoji od vialsamplera, PDA detektora (photodiodearray detector) i kvarterne pumpe. Primjenom kolone Poroshell 120 EC C-18 (promjer čestica 2,7 µm, unutrašnjeg promjera 4,6 x 100 mm) s pretkolonom Poroshell 120 EC C-18 (4,6 mm) (Agilent, Santa Clara, SAD) u kojoj je mobilna faza A bila fosfatna kiselina (0,1 % u vodi), dok je mobilna faza B bio metanol (100%) realiziran je proces razdvajanja polifenola. Uzorci su injektirani u volumenu od 10 µl, s protokom mobilnih faza od 0,5 ml/min. 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. Fenolne kiseline identificirane su usporedbom UV/Vis spektara fenolnih kiselina sa spektrima autentičnih standarda i usporedbom vremena zadržavanja, dok su za kvantifikaciju korištene kalibracijske krivulje pripremljene analiziranjem različitih koncentracija autentičnih standarda.

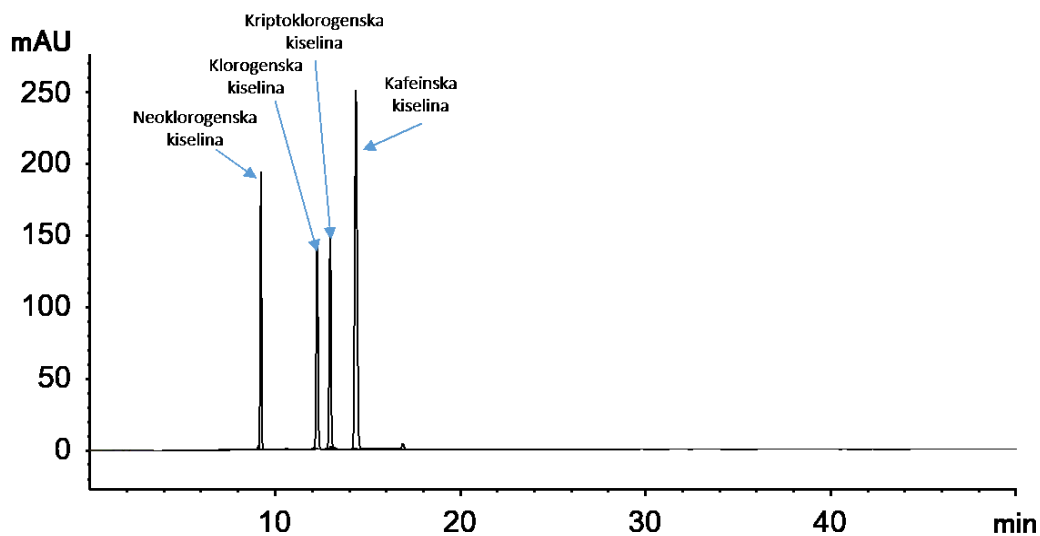


### **3.2.10. Statistička obrada podataka**

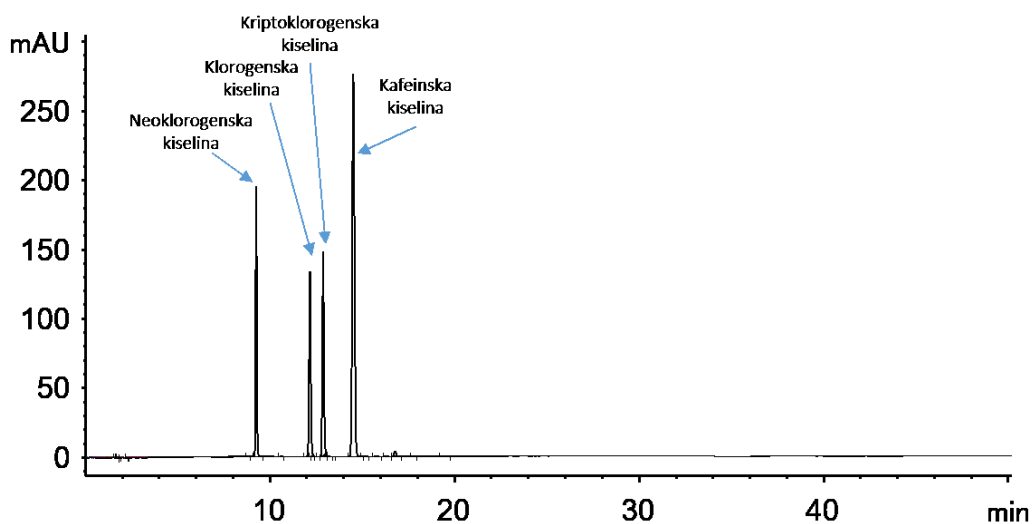
Klorogenske i kafeinska kiselina za inkubaciju u simuliranim otopinama elektrolita (0 h i 4 h) pripremljene su jednom i analizirane jednom na HPLC uređaju (n=1). Dva ekstrakta jabuke su pripremljena postupkom kemijske i enzimske ekstrakcije, svaki ekstrakt analiziran je dva puta na HPLC uređaju (n=4). Postupak simulirane probave proveden je dva puta, svaki analiziran jednom na HPLC-u (n=2). Rezultati su nakon analize na RP-HPLC-u prikazani kao srednja vrijednosti  $\pm$  standardno odstupanje.

## **4. REZULTATI**

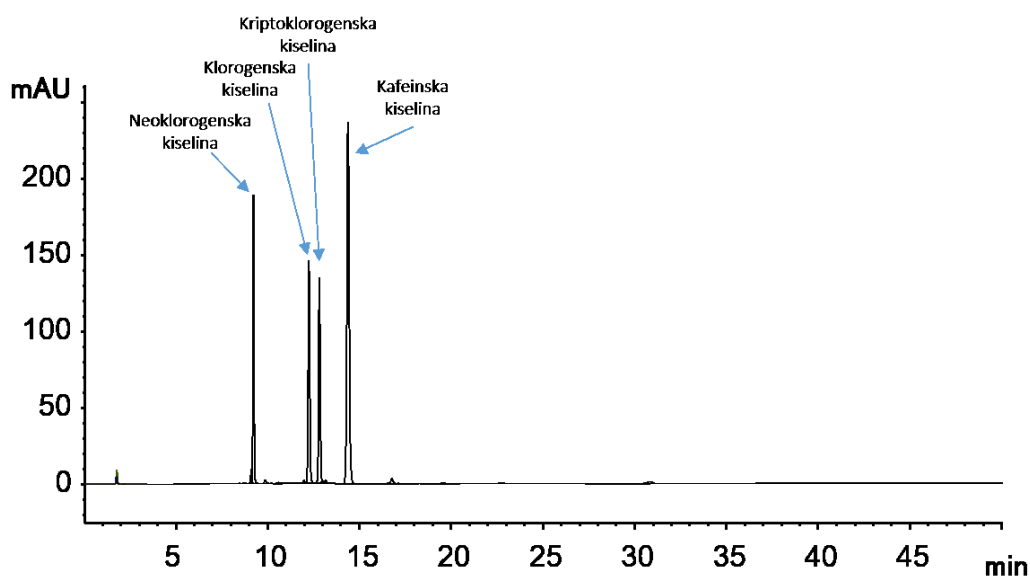
#### 4.1. Kromatogrami i UV/Vis spektri klorogenskih i kafeinske kiseline u simuliranim otopinama elektrolita



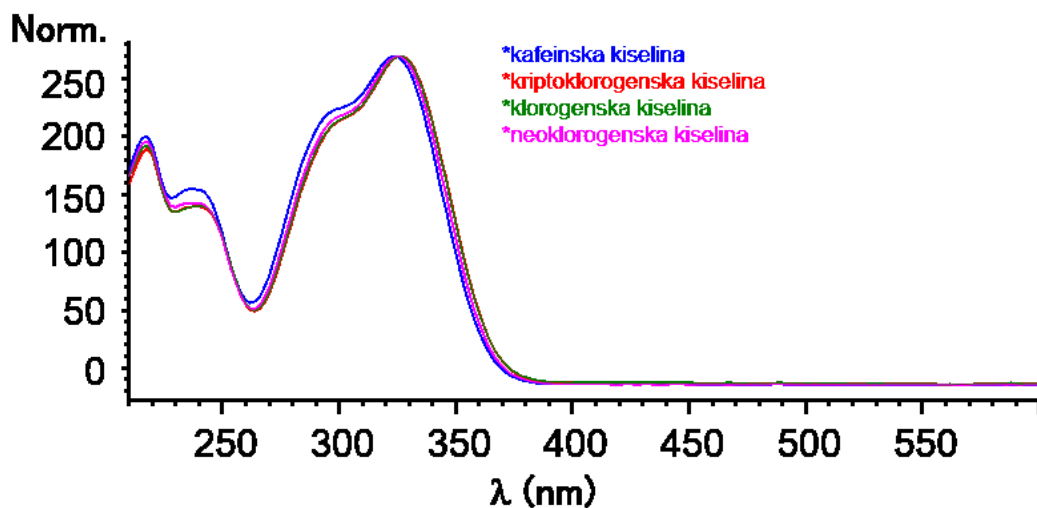
**Slika 9** Preklopljeni kromatogrami klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u ustima snimani na 320 nm ( $t=0$  min)



