

# Određivanje in vitro i ex vivo gastrointestinalne stabilnosti glukozinolata iz bijele i smeđe gorušice primjenom simuliranog dvofaznog modela probave

---

**Radinović, Leah**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:262323>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-08**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET  
I  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**LEAH RADINOVIĆ**

**ODREĐIVANJE IN VITRO I EX VIVO GASTROINTESTINALNE  
STABILNOSTI GLUKOZINOLATA IZ BIJELE I SMEĐE  
GORUŠICE PRIMJENOM SIMULIRANOG DVOFAZNOG  
MODELA PROBAVE**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina:**

**2020./2021.**

**Mentor:**

**prof. dr. sc. Tea Bilušić**

**Split, listopad 2021.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET  
I  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**LEAH RADINOVIĆ**

**ODREĐIVANJE IN VITRO I EX VIVO GASTROINTESTINALNE  
STABILNOSTI GLUKOZINOLATA IZ BIJELE I SMEĐE  
GORUŠICE PRIMJENOM SIMULIRANOG DVOFAZNOG  
MODELA PROBAVE**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina:**

**2020./2021.**

**Mentor:**

**prof. dr. sc. Tea Bilušić**

**Split, listopad 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

## DIPLOMSKI RAD

Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet  
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA  
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

<b>Znanstveno područje:</b>	Biomedicinske znanosti
<b>Znanstveno polje:</b>	Farmacija
<b>Nastavni predmet:</b>	Dijetetika
<b>Tema rada</b>	prihvaćena je na 70. sjednici Vijeća integriranog studija Farmacije, 8. sjednici Vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 5. sjednici Vijeća Medicinskog fakulteta.
<b>Mentor:</b>	Prof. dr. sc. Tea Bilušić
<b>Pomoć pri izradi eksperimentalnog dijela rada:</b>	Ivana Vrca, doktorandica, Azra Đulović, doktorandica

### ODREĐIVANJE *IN VITRO* I *EX VIVO* GASTROINTESTINALNE STABILNOSTI GLUKOZINOLATA IZ BIJELE I SMEĐE GORUŠICE PRIMJENOM SIMULIRANOG DVOFAZNOG MODELA PROBAVE

Leah Radinović, broj indeksa: 203

**Sažetak:** Cilj istraživanja bilo je utvrditi stabilnost sinigrina i sinalbina u dvofaznom simuliranom probavnom sustavu. Ispitivani su sinalbin iz bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i sinigrin iz smeđe gorušice (*Brassica juncea* L.) koristeći metodu simulacije želučane i crijevne faze. Daljni cilj bio je usporediti stabilnost glukozinolata u odnosu na komercijalne i ljudske enzime u svakoj od dviju faza probave. Za simuliranje ljudske želučane i crijevne faze korišteni su ljudski želučani i crijevni sokovi skupljeni u Kliničkom bolničkom centru Split, a kao komercijalni enzimi korištene su smjese SGF (eng. *simulated gastric fluid*) za želučanu i SIF (engl. *simulated intestinal fluid*) za crijevnu fazu. Koncentracije su praćene pomoću vezanog sustava HPLC-DAD-MS/MS. Veća stabilnost dokazana je u želučanoj fazi u odnosu na crijevnu fazu za oba glukozinolata. Nadalje, veća stabilnost uočena je prilikom korištenja ljudskih probavnih sokova u usporedbi s komercijalnim smjesama enzima, za oba glukozinolata i u obje faze probave.

Izlaganje glukozinolata, u ovom slučaju sinigrina i sinalbina, probavnim sokovima dovodi do njihove degradacije i nastajanja razgradnih produkata izotiocijanata. Glukozinolati su podložni razgradnji i u želučanoj i u crijevnoj fazi probave, no veća razgradnja zbiva se u crijevima. Nadalje, komercijalni enzimi u većoj mjeri razgrađuju glukozinolate od ljudskih probavnih enzima, no u obzir se mora uzeti velika interindividualna varijabilnost između ljudskih probavnih sokova.

**Ključne riječi:** sinigrin, sinalbin, glukozinolati, *Brassicaceae*, funkcionalna hrana, *in vitro* probava

**Rad sadrži:** 54 stranice, 15 slika, 6 tablica, 57 literaturnih referenca

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

prof.dr.sc. Tea Bilušić	Član - mentor
doc.dr.sc. Franko Burčul	Član
izv.prof.dr.sc. Sanja Perinović-Jozić	Član

**Datum obrane:** 22.listopada 2021.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska ul. 2.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

School of Medicine and Faculty of Chemistry and Technology  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Dietetics  
**Thesis subject** was approved by the Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 70, by the Faculty Council of the School of Medicine, session no. 5 and the Faculty Council of the Faculty of Chemistry and Technology, session no. 8  
**Mentor:** Tea Bilušić, professor  
**Assistance:** Ivana Vrca, PhD student  
Azra Đulović, PhD student