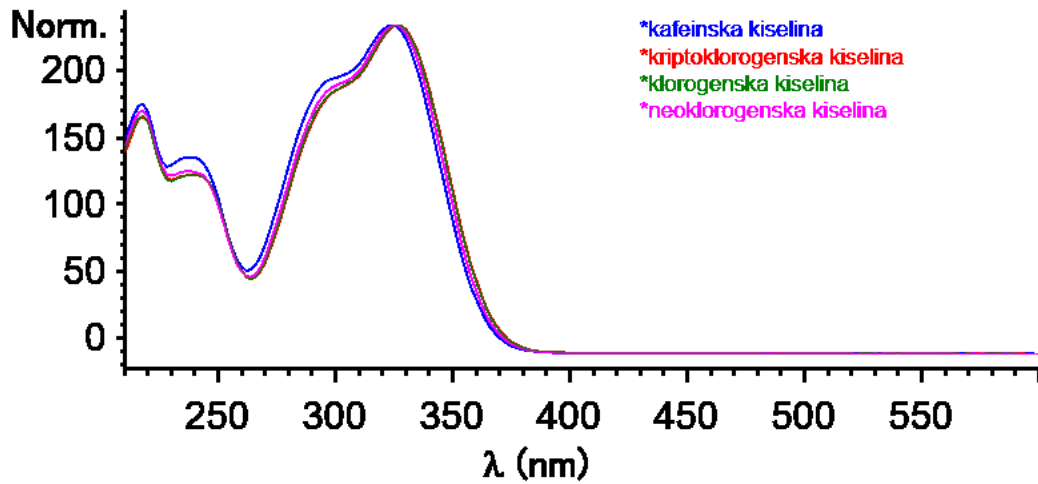
**Slika 10** Preklopljeni kromatogrami klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u želudcu snimani na 320 nm ( $t=0$  min)



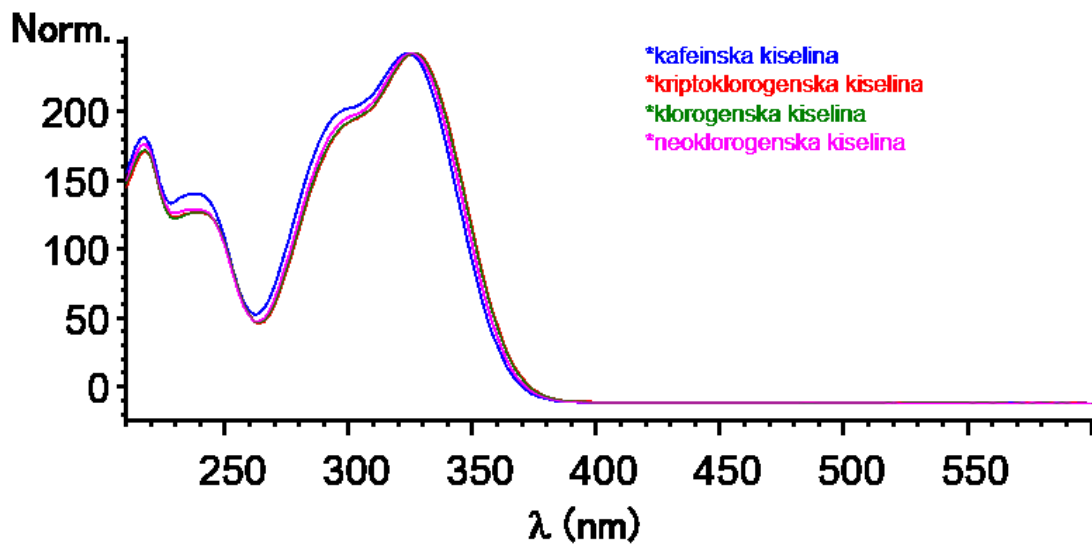
**Slika 11** Preklapljeni kromatogrami klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u tankom crijevu snimani na 320 nm ( $t=0$  min)



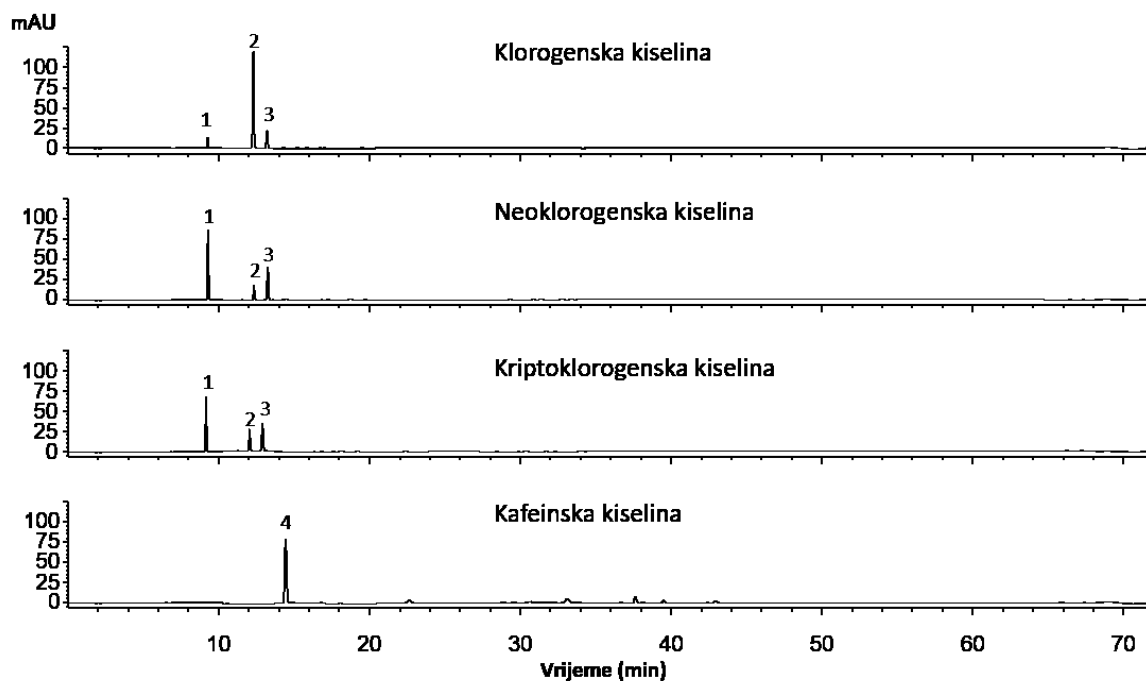
**Slika 12** UV/Vis spektri klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u ustima ( $t=0$  min)



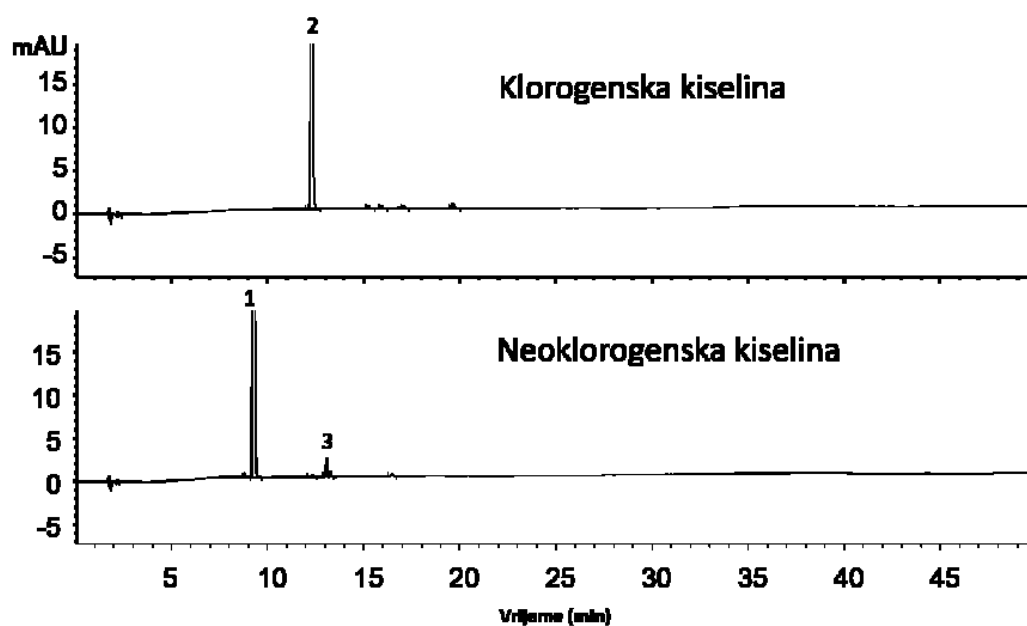
Slika 13 UV/Vis spektri klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u želudcu ( $t=0$  min)



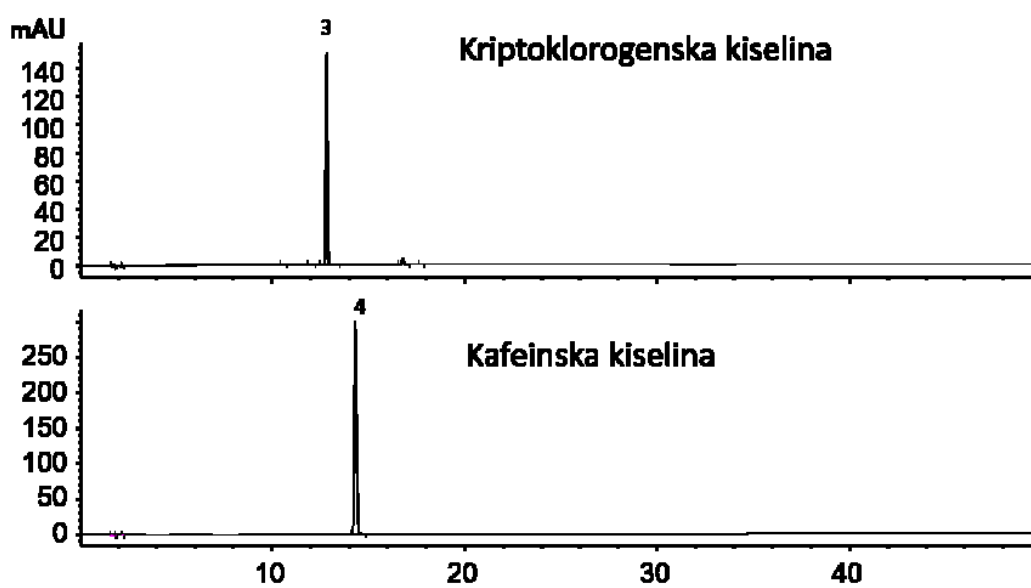
Slika 14 UV/Vis spektri klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u tankom crijevu ( $t=0$  min)



**Slika 15** Kromatogrami klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u ustima nakon 4 h inkubacije na 37 °C snimani na 320 nm. 1 – neoklorogenska kiselina, 2 – klorogenska kiselina, 3 – kriptoklorogenska kiselina, 4 – kafeinska kiselina

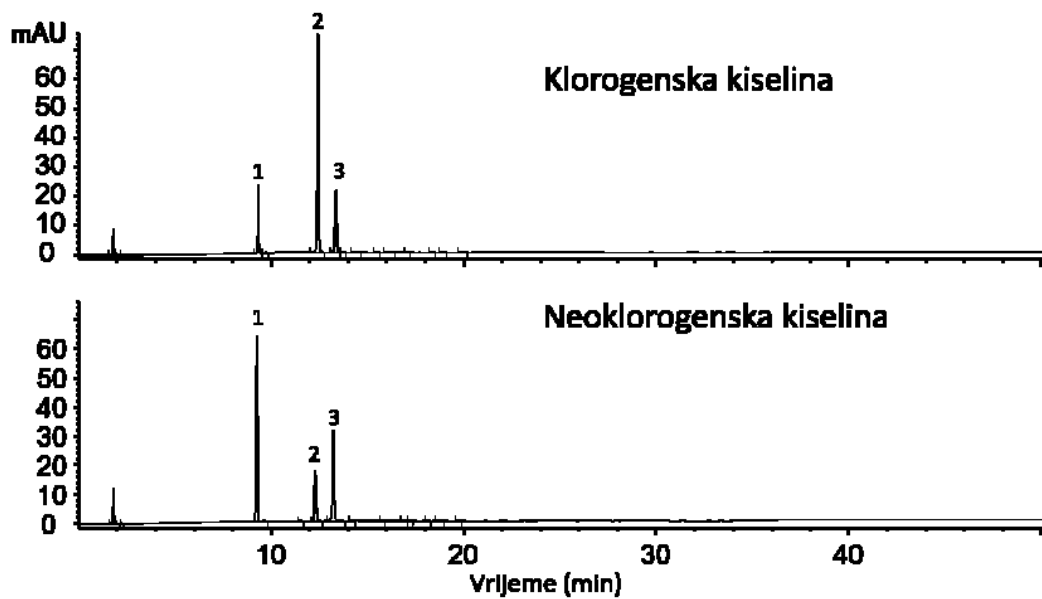


a)

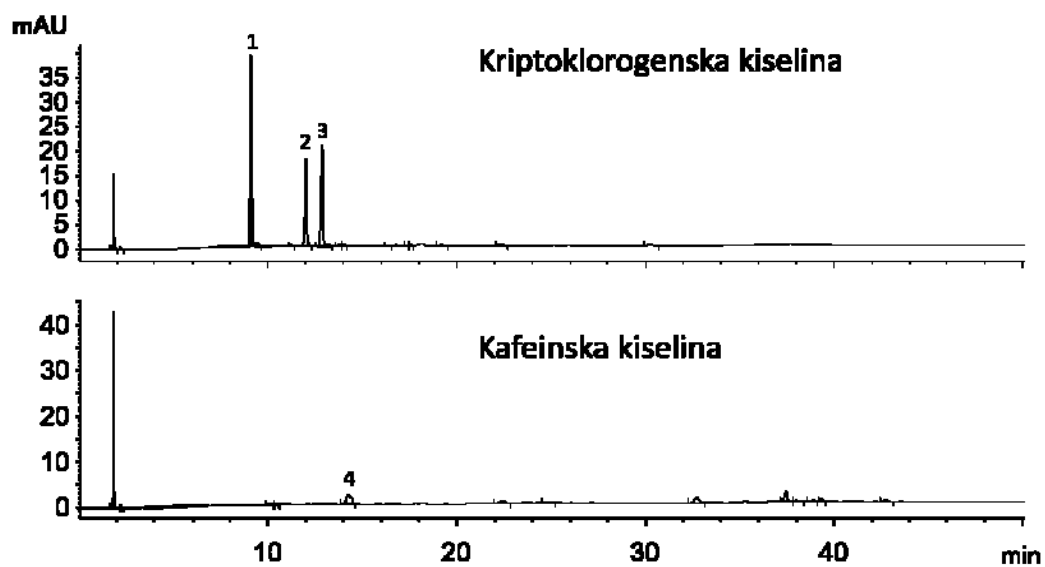


b)

**Slika 16** Kromatogrami a) klorogenske i neoklorogenske, b) kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u želudcu nakon 4 h inkubacije na 37 °C snimani na 320 nm. 1 – neoklorogenska kiselina, 2 – klorogenska kiselina, 3 – kriptoklorogenska kiselina, 4 – kafeinska kiselina



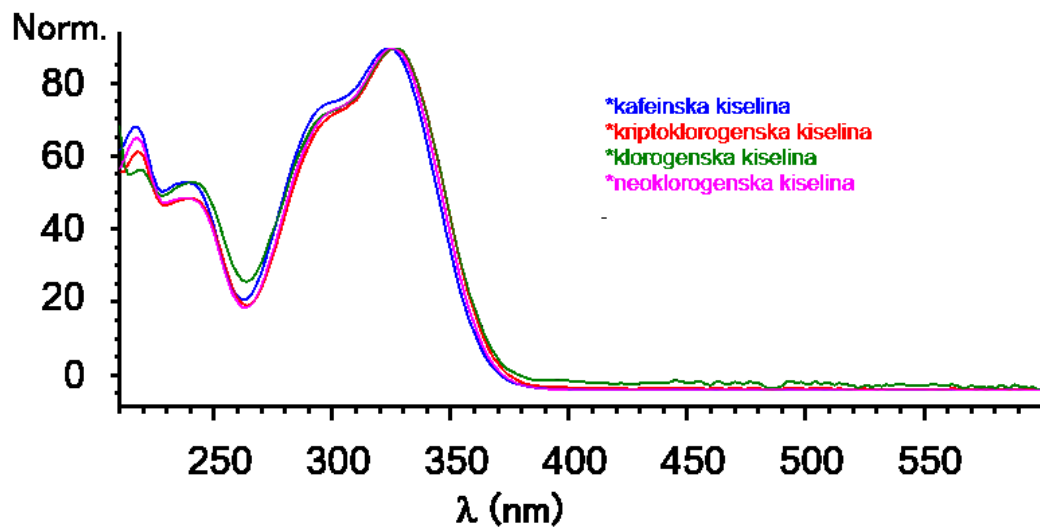
a)



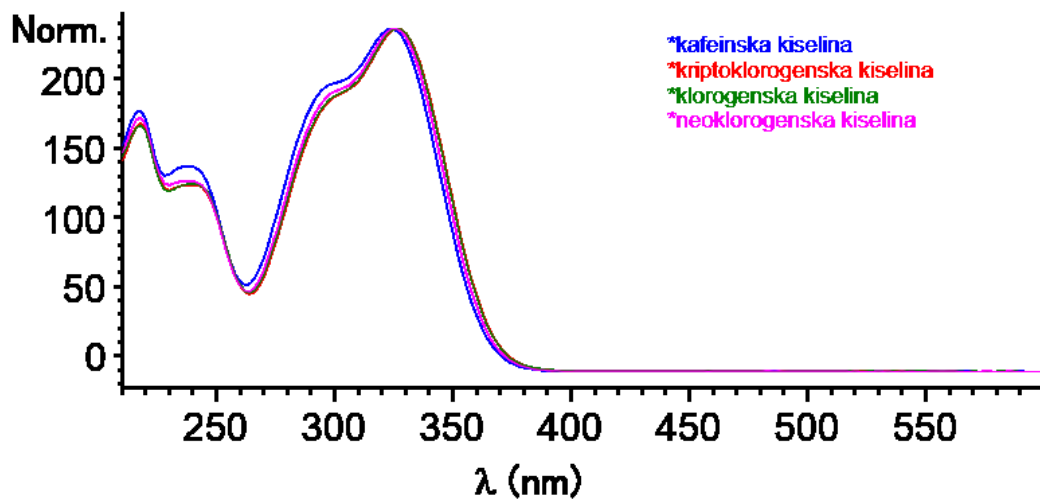
b)