### DETERMINING *IN VITRO* AND *EX VIVO* GASTROINTESTINAL STABILITY OF GLUCOSINOLATES IN WHITE AND BROWN MUSTARD USING A SIMULATED TWO-PHASE DIGESTION MODEL

Leah Radinović, index number 203

**Summary:** The aim of this thesis was to determine the stability of sinigrin and sinalbin in a two-phase simulated digestive system. Sinalbin from white mustard (*Sinapis alba* L.) and sinigrin from brown mustard (*Brassica juncea* L.) were studied using a method that simulates the gastric and intestinal phases. Another objective was to compare the stability of glucosinolates in relation to human and commercial enzymes in each of the two digestion phases. To simulate the human gastric and intestinal phases, human gastric and intestinal juices collected from the University Hospital of Split were used. Simulated gastric fluid (SGF) for gastric phase and simulated intestinal fluid (SIF) for intestinal phase were used as commercial mixtures. Concentrations were monitored using hyphenated HPLC-DAD-MS/MS system. Higher stability was demonstrated in the gastric phase compared to the intestinal phase for both glucosinolates. Moreover, when human digestive juices were used, higher stability was observed compared to commercial enzyme mixtures for both glucosinolates and in both digestive phases.

When glucosinolates, in this case sinigrin and sinalbin, are exposed to digestive juices, it leads to their degradation and the formation of their degradation products isothiocyanates. Glucosinolates can be degraded in both the gastric and intestinal phase, with degradation being greater in the intestine. In addition, commercial enzymes degrade glucosinolates more than human digestive enzymes, although the large interindividual variability between human digestive juices must be taken into account.

**Keywords:** sinigrin, sinalbin, glucosinolates, *Brassicaceae*, functional food, *in vitro* digestion

**Thesis contains:** 54 pages, 15 figures, 6 tables, 57 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

Tea Bilušić, professor	Member – mentor
Franko Burčul, assistant professor	Member
Sanja Perinović-Jozić, associate professor	Member

**Defense date:** 22. october 2021.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in the Library of School of Medicine, Šoltanska 2.**

Diplomski rad je izrađen u Zavodu Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Tea Bilušić, u razdoblju od travnja do listopada 2021. godine.

Rad je financiran od strane HRZZ projekta BioSMe (IP-2016-06-1316)

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA .....	3
3.	OPĆI DIO.....	5
3.1.	Porodica Brassicaceae .....	6
3.1.1.	Bijela i smeđa gorušica .....	6
3.2.	Biološki aktivni spojevi iz hrane .....	8
3.2.1.	Glukozinolati i njihovi izvori u hrani .....	9
3.2.1.1.	Sinigrin i izvori sinigrina.....	11
3.2.1.2.	Sinalbin i izvori sinalbina.....	12
3.3.	Zdravstveni učinski biološki aktivnih spojeva .....	13
3.3.1.	Zdravstveni učinci glukozinolata .....	14
3.4.	Probava .....	16
3.5.	Simulirani modeli probave .....	18
3.6.	Visoko djelotvorna tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa.....	20
3.6.1.	Kromatografija .....	20
3.6.2.	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	20
3.6.3.	Vezani sustav tekućinska kromatografija-masena spektrometrija .....	22
4.	MATERIJALI I METODE .....	23
4.1.	Etičko odobrenje.....	24
4.2.	Kemikalije i aparatura .....	24
4.3.	Uzorci .....	25
4.4.	Metoda ekstrakcije glukozinolata.....	26
4.5.	<i>In vitro</i> model probave .....	28
4.6.	Desulfatacija .....	30
4.7.	Određivanje enzimatske aktivnosti ljudskih i komercijalnih probavnih sokova (želučanih i crijevnih) pri volumenu od 20 $\mu$ L.....	31
4.8.	HPLC-MS/MS analize.....	33
5.	REZULTATI.....	37
6.	RASPRAVA.....	40
7.	ZAKLJUČAK .....	42
8.	LITERATURA.....	44

9.	SAŽETAK.....	49
10.	SUMMARY .....	51
11.	ŽIVOTOPIS .....	53



## **1. UVOD**

U današnje vrijeme, kada je svijest o zdravlju ljudi sve veća, raste interes o zdravstvenim blagodatima hrane. Kao nadomjestak ili zamjenu liječenju klasičnim lijekovima, ljudi posežu za takozvanom funkcionalnom hranom koja je bogata biološki aktivnim sastojcima koji igraju važnu ulogu u borbi protiv bolesti. Jedan od gorućih pojmova u sferi zdrave prehrane su takozvani nutraceutici. Oni predstavljaju krovni pojam koji podrazumjeva proizvode dobivene iz hranjivih izvora koji uz osnovnu hranjivu vrijednost posjeduju i dodatne zdravstvene učinke. Filozofija koja stoji iza nutraceutika temelji se na prevenciji te je vođena Hipokratovom izrekom "neka vam hrana bude lijek". Biološki aktivni spojevi su zapravo komponente koje u nutraceuticima djeluju kao "lijek", djelujući kroz brojne mehanizme i ispoljavajući terapeutsko djelovanje (1).