**Slika 17** Kromatogrami a) klorogenske i neoklorogenske, b) kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u tankom crijevu nakon 4 h inkubacije na 37 °C snimani na 320 nm. 1 – neoklorogenska kiselina, 2 – klorogenska kiselina, 3 – kriptoklorogenska kiselina, 4 – kafeinska kiselina

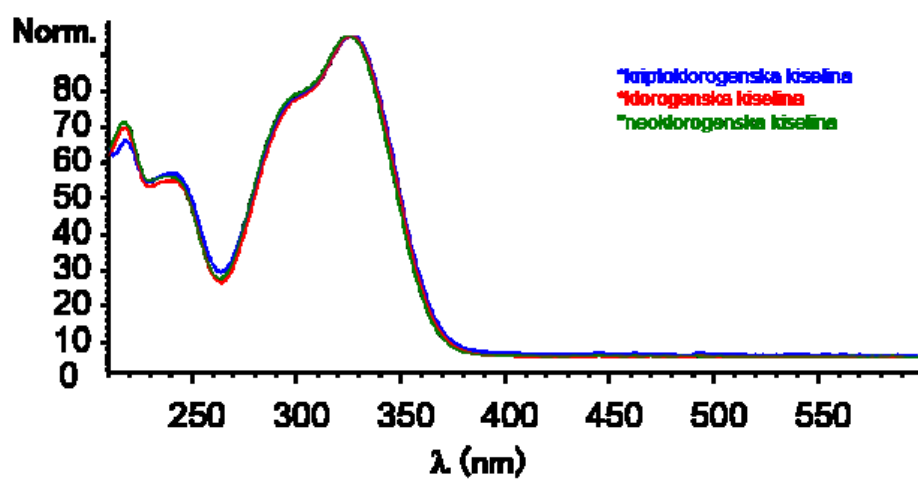




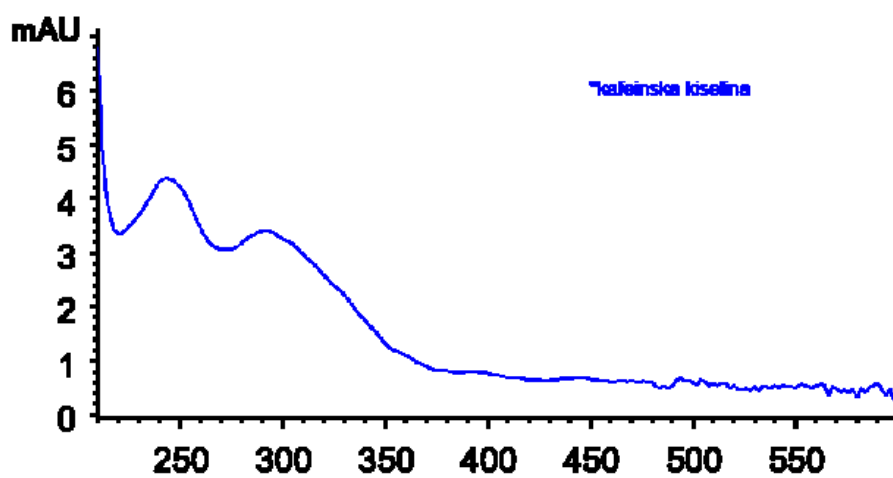
**Slika 18** UV/Vis spektri klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u ustima nakon 4 h inkubacije na 37 °C



**Slika 19** UV/Vis spektri klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u želudcu nakon 4 h inkubacije na 37 °C



a)



b)

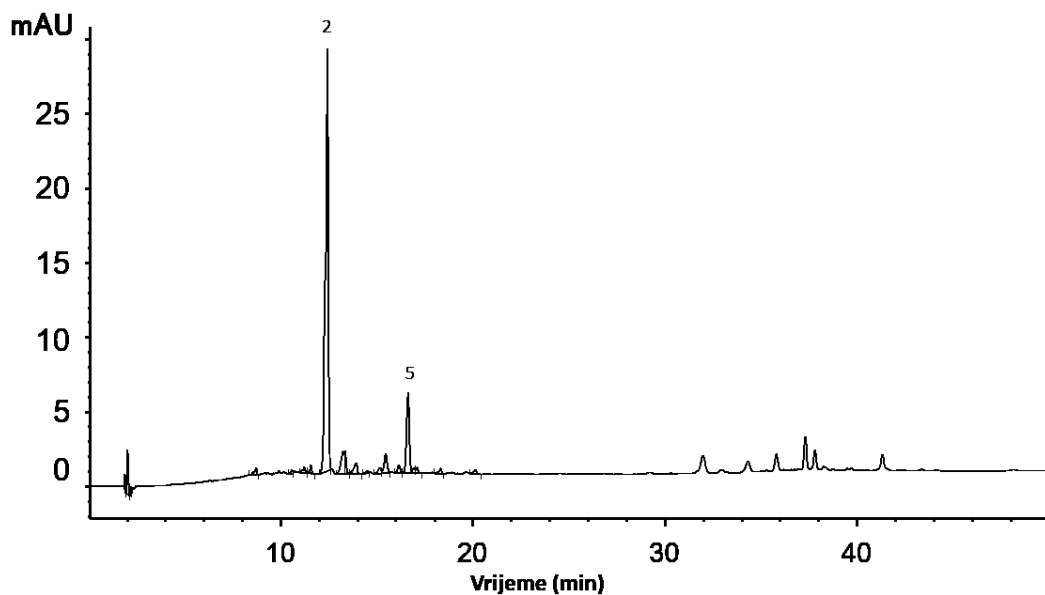
**Slika 20** UV/Vis spektri a) klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i b) kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u tankom crijevu nakon 4 h inkubacije na 37 °C

## 4.2. Promjene u klorogenskim i kafeinskoj kiselini tijekom 4 sata inkubacije

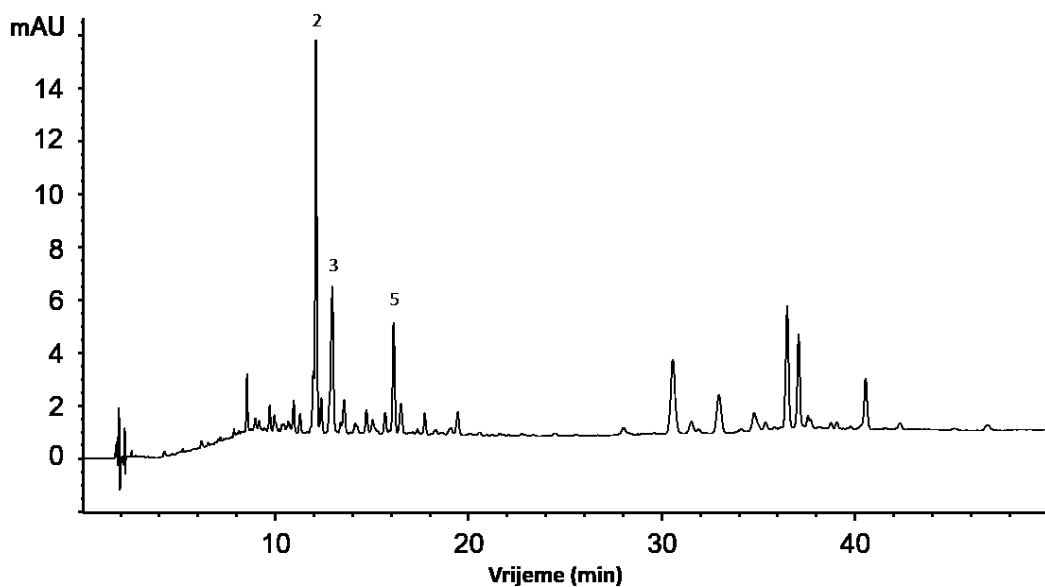
**Tablica 1** Promjene u klorogenskim i kafeinskoj kiselini tijekom 4 sata inkubacije u otopinama elektrolita za simuliranu probavu. Promjene su izražene u %

	Vrijeme h	neoklorogenska kiselina	klorogenska kiselina	kriptoklorogenska kiselina	kafeinska kiselina	Ukupno
<b>Klorogenska kiselina</b>						
Simulirana tekućina usta	0		100,0			100,0
	4	6,5	78,0	14,4		98,9
simulirana tekućina želudca	0		100,0			100,0
	4		106,5			106,5
simulirana tekućina tankog crijeva	0		100,0			100,0
	4	11,2	52,9	15,2		79,3
<b>Neoklorogenska kiselina</b>						
Simulirana tekućina usta	0	100,0				100,0
	4	43,7	13,0	30,5		87,2
Simulirana tekućina želudca	0	100,0				100,0
	4	114,5		1,6		116,1
Simulirana tekućina tankog crijeva	0	100,0				100,0
	4	33,4	12,8	24,1		70,3
<b>Kriptoklorogenska kiselina</b>						
Simulirana tekućina usta	0			100,0		100,0
	4	29,5	16,6	22,9		69,0
Simulirana tekućina želudca	0			100,0		100,0
	4			100,6		100,6
Simulirana tekućina tankog crijeva	0			100,0		100,0
	4	19,5	12,8	15,5		47,8
<b>Kafeinska kiselina</b>						
Simulirana tekućina usta	0				100,0	100,0
	4				30,3	30,3
Simulirana tekućina želudca	0				100,0	100,0
	4				103,2	103,2
Simulirana tekućina tankog crijeva	0				100,0	100,0
	4				1,4	1,4