Mediterranska prehrana često se navodi kao najbolji primjer uravnotežene i zdrave prehrane. Glavne komponente takve prehrane su svježe voće i povrće, riba, maslinovo ulje i žitarice. Navedene komponente služe kao izvrstan primjer funkcionalne hrane zbog svog prirodno visokog sadržaja biološki aktivnih spojeva poput polifenola, terpenoida, flavonoida, alkaloida, sterola, pigmenta i nezasićenih masnih kiselina (2).

Glukozinolati, koji su biološki aktivni spojevi koji se nalaze u biljkama iz porodice *Brassicaceae*, također su u fokusu interesa te su provedene znanstvene studije pokazale da posjeduju brojne povoljne biološke učinke na zdravlje ljudi kao što su protuupalno, antimikrobno, antioksidativno te protukancerogeno djelovanje. Nalazimo ih u namirnicama koje su čest dio uravnotežene prehrane i lako su dostupne poput brokule, kupusa, cvjetače, uljane repice, senfa i hrena (3).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovog istraživanja bio je proučiti stabilnost glavnih glukozinolata iz dviju biljaka, glukosinalbina iz bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i sinigrina iz smeđe gorušice (*Brassica juncea* L.) koristeći simulirani dvofazni sustav probave. U eksperimentu su korišteni ljudski probavni sokovi te komercijalni enzimi te je daljni cilj bio usporediti stabilnost navedenih glukozinolata s ljudskim i komercijalnim enzimima.

### **3. OPĆI DIO**

### 3.1. Porodica Brassicaceae

U porodicu kupusnjača (lat. *Brassicaceae*) ubrajamo gotovo 4000 biljnih vrsta rasprostranjenih po svim kontinentima osim Antarktike što je čini jednom od najvećih porodica cvatućih biljaka. Većina predstavnika ove porodice ima cvijet u obliku križa odakle i potiče stariji naziv porodice (krstašice). Kupusnjače pripadaju redu *Brassicales* koji broji ukupno 18 porodica biljaka, a kojima je svima zajedničko obilježje sinteza glukozinolata, skupine kemijskih spojeva koji u biljci igraju važnu obrambenu ulogu te joj daju opor i pikantan okus (4).

U posljednjih nekoliko desetljeća znanstvena istraživanja su pokazala da konzumacija povrća iz porodice *Brassicaceae* ima pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje i borbu protiv različitih bolesti. U brojnim epidemiološkim i kliničkim studijama je najviše proučavan njihov učinak na prevenciju karcinoma u ljudi. Antikancerogeni učinak je većinom povezan s prisutnošću glukozinolata odnosno njihovih razgradnih produkata (5).

#### 3.1.1. Bijela i smeđa gorušica

Bijela gorušica (*Sinapis alba* L.) jednogodišnja je biljka iz porodice kupusnjača porijeklom iz Mediteranskog područja. Danas se može naći diljem svijeta kao kultivirana biljka ili korov. Raste do 100 cm u visinu, a cvate od svibnja do lipnja. Cvijet je intenzivno žute boje s 4 latice posložene u obliku križa. Bijela gorušica ima mnoge primjene u prehrambenoj industriji kao jestiva uljarica, brzorastuća salata i začim, te u poljoprivrednoj proizvodnji kao zeleno gnojivo i stočna hrana. Listovi mladih sadnica su jestivi i bogati vitaminima A, C i E, a sjeme je dragocjeno i značajno zbog visokog sadržaja proteina i ulja te niskog udjela škroba (6).

Smeđa gorušica (*Brassica juncea* L.) je ekonomski i industrijski važna biljka iz porodice kupusnjača koja se danas pretežito uzgaja u Indiji zbog čega se nekad može naći pod nazivom indijska gorušica. Raste od 30 do 60 cm u visinu. Cvijet je žute boje i sastoji se od četiri latice postavljene u karakterističan oblik križa. Najčešće je korištena kao jestivo ulje, no značajnu primjenu nalazi i kao biognojivo i stočna hrana (7).



Slika 1. Botaničke ilustracije biljaka *Sinapis alba* L. (lijevo) i *Brassica juncea* L. (desno)  
[iz: Köhler's Medizinal-Pflanzen, 1887.]

### 3.2. Biološki aktivni spojevi iz hrane

Biološki aktivne spojeve definiramo kao fitokemikalije, koje mogu biti porijeklom iz hrane, a posjeduju svojstvo regulacije metaboličkih funkcija dovodeći do blagotvornih učinaka na organizam (8).

U popularnim modelima zdrave prehrane najveću zastupljenost imaju namirnice poput voća, povrća, mahunarki, žitarica i ribe. Razlog tome je što te grupe imaju visok udio raznolikih biološki aktivnih komponenti koje pozitivno doprinose ljudskom zdravlju, npr. smanjujući rizik od raznih kardiovaskularnih bolesti, karcinoma i sl.

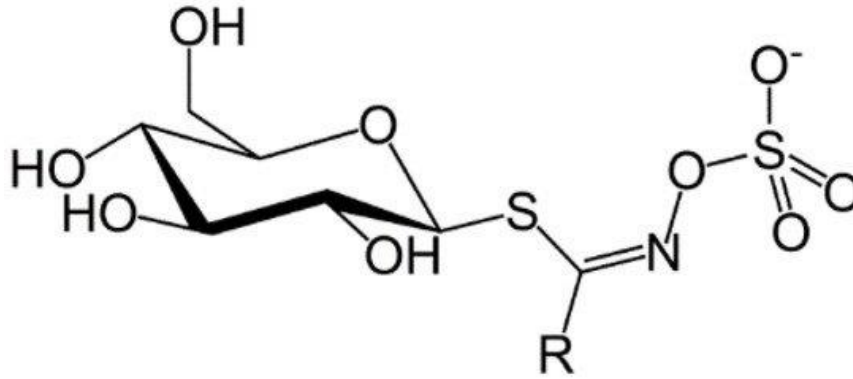
Dosad su otkriveni mnogi bioaktivni spojevi. Oni se međusobno razlikuju po kemijskoj strukturi i ulozi u organizmu. Samo jedan od primjera su izotiocijanati iz porodice *Brassicaceae* o kojima ćemo detaljnije govoriti u ovom radu. Među ostalima se ističu flavonoidi u žitaricama i mahunarkama, fitoestrogeni iz soje, hidroksitirozol u maslinama i maslinovom ulju, rezervatrol u orašastim plodovima i crvenom vinu, likopen u rajčicama, organosumporni spojevi u češnjaku i luku, monoterpeni u citrusnom voću itd. Velika se važnost pridaje i vlaknima poput beta glukana, psylliuma i pektina koji dokazano pridonose smanjenju razina LDL kolesterola, a nalaze se u namirnicama kao što su zob, ječam i voće (9).

Bioraspoloživost definiramo kao udio molekule koji je apsorbiran i dostupan stanicama. Bioraspoloživost prethodno navedenih grupa spojeva je od veće važnosti od samog sadržaja tih spojeva u hrani. Potencijalni zdravstveni učinci hrane ovise o procesu probave u kojem se iz makromolekula razgradnjom dobivaju nutrijenti koji na koncu pokazuju biološku aktivnost (10).



### 3.2.1. Glukozinolati i njihovi izvori u hrani

Glukozinolati su sekundarni metaboliti biljaka dobiveni iz aminokiselina. Sastoje se od sulfatnog i tioglukoznog dijela, te bočnog lanca po kojem se međusobno razlikuju. Do danas je otkriveno preko 130 struktura, a najjednostavnija podjela je na alifatske, aromatske i indolne glukozinolate.



Slika 2. Struktura glukozinolata, R predstavlja bočni lanac (11).

Najvećim dijelom se nalaze u trima porodicama reda *Brassicales*, i to: *Resedaceae*, *Capparaceae* i *Brassicaceae*. Koncentracija glukozinolata varira s obzirom na vrstu biljke i njen dio, tako je na primjer sadržaj glukozinolata u biljci *Brassica napus* L. mnogo veći u sjemenu nego u listovima. Nadalje, u različitim tkivima biljke mogu se naći različiti oblici glukozinolata pa ćemo tako glukozinolate indolne strukture naći više u listovima nego u sjemenkama.

Obilje glukozinolata se nalazi u porodici *Brassicaceae* u koju spada povrće poput kupusa, cvjetače, brokule i prokulica koje sačinjava dio čovjekove uravnotežene prehrane. Iz te činjenice proizlazi interes o njihovom biološkom djelovanju na ljudski organizam.

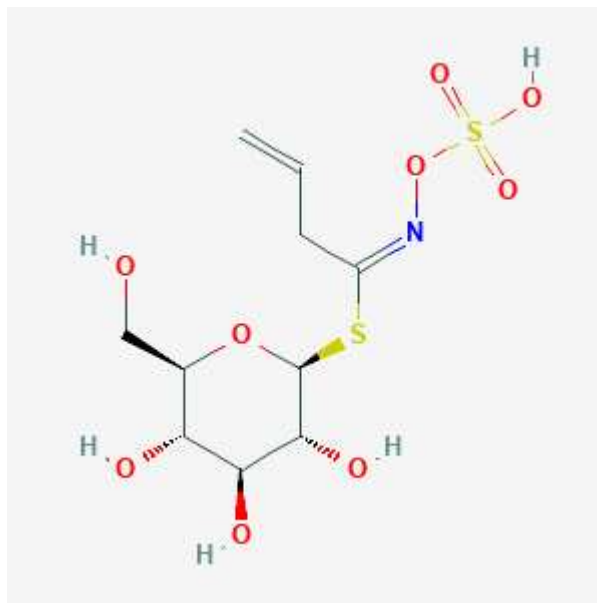
Poznata je uloga glukozinolata u njihovim biljnim domaćinima, poput biljke *Arabidopsis thaliana* L. U pokusu u kojem je biljka bila podvrgnuta abiotičkom stresu uočena je povećana sinteza kratkolančanih alifatskih i smanjena proizvodnja indolskih glukozinolata što je znanstvenike navelo na zaključak o obrambenoj ulozi glukozinolata kao odgovoru na okolišni stres (12).