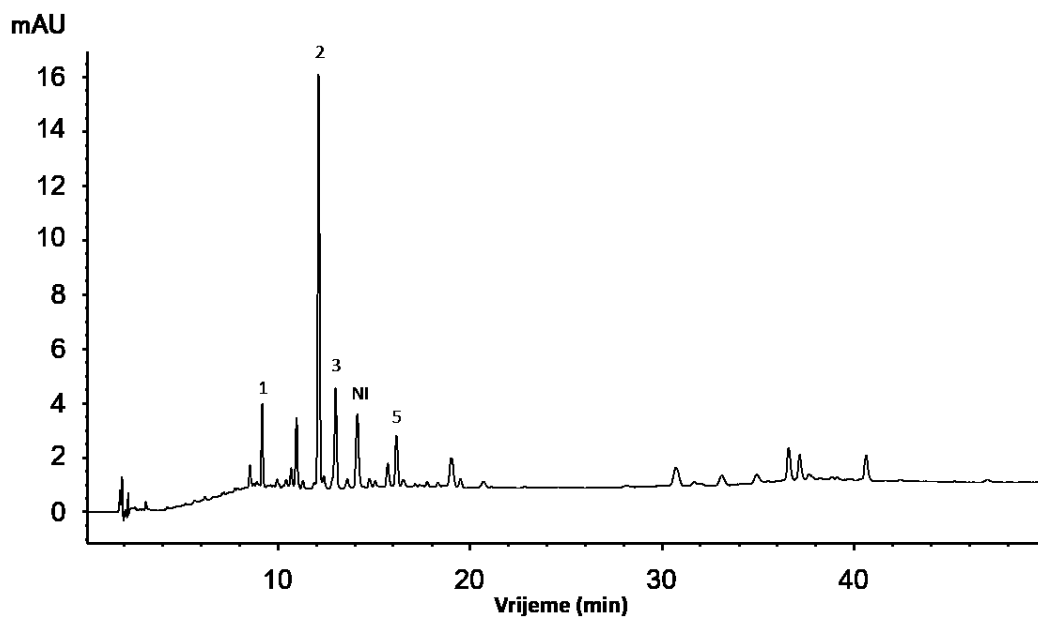
### 4.3. Simulirana probava jabuke



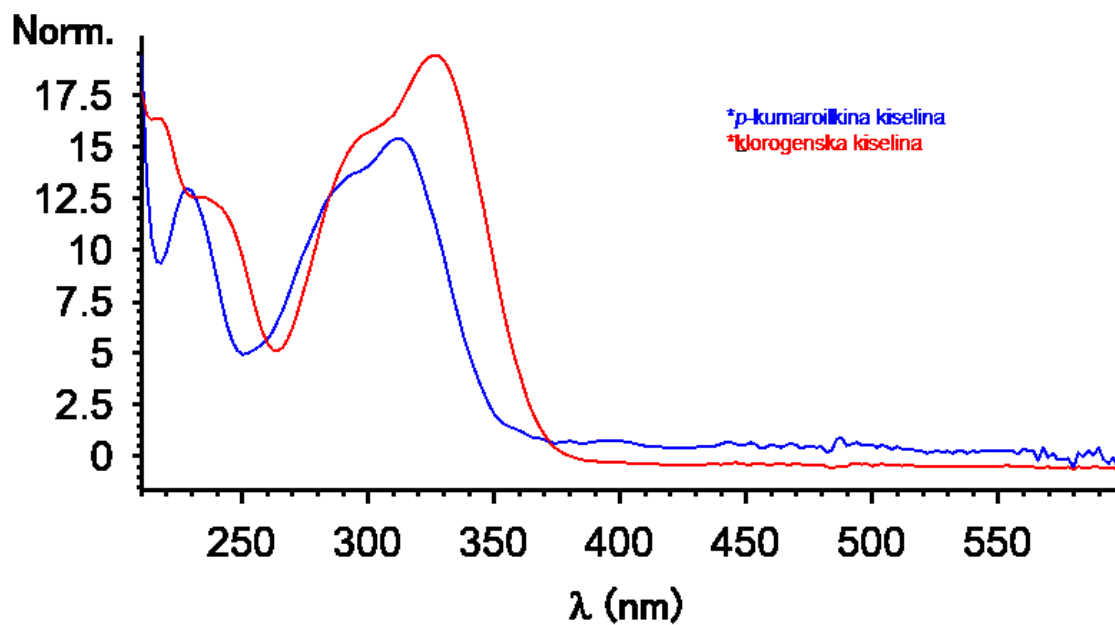
**Slika 21** Kromatogram ekstrakta jabuke prije probave sniman na 320 nm s identificiranim fenolnim kiselinama 2 – klorogenska kiselina, 5 – *p*-kumaroil-kina kiselina



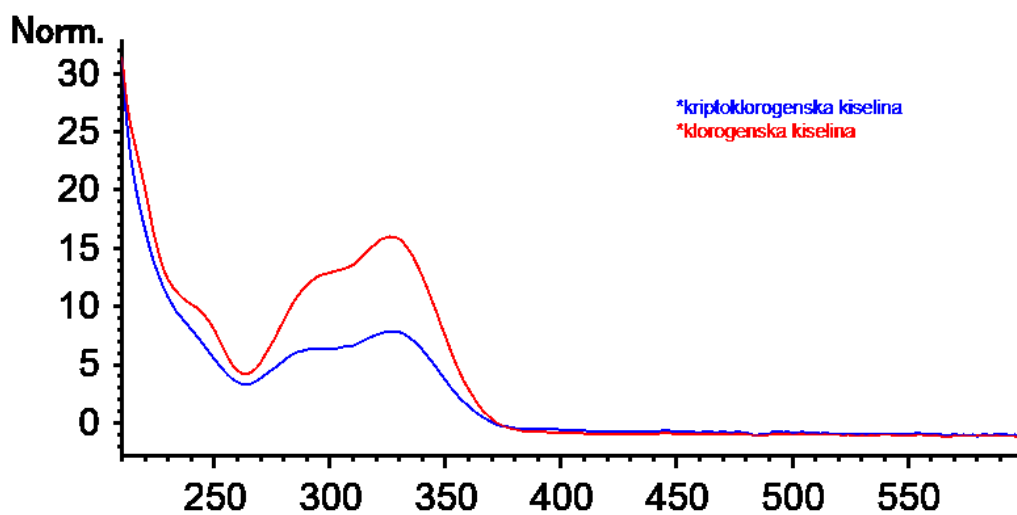
**Slika 22** Kromatogram ekstrakta jabuke nakon probave u želudcu sniman na 320 nm s identificiranim fenolnim kiselinama 2 – klorogenska kiselina, 3 – kriptoklorogenska kiselina, 5 – *p*-kumaroil-kina kiselina



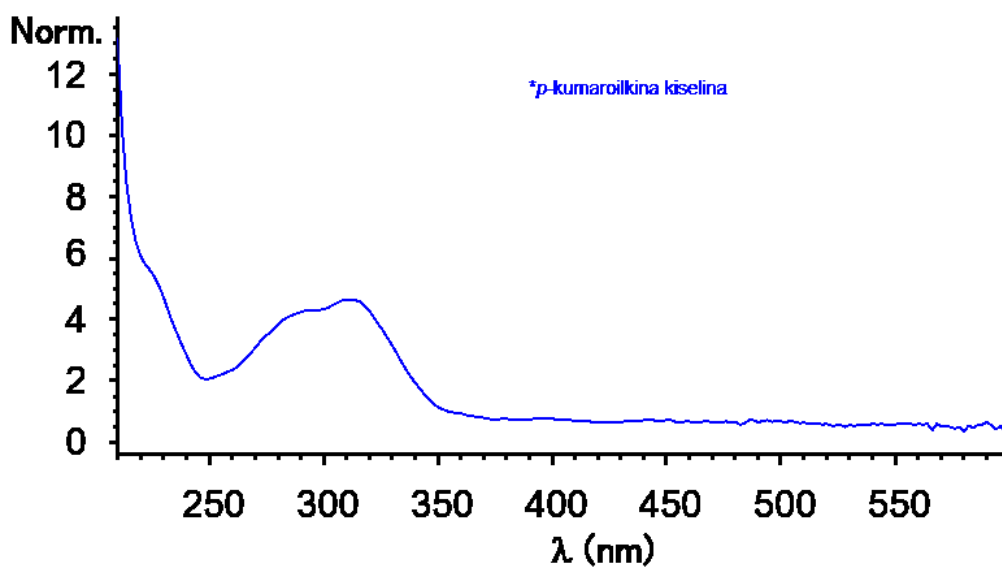
**Slika 23** Kromatogram ekstrakta jabuke nakon probave u tankom crijevu sniman na 320 nm s identificiranim fenolnim kiselinama 1 – neoklorogenska kiselina, 2 – klorogenska kiselina, 3 – kriptoklorogenska kiselina, 5 – *p*-kumaroil-kina kiselina, NI – neidentificirana fenolna kiselina



**Slika 24** UV/Vis spektar klorogenske i *p*-kumaroil-kina kiseline u ekstraktu jabuke nakon kemijske ekstrakcije

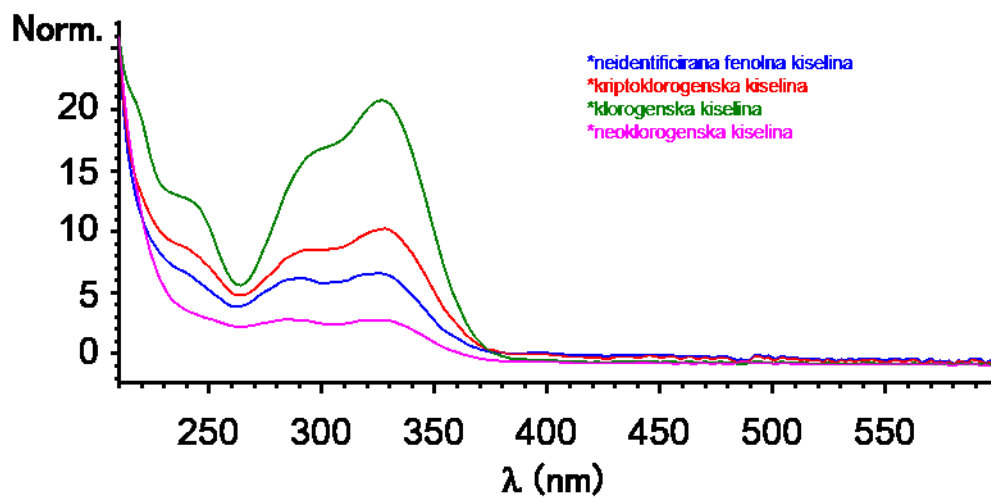


a)

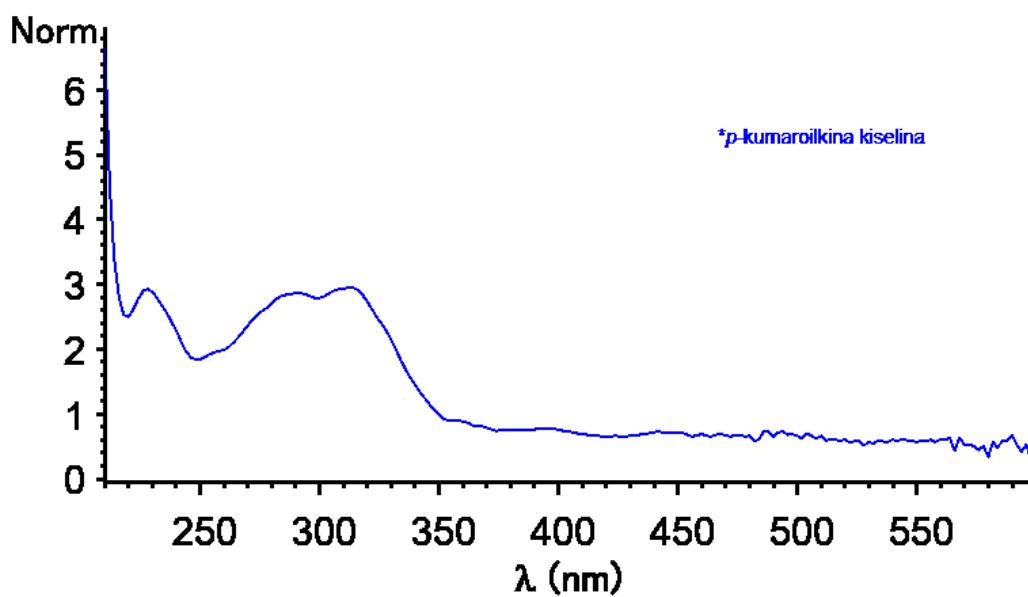


b)

Slika 25 UV/Vis spektri a) klorogenske, kriptoklorogenske i b) *p*-kumaroil-kina kiseline u ekstraktu jabuke nakon probave u želudcu

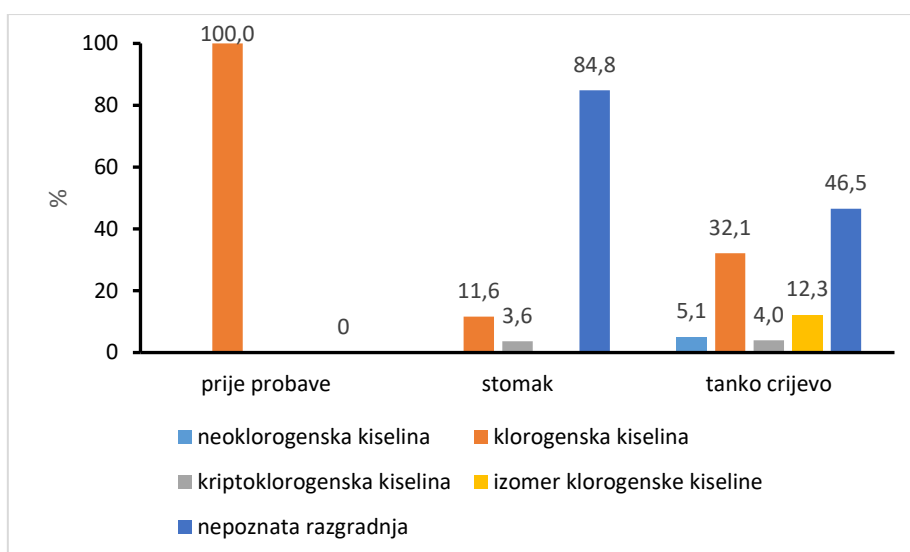


a)

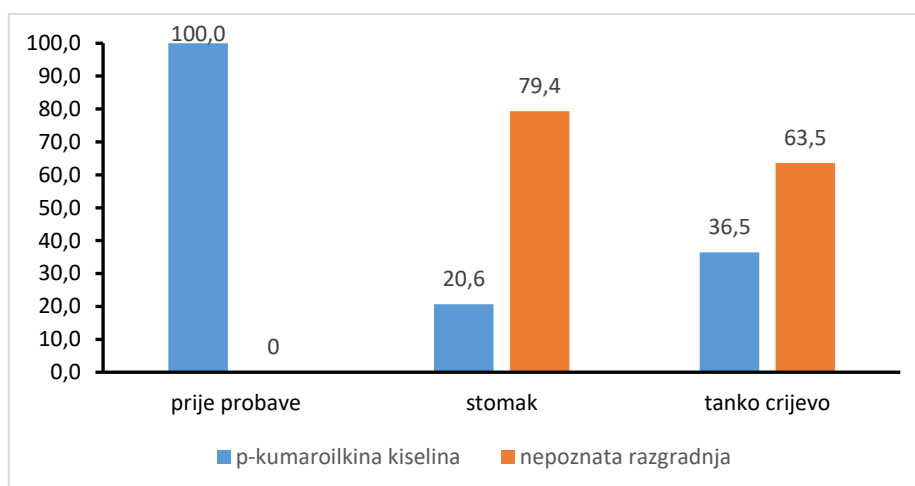


b)

**Slika 26** UV/Vis spektar a) neoklorogenske, klorogenske, kriptoklorogenske, neidentificirane fenolne kiselina i b) *p*-kumaroil-kina kiselina u ekstraktu jabuke nakon probave u tankom crijevu



**Slika 27** Postotno smanjenje količine klorogenske kiseline tijekom probave u odnosu na količinu prije probave (postotci su izračunati s obzirom na određene količine u mg/kg) te razgradnja klorogenske kiseline u stomaku i tankom crijevu



**Slika 28** Postotno smanjenje količine *p*-kumaroil-kina kiseline tijekom probave u odnosu na količinu prije probave (postotci su izračunati s obzirom na određene količine u mg/kg jabuke) te razgradnja *p*-kumaroil-kina kiseline u stomaku i tankom crijevu



## **5. RASPRAVA**

U ranijim istraživanjima pokazalo se da su klorogenske kiseline nestabilne u probavnom procesu. Cilj ovog rada je bio ispitati njihovu stabilnost u simuliranim otopinama elektrolita pri različitim pH vrijednostima u ustima, želudcu i tankom crijevu, te u realnom uzorku nakon simulirane probave.

**Slike 9, 10 i 11** prikazuju kromatograme snimane na 320 nm s pikovima neoklorogenske, klorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u ustima, želudcu i tankom crijevu odmah nakon otapanja. U svakoj simuliranoj otopini elektrolita vidljiv je samo jedan pik: pik fenolne kiseline koja je otopljena u otopini elektrolita. Iako su pH vrijednosti različite u simuliranim otopinama elektrolita za probavu u ustima, želudcu i tankom crijevu (pH 7, 3, 7, redoslijedom), može se predložiti da odmah nakon otapanja nije došlo do vidljivih promjena. Slični rezultati su dobiveni u prethodno istraženom radu za klorogenske kiseline (Franková i sur., 2022).

**Slike 12, 13 i 14** prikazuju UV/Vis spektre klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopinama elektrolita za simuliranu probavu u ustima, želudcu i tankom crijevu odmah nakon otapanja. Sve fenolne kiseline pokazuju maksimum na oko 320 do 330 nm te „shoulder“ na 300 nm što je tipičan spektar ovih kiselina. Nije došlo do promjena u spektrima odmah nakon otapanja kiselina u simuliranim otopinama elektrolita. Klorogenska kiselina i njezini izomeri kvantificirani su pri 320 nm, dok je kafeinska kiselina pokazala svoj maksimum oko 325 nm (Jakobek i sur., 2013; Belay A, 2012).