Pod utjecajem enzima glukozinolati se razgrađuju na metabolite čija struktura ovisi o pH medija i strukturi pokrajnjeg lanca. U neutralnom pH nastaju izotiocijanati koji u ljudskom organizmu predstavljaju potente induktore enzima druge faze, a brojne su studije dokazale njihovo antitumorsko, fungicidno, baktericidno i nematicidno djelovanje. Enzimatska razgradnja glukozinolata događa se pod utjecajem enzima mirozinaze. Taj se enzim nalazi u

samoj biljci te uzrokuje hidrolizu glukozinolata prilikom konzumacije ili oštećenja tkiva biljke. U slučaju toplinske obrade hrane (npr. kuhanjem u vodi ili na pari) enzim se inaktivira te do hidrolize glukozinolata dolazi tek u debelom crijevu gdje se nalaze mikroorganizmi koji proizvode enzim nalik mirozinazi. Daljnjim metaboličkim pretvorbama izotiocijanati prelaze u merkapturinu kiselinu kojom se izlučuju u urinu i koja predstavlja dobar biomarker kojim se utvrđuje količina apsorbiranih izotiocijanata (13).

### 3.2.1.1. Sinigrin i izvori sinigrina

Sinigrin je alifatski glukozinolat. Struktura je prikazana na slici 3. Najviše sinigrina prisutno je u porodici *Brassicaceae*, a osobito u sjemenkama smeđe gorušice (*Brassica juncea L.*).



Slika 3. Kemijska struktura sinigrina (14)

Tradicionalna medicina poput indijske Ayurvede već tisućama godina primjenjuje sjeme gorušice i njezino ulje u liječenju oboljenja kao što su reumatska bol, kašalj, prehlada, oticanje, pri čišćenju usne šupljine, liječenju različitih kožnih oboljenja i rana itd. Uspješnost primjene ove biljke u navedenim stanjima navela je znanstvenike na detaljnije istraživanje sastava i aktivnosti gorušice.

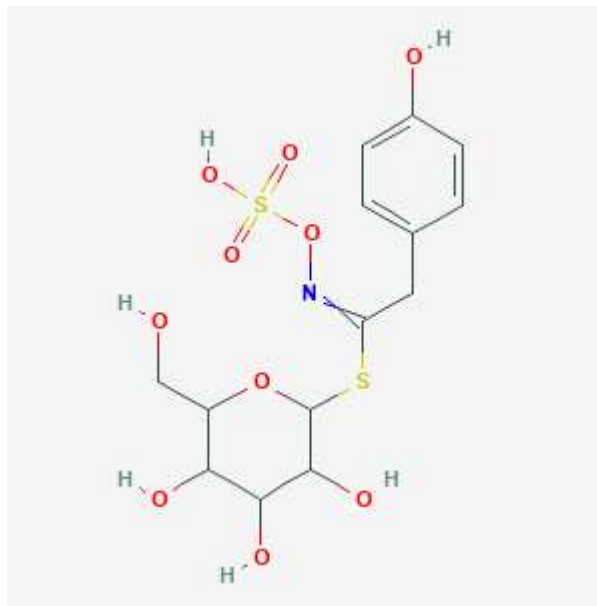
Sinigrin je, kao i svi glukozinolati, podložan razgradnji mirozinazom čime pri neutralnom pH nastaje alil-izotiocijanat koji pokazuje farmakološko djelovanje. Također je podložan razgradnji intestinalnom mikroflorom poput npr. *Lactobacillus agilis*, *Streptomyces*, *Bacillus*, i *Staphylococcus spp* (15). U uvjetima kiselog pH (2-4) hidrolizom sinigrina nastat će alilonitril koji pokazuje svojstva modifikatora enzima druge faze. Alilonitril tako pojačava djelovanje enzima glutation-S-transferaze, kinon-reduktaze, glutationa, peroksidaze i superoksid-dismutaze, a smanjuje djelovanje katalaze i glutation-reduktaze (16).

Neka od farmakoloških djelovanja koja se pripisuju sinigrinu uključuju antitumorsko, protuupalno, antibakterijsko, antifungalno i antioksidativno djelovanje (17).

### 3.2.1.2. Sinalbin i izvori sinalbina

Sinalbin je glukozinolat kojeg se najviše može naći u sjemenu bijele gorušice (*Sinapis alba* L.). Struktura mu je prikazana na slici 4.