Nakon ispitivanja kiselina odmah nakon otapanja u simuliranim otopinama, ispitana je njihova stabilnost tijekom inkubacije 4 h na 37 °C, u simuliranim otopinama usta, želuca i tankog crijeva. **Slika 15** prikazuje kromatograme klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u ustima nakon inkubacije pri 37°C, 4 h. Vidljiva je degradacija svih klorogenskih kiselina. Nakon inkubacije klorogenske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u ustima pojavili su se pikovi neoklorogenske i kriptoklorogenske kiseline zajedno s izvornom klorogenskom koja ima najveći pik. Nakon inkubacije neoklorogenske kiseline, vidljivi su pikovi klorogenske i kriptoklorogenske kiseline, uz izvornu neoklorogensku. Kriptoklorogenska kiseline se nakon inkubacije pojavljuje kao izvorna kriptoklorogenska, ali uz pojavu klorogenske i neoklorogenske kiseline. Kafeinska kiselina nakon inkubacije nije pokazala prisustvo drugih kiselina. Prisutnost svih izvornih spojeva, uz pojavu dodatnih u simuliranoj otopini usta,

ukazuje na izomerizaciju klorogenskih kiselina. Izomerizacija je kemijski proces koji prevodi određeni spoj u njegov optički ili geometrijski izomer. Da li će neki kemijski spoj imati blagotvorne učinke ovisi o njegovim izomernim oblicima (Gorain i sur., 2018).

**Slika 16** prikazuje kromatograme klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u želudcu nakon inkubacije pri 37°C, 4 h. Nakon inkubacije klorogenske kiseline, i dalje je prisutna samo klorogenska kiselina u otopini. Neoklorogenska kiselina je nakon inkubacije izomerizacijom prešla i u kriptoklorogensku kiselinu što je vidljivo pojavom pika kriptoklorogenske kiseline. Nakon inkubacije kriptoklorogenske i kafeinske kiseline, u otopini su vidljive samo izvorne kiseline, bez dodatnih pikova. U usporedbi s kromatogramima snimljenim odmah nakon otapanja u otopini elektrolita za simuliranu probavu u želudcu, nakon inkubacije 4 h u otopini koja simulira elektrolite želuca, vidljivi su isti izvorni pikovi fenolnih kiselina, osim kod neoklorogenske kiseline, gdje se uz izvorni pik pokazuje pik kriptoklorogenske kiseline. Može se predložiti veća stabilnost klorogenskih i kafeinske kiseline na pH želuca (pH 3). Stabilnost klorogenske kiseline nakon probave u želudcu predložena je i ranijim istraživanjem (Liu i sur., 2020).

**Slika 17** prikazuje kromatograme klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopini elektrolita za simuliranu probavu u tankom crijevu nakon inkubacije pri 37°C, 4 h. Na ovim kromatogramima vidljive su promjene kod svih ispitivanih kiselina. Klorogenska kiselina izomerizacijom je prešla u neoklorogensku i kriptoklorogensku kiselinu što je vidljivo pojavom pikova ove tri kiseline nakon 4 h inkubacije. Neoklorogenska kiselina prešla je izomerizacijom u preostale dvije: klorogensku i kriptoklorogensku kiselinu, uz prisutnost i izvorne kiseline. Slično tome, kriptoklorogenska je izomerizacijom prešla u klorogensku i neoklorogensku, uz prisutnost izvorne kiseline. Kafeinska kiselina je gotovo nestala nakon 4 h inkubacije.

**Slike 18, 19 i 20** prikazuju UV/Vis spektar klorogenske, neoklorogenske, kriptoklorogenske i kafeinske kiseline u otopinama elektrolita za simuliranu probavu u ustima, želudcu i tankom crijevu nakon 4 h inkubacije na 37 °C. Maksimum spektra za sve četiri kiseline je bio između 320 i 330 nm, sa „shoulderom“ na oko 300 nm u otopinama za simuliranu probavu u ustima, želucu i tankom crijevu nakon 4 h inkubacije. Ovo su tipični UV/Vis spektri kiselina što dodatno dokazuje njihovu identifikaciju. UV/vis spektar kafeinske kiseline nakon

inkubacije u simuliranoj otopini tankog crijeva nešto je slabije izražen, vjerojatno zbog male koncentracije kafeinske kiseline pronađene nakon inkubacije.

Na izomerizaciju klorogenskih kiselina vjerojatno je utjecala pH vrijednost simuliranih otopina u ustima i tankom crijevu. pH vrijednost u ovim otopinama bila je 7. Ovo je slično zaključcima ranijih istraživanja (Narita i Inouye, 2013) koja su istaknula izomerizaciju klorogenske kiseline na različitim pH vrijednostima. U ispitivanju degradacije klorogenskih kiselina na različitim pH vrijednostima (pH 5 do 9), pokazalo se da klorogenska kiselina degradira u kriptoklorogensku kiselinu na pH 5 i 5,5, dok se na pH 6 do 9, uz kriptoklorogensku kiselinu pojavila i neoklorogenska kiselina (Narita i Inouye, 2013), isto kao i u ovom radu. No, u ovom radu pokazalo se da se i kriptoklorogenska i neoklorogenska kiselina transformiraju u ostale izomerne oblike. Nadalje, razgradnja kafeinske kiseline pri pH 7 vjerojatno je rezultat oksidacije (Narita i Inouye, 2013).

**Tablica 1** prikazuje postotne promjene u klorogenskim i kafeinskoj kiselini nakon 4 sata inkubacije u otopinama elektrolita za simuliranu probavu. U otopinama elektrolita za simuliranu probavu u ustima i tankom crijevu, s pH vrijednostima 7, preostalo je 53 do 78 % klorogenske kiseline, a kao rezultat izomerizacije nastalo je 7 do 11 % neoklorogenske te 14 do 15 % kriptoklorogenske kiseline. U istim otopinama elektrolita nakon 4 h inkubacije neoklorogenske kiseline, preostalo je 33 do 44 % neoklorogenske kiseline, a kao rezultat izomerizacije pojavilo se 13 % klorogenske kiseline i 24 do 31 % kriptoklorogenske kiseline. Inkubacija kriptoklorogenske kiseline u vremenu od 4 h u istim otopinama rezultirala je zaostatkom samo 16 do 23 % kriptoklorogenske kiseline, a izomerizacijom je nastalo 20 do 30 % neoklorogenske i 13 do 17 % klorogenske kiseline. Prema ovim rezultatima može se reći da se sve tri klorogenske kiseline izomerizacijom transformiraju u svoje izomere. No ipak je između ove tri kiseline, klorogenska kiselina pokazala nešto veću stabilnost jer je nakon 4 h inkubacije preostalo najviše kiseline u izvornom obliku.

Osim izomerizacije, moguća je i degradacija klorogenskih kiselina u simuliranim otopinama elektrolita za usta i tanko crijevo. To se može vidjeti prema ukupnom postotku svih pronađenih izomera nakon 4 h inkubacije. Nakon izomerizacije klorogenske kiseline, ukupan postotak svih izomera iznosio je 79 do 99 %, dok je taj postotak za neoklorogensku kiselinu (70 do 87 %) te kriptoklorogensku kiselinu (48 do 69 %) manji. Moguće je da je ostatak do 100 % kiselina degradiran u nepoznate produkte.

Nakon inkubacije u otopinama elektrolita za simuliranu probavu u ustima i tankom crijevu, s pH vrijednostima 7, kafeinske kiseline je u izvornom obliku preostalo samo 1 do 30 % (**Tablica 1**). Degradacija kafeinske kiseline posebno je bila vidljiva u simuliranoj otopini elektrolita za tanko crijevo.

Da bi se dobio uvid u ponašanje klorogenskih kiselina u realnom uzorku, provedena je simulirana probava jabuke, a nakon probave u želudcu i tankom crijevu, određene su količine oslobođenih fenolnih kiselina.

**Slika 21** prikazuje kromatogram ekstrakta jabuke prije probave koji je sniman na 320 nm s identificiranim fenolnim kiselinama. Identificirane su klorogenska i *p*-kumaroil-kina kiselina. Identifikacija fenolnih kiselina u jabuci slaže se s ranijim istraživanjima (Jakobek i sur., 2020; Jakobek i sur., 2022; Feliciano i sur., 2010). Na **slici 22** prikazan je kromatogram ekstrakta jabuke nakon probave u želudcu. U usporedbi s identificiranim fenolnim kiselinama prije probave, nakon probave u želudcu je uz iste kiseline, klorogensku i *p*-kumaroil-kina kiselinu, identificirana i kriptoklorogenska kiselina. **Slika 23** prikazuje kromatogram ekstrakta jabuke nakon probave u tankom crijevu. I ovdje su uz iste kiseline, klorogensku i *p*-kumaroil-kina kiselinu, identificirane i druge kiseline: neoklorogenska, kriptoklorogenska te neidentificirana fenolna kiselina. Vidljivo je da prolaskom jabuke kroz fazu probave dolazi do izomerizacije klorogenske kiseline koja je pokazana i u modelnim otopinama.