Podložan je razgradnji enzimom mirozinzom pri čemu nastaje 4-hidroksibenzil izotiocijanat. Navedeni izotiocijanat je nestabilan i brzo se pretvara u 4-hidroksibenzilni alkohol i tiocijanatni ion. Upravo zbog nestabilnosti navedenog izotiocijanata bijela gorušica ima manje oštar okus u usporedbi sa smeđom gorušicom (18).



Slika 4. Kemijska struktura sinalbina (19)

### 3.3. Zdravstveni učinci biološki aktivnih spojeva

Proteklih godina porast javnog interesa i svijesti o zdravnoj prehrani nagnao je znanstvenike na istraživanje hrane bogate esencijalnim nutrijentima i hrane s pozitivnim učinkom na ljudsko zdravlje. Kao rezultat toga takozvana funkcionalna hrana i biološki aktivni spojevi privukli su veliku pozornost jer se smatra da bi mogli ne samo zadovoljiti osnovne ljudske potrebe za nutrijentima već imati i zdravstvene učinke u redukciji rizika od kroničnih bolesti (20).

Među najvažnije biološki aktivne spojeve iz hrane ubrajamo polifenole, antocijane, karotenoide, flavonoide, glukozinolate, izoflavonoide, omega-3 masne kiseline, fitoestrogene, fitosterole, probiotike, rezervatrol i terpenoide (21).

Polifenoli su sekundarni metaboliti raznih biljaka. Najviše su prisutni u grožđu, jabukama, kruškama i bobičastom voću. Zbog svog snažnog antioksidativnog djelovanja dugotrajna konzumacija hrane bogate polifenolima smanjuje rizik nastanka karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze i neurodegenerativnih oboljenja (22).

Flavonoidi su polifenolni spojevi najviše prisutni u zelenom povrću, luku, jabukama, bobičastom voću i čaju. Postali su neizbježan pojam u svijetu zdrave i funkcionalne prehrane zbog svojih antioksidativnih, protuupalnih, antimutagenih i antikancerogenih svojstava. Osobito su zanimljivi zbog činjenice da su potentni inhibitori pojedinih enzima kao što su angiotenzin konvertirajući enzim (ACE) koji povisuje krvni tlak, ciklooksigenaze (COX) koja stvara prostaglandine, ksantin-oksidaze (XO) koja stvara mokraćnu kiselinu te enzima koji potiču stvaranje estrogena (23).

Karotenoidi su biljni pigmenti prisutni u biljkama, gljivama, algama i bakterijama. U novije vrijeme na tržištu je dostupno sve više dodataka prehrani koji sadrže karotenoide, od kojih su najčešći  $\beta$  karoten, lutein, zeaksantin, astaksantin i likopen. Prehrana bogata karotenoidima ima pozitivne učinke na ljudsko zdravlje i povezuje se sa smanjenim rizikom makularne degeneracije, katarakte, nekih vrsta zloćudnih tumora i koronarnih oboljenja (24).

Omega-3 masne kiseline su polinezasićene masne kiseline s dvostrukom vezom na trećem ugljikovom atomu s kraja lanca. Najvažniji predstavnici skupine su  $\alpha$  linolenska (ALA), eikozapentaenoična (EPA), dokozapentaenoična (DPA) i dokozaheksaenoična (DHA) kiselina. One na nekoliko načina pozitivno utječu na ljudsko zdravlje. Dokazano je da mijenjaju lipidni profil krvi te da utječu na sintezu eikosanoida, kaskadu staničnog signaliziranja i ekspresiju gena te time pozitivno utječu na kardiovaskularno zdravlje (25).

Probiotici su živući nepatološki mikroorganizmi koji se koriste za poboljšanje ravnoteže ljudskog mikrobioma s posebnim naglaskom na gastrointestinalni trakt (26).

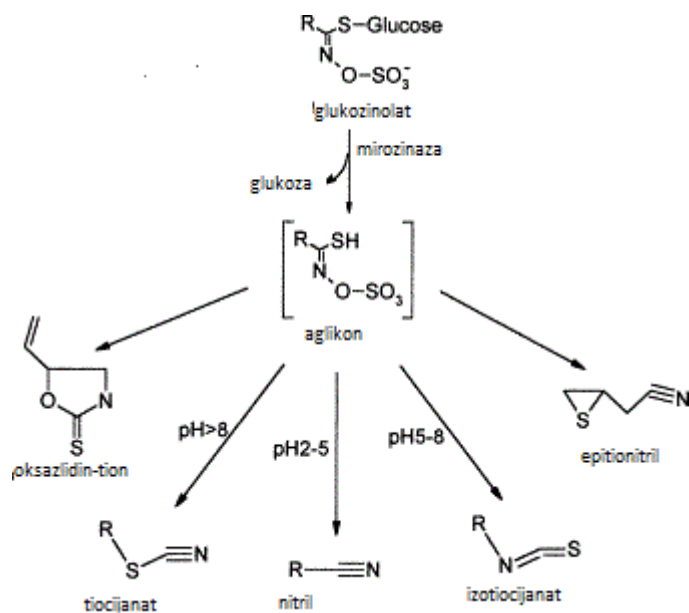
Studije podržavaju činjenicu da mikrobiom probavnog trakta utječe na ljudsko zdravlje. Najjači dokazi za korištenje probiotika su u liječenju proljeva, osobito proljeva u djece uzrokovanog rotavirusom. Pojedini sojevi koji su se pokazali učinkovitima u terapiji putničkog i proljeva uzrokovanog antibioticima su *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus GG* i *Saccharomyces boulardii* (27).

### **3.3.1. Zdravstveni učinci glukozinolata**

Dosadašnja znanstvena istraživanja pokazuju da povrće iz porodice kupusnjača, poput kupusa, brokule, cvjetače i prokulica, štite od razvoja karcinoma u ljudi. Posebice karcinoma želuca, pluća, mokraćnog mjehura, prostate, debelog crijeva i rektuma (28).

Glukozinolati su sekundarni metaboliti biljaka, najviše prisutni upravo u porodici *Brassicaceae* (kopusnjače). Odgovorni su za nutritivnu vrijednost i okus kupusnjača, a razgradni produkti su važni kod obrane od patogena i insekata. Pozornost znanstvenika su posebno privukla antikancerogena svojstva tih razgradnih produkata (29).

Glukozinolati su sami po sebi stabilni i biološki neaktivni, no kroz procese rezanja, gnječenja, žvakanja i probave biljnog materijala dolaze u kontakt s enzimom mirozinazom. U reakciji s tim enzimom nastaje glukoza i nestabilni aglikon čija daljnja reakcija i preobrazba ovisi o uvjetima u kojima se nalazi. Jedan od mogućih produkata su izotiocijanati, najistraženiji i vjerojatno najvažniji razgradni produkti glukozinolata koji nastaju u neutralnom pH. Razgradnja glukozinolata uz mirozinazu prikazana je na slici 5.



Slika 5. Razgradnja glukozinolata pod utjecajem mirozinaze (30).

Izotiocijanati su potentni induktori enzima druge faze ljudskog metabolizma, te imaju sposobnost inhibicije mitoze i stimuliranja apoptoze u humanim tumorskim stanicama. Ekstrakt brokule bogat je izotiocijanatom sulforafanom te je pokazao najjaču induktorsku aktivnost. U pokusima na štakorima koji su tretirani izotiocijanatom došlo je do značajnog porasta aktivnosti citoprotektivnih proteina u mnogim organima uključujući jetru, tanko crijevo, debelo crijevo, gušteraču, pluća, mokraćni mjehur i kožu. Placebo kontrolirane studije na ljudima su također pokazale porast citoprotektivnih proteina sukladan većem unosu sulforafana.

Osim antikarcinogenih, izotiocijanati pokazuju i protuupalna svojstva. *In vitro* studije dokazale su sposobnost izotiocijanata da smanje ili čak inhibiraju aktivnost nuklearnog faktora kapa B (NF- $\kappa$ B) koji ima važnu ulogu u regulaciji imunoloških reakcija. NF- $\kappa$ B regulira ekspresiju ciklooksigenaze-2 (COX-2), enzima ključnog u indukciji upalnih reakcija. Protuupalna aktivnost izotiocijanata je značajna zbog poznate uloge upalnih procesa u karcinogenezi (31, 32).

### 3.4. Probava

Ljudski probavni sustav sastoji se od probavne „cijevi“ i pratećih probavnih organa i žlijezda. Probavna „cijev“ proteže se od usnog to analnog otvora. Usni otvor vodi u oralnu šupljinu u kojoj se nalaze 32 zuba i mišićav jezik. Oralna šupljina zatim vodi u ždrijelo koje služi kao zajednički prolaz za hranu (putem jednjaka) i zrak (putem dušnika). Epiglotis, hrskavična struktura, služi kao barijera ulasku hrane u dušnik prilikom gutanja. Jednjak je duga cijevolika struktura koja se proteže kroz prsni koš i vodi do želuca. Između želuca i jednjaka nalazi se gastroezofagealni sfinkter koji regulira ulazak hrane u želudac i sprječava njen povratak u jednjak. Želudac se nalazi u gornjem lijevom dijelu abdomena i dijeli se na tri dijela: kardij – dio u koji se otvara jednjak, fundus i pilorus na koji se nastavlja tanko crijevo. Između želuca i tankog crijeva nalazi se pilorični sfinkter. Tanko se crijevo također dijeli na tri dijela: relativno kratki duodenum, dugi srednji dio zvan jejunum i završni ileum. Krajnji dio probavne „cijevi“ je debelo crijevo koje se sastoji od slijepog crijeva, debelog crijeva i rektuma koji završava anusom.