UV/Vis spektri potvrđuju identifikaciju fenolnih kiselina jabuke prije probave (**Slika 24**), nakon probave u želudcu (**Slika 25**) te tankom crijevu (**Slika 26**). Sve klorogenske kiseline pokazale su maksimum na UV/Vis spektru oko 320 do 340 nm, sa „shoulderom“ na oko 280 do 300 nm, dok je maksimum *p*-kumaroil-kina kiselina između 310 i 320 nm. Ovi spektri odgovaraju spektrima autentičnih spojeva. Osim toga, prikazan je spektar neidentificirane fenolne kiseline koja ima maksimum pri 320 do 330 nm sa shoulderom, što bi moglo ukazivati na novi izomer klorogenske kiseline.

Postotno smanjenje količina klorogenske kiseline iz jabuke tijekom probave u želudcu i tankom crijevu prikazano je na **Slici 27**. U usporedbi s količinom klorogenske kiseline iz jabuke prije probave (100 %), nakon probave u želudcu pronađeno je samo 12 % klorogenske kiseline, a izomerizacija je rezultirala pojavom 4 % kriptoklorogenske kiseline. Može se predložiti da se klorogenska kiselina oslobađa u želudcu, jedan dio prelazi u kriptoklorogensku kiselinu, dok preostali dio klorogenske kiseline možda još nije oslobođen iz matriksa hrane. U tankom

crijevu 32 % klorogenske kiseline se oslobodi, dok izomerizacijom nastaje 5 % neoklorogenske, 4 % kriptoklorogenske, te 12 % nepoznatog izomera. 47 % klorogenske kiseline se ili nije oslobodilo iz matriksa hrane, ili se dogodila degradacija u nepoznate produkte. Ovi rezultati slažu se sa smanjenjem količine klorogenske kiseline iz jabuka u fazi probave u tankom crijevu te predložene izomerizacije (Jakobek i sur., 2021).

**Slika 28** prikazuje postotno smanjenje količine *p*-kumaroil-kina kiseline tijekom probave u odnosu na količinu prije probave u želudcu i tankom crijevu. Vidljivo je da je koncentracija *p*-kumaroil-kina kiseline manja u želucu (21 %) i tankom crijevu (37 %) vjerojatno jer se sva kiselina nije oslobodila iz matriksa hrane ili se dogodila razgradnja kiseline.

## **6. ZAKLJUČAK**

Na temelju rezultata istraživanja sljedeći zaključci su izneseni:

1. Iako su pH vrijednosti različite u simuliranim otopinama elektrolita za probavu u ustima, želudcu i tankom crijevu (pH 7, 3, 7, redosljedom), odmah nakon otapanja nije došlo do vidljivih promjena na klorogenskim i kafeinskoj kiselini.
2. U otopini elektrolita za simuliranu probavu u ustima (pH 7) nakon inkubacije (37°C, 4 h), vidljiva je izomerizacija svih klorogenskih kiselina, dok kafeinska kiselina nije pokazala prisustvo drugih kiselina. U otopini elektrolita za simuliranu probavu u želudcu (pH 3) klorogenske i kafeinska kiselina pokazale su stabilnost. U otopini elektrolita za simuliranu probavu u tankom crijevu nakon inkubacije (37°C, 4 h) klorogenske kiseline su izomerizacijom prešle u svoja dva izomera, dok je kafeinska kiselina gotovo nestala.
3. Pokazalo se da se pri pH 7 klorogenska, kriptoklorogenska i neoklorogenska kiselina transformiraju u svoje izomerne oblike. Kafeinska kiselina se degradira u nepoznate produkte razgradnje.
4. U otopinama elektrolita za simuliranu probavu u ustima i tankom crijevu (pH 7) nakon inkubacije 4 h postotna raspodjela bila je kako slijedi: nakon inkubacije klorogenske kiseline (53 - 78 % klorogenske, 7 - 11 % neoklorogenske, 14 - 15 % kriptoklorogenske kiseline), nakon inkubacije neoklorogenske (33 do 44 % neoklorogenske, 13 % klorogenske, 24 - 31 % kriptoklorogenske kiseline), nakon inkubacije kriptoklorogenske (16 do 23 % kriptoklorogenske, 20 - 30 % neoklorogenske i 13 - 17 % klorogenske kiseline). Kafeinske kiseline je u izvornom obliku preostalo samo 1 - 30 %.
5. U jabuci su identificirani: prije probave klorogenska i *p*-kumaroil-kina kiselina nakon probave u želudcu iste kiseline uz kriptoklorogensku, nakon probave u tankom crijevu iste kiseline te neoklorogenska, kriptoklorogenska i neidentificirana fenolna kiselina.
6. Prolaskom jabuke kroz fazu probave dolazi do izomerizacije klorogenske kiseline koja je pokazana i u modelnim otopinama.



## **7. LITERATURA**

- Amawi H, Ashby JCR, Samuel T, Peraman R, Tiwari KA: Polyphenolic nutrients in cancer chemoprevention and metastasis: Role of the epithelial-to-mesenchymal (EMT) Pathway. *Nutrients* 9:911, 2017.
- Belay A: Self-association, sodium ion complexation and optical transition probabilities of caffeic acid determined spectrophotometrically. *Journal of Biological Physics and Chemistry*, 12:23–28, 2012.
- Belščak-Cvitanović A, Durgo K, Huđek A, Bačun-Družina V, Komes D: 1-Overview of polyphenols and their properties. U *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*, str.3-44. Woodhead Publishing, Cambridge 2018.
- 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.
- Birková A, Hubková B, Bolerázská B, Mareková M, Čižmárová B: Caffeic acid: a brief overview of its presence, metabolism, and bioactivity. *Bioactive Compounds in Health and Disease* 3:74-81, 2020.
- Bravo L: Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutritional Reviews* 56:317-333, 1998.
- Feliciano RP, Antunes C, Ramos A, Serra AT, Figueira ME, Duarte CMM, Carvalho A, 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, Yi J, Li X, Wu X, Zhao Y, Ma Y, Bi J: 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.
- Franková H, Musilová J, Árvay J, Šnirc M, Jančo I, Lidiková J, Vollmannová A: Changes in Antioxidant Properties and Phenolics in Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas* L.) Due to Heat Treatments. *Molecules*, 27(6):1884, 2022.

- Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Rémésy C, Scalbert A: Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *Journal of Nutrition* 133:1853-9, 2003.
- Gorain B, Choudhury H, Pandey M, Madheswaran T, Kesharwani P, Tekade RK: Chapter 11 - Drug–Excipient Interaction and Incompatibilities. U *Dosage Form Design Parameters*, str. 363-402. Elsevier Inc., 2018.
- Jakobek L, García-Villalba R, Tomás-Barberán FA: Polyphenol characterization of old local apple varieties from southeastern european region. *Journal of Food Composition and Analysis*,31:199–211, 2013.
- Jakobek L, Ištuk J, Buljeta I, Voća S, Žlabuc JŠ, Baboljević MS: 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 b-glucan during in vitro simulated digestion. *Food Chemistry* 363:130283, 2021.
- Jakobek L, Strelec I, Kenjerić D, Šoher L, Tomac I, Matić P: Simulated gastric and intestinal fluid electrolyte solutions as an environment for the adsorption of apple polyphenols onto  $\beta$ -Glucan. *Molecules* 27:6683, 2022.
- Kumar N, Goel N: Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports* 4:e0037, 2019.
- Liu D, Dhital S, Wu P, Chen XD, Gidley MJ: In vitro digestion of apple tissues using a dynamic stomach model: Grinding and crushing effects on polyphenol bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68:574-583, 2020.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez, L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79:727-747, 2004.
- Miao M, Xiang L: Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. *Advances in Pharmacology* 87:71-88, 2020.

- Minekus M, Alming 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, Ménéard 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.
- Narita Y, Kuniyo Inouye: Degradation Kinetics of Chlorogenic Acid at Various pH Values and Effects of Ascorbic Acid and Epigallocatechin Gallate on Its Stability under Alkaline Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:966–972, 2013.
- Navarro-Orcajada S, Matencio A, Vicente-Herrero C, García-Carmona F, López-Nicolás JM: Study of the fluorescence and interaction between cyclodextrins and neochlorogenic acid, in comparison with chlorogenic acid. *Scientific Reports* 11:3275, 2021.
- Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, Ahmad F, Babazadeh D, FangFang X, Ghazani FM, WenHua L, XiaoHui Z: Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 97:67-74, 2018.
- Pandey KB, Rizvi SI: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:270-278, 2009.
- Rashmi HB, Negi PS: Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International* 136:109298, 2020.
- Xu JG, Hu QP, Liu Y: Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:11625–11630, 2012.
- Zhao XL, Yu L, Zhang SD, Ping K, Ni HY, Qin XY, Zhao CJ, Wang W, Efferth T, Fu YJ: Cryptochlorogenic acid attenuates LPS-induced inflammatory response and oxidative stress via upregulation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in RAW 264.7 macrophages. *International Immunopharmacology* 83:106436, 2020.

Web 1: <http://phenol-explorer.eu/structures/PE000475/image.png> [25.8.2023].

Web 2: <http://phenol-explorer.eu/structures/PE000467/image.png> [29.8.2023].

Web 3: <http://phenol-explorer.eu/structures/PE000469/image.png> [2.9.2023].

Web 4: <http://phenol-explorer.eu/structures/PE000457/image.png> [5.9.2023].

Web 5: <http://www.vocarstvo-sarcevic.com/proizvodi.php> [15.9.2023].