Glavna uloga probavnog sustava je pretvorba hrane i tekućina uzetih iz vanjskog okoliša u komponente koje tijelo može iskoristiti za proizvodnju energije i nutrijenata (33).

Probava se može promatrati kao četiri zasebna, no povezana procesa koji se zbivaju jedan za drugim, uvijek u istom smjeru (osim u patološkim stanjima) i bez preklapanja. Anatomski su razdvojeni te odgovaraju ustima (oralni proces), želucu (gastrični proces), tankom crijevu (intestinalni proces) i debelom crijevu (fermentacija).

Prvi korak probave započinje u ustima usitnjavanjem hrane zubima i miješanjem sa slinom. Slina je neutralnog pH i sadrži enzim amilazu koja škrob iz hrane hidrolizira do glukoze. Slina također sadrži glikoproteine mucine koji sudjeluju u formiranju bolusa i lubrikaciji hrane što je važno za gutanje i daljnje prolaženje hrane kroz probavnu „cijev“.

Nakon gutanja i prolaska kroz jednjak hrana dolazi u želudac gdje potiče parijetalne stanice na lučenje klorovodične kiseline što u konačnici snižava pH želuca na 2. Glavne, ili zimogene, stanice izlučuju pepsinogen i želučanu lipazu. Pepsinogen je inaktivni prekursor proteolitičkog enzima pepsina koji se aktivira dolaskom u kontakt s kiselinom i odcjepljenjem 9 aminokiselina. Želučana lipaza je enzim koji hidrolizira trigliceride. Nakon razgradnje želučanim enzimima slijedi pažljivo regulirani proces želučanog pražnjenja. Faktori koji reguliraju taj proces uključuju razinu glukoze u krvi, enteričke živčane signale i gastrointestinalne peptidne hormone. Dva su glavna hormona koji imaju ulogu u regulaciji želučanog pražnjenja: grelin i GLP-1 (engl. *glucose like protein 1*). Grelin je hormon koji se

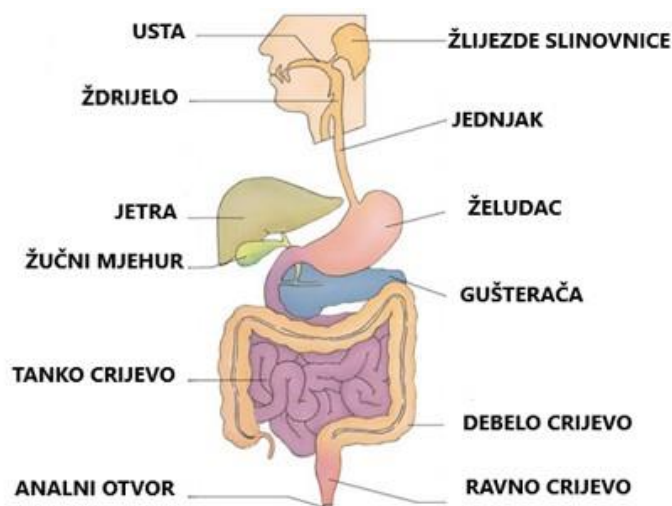


aktivira tijekom gladovanja i potiče želučani motilitet, dok GLP-1 ima glavnu ulogu u signaliziranju sitosti i inhibiciji motiliteta (34).

Napuštanjem želuca hrana dolazi u prvi dio tankog crijeva – duodenum. Ova 30 cm duga regija je mjesto u koje gušterača izlučuje smjesu probavnih enzima – amilaza, lipaza i proteaza. Gušterača također izlučuje bikarbonate koji podižu pH do neutralnog koji je potreban enzimima za djelovanje. Žučni mjehur u duodenum izlučuje žučne soli koje emulgiraju masnoće i time pomažu njihovu razgradnju pankreatičnom lipazom (35). Ileum je otprilike 2,5 metara dug srednji dio tankog crijeva u kojem se odvija većina apsorpcije hranjivih tvari u obliku aminokiselina, oligopeptida, mono- i disaharida, triglicerida itd. Apsorptivna površina tankog crijeva iznosi otprilike 30 m<sup>2</sup> zahvaljujući brojnim malim izbočinama zvanim crijevne resice. Završna apsorpcija zbiva se u ileumu, završnom 3,5 metara dugom dijelu tankog crijeva. Ileum je jedino mjesto u kojem se odvija apsorpcija vitamina B<sub>12</sub> i žučnih soli.

Prolaskom kroz ileocekalni sfinkter hrana naposljetku dolazi do debelog crijeva. Glavne uloge debelog crijeva su apsorpcija vode, elektrolita i vitamina, te formiranje i pomak fecesa prema anusu (36). Debelo crijevo predstavlja anaerobni okoliš u kojem se nalazi preko 1000 vrsta bakterija, a njihov ukupan broj procjenjuje se na red veličine 10<sup>13</sup>. Uloga tih bakterija je probava komponenti hrane koje su ostale neprobavljene, kao što su na primjer vlakna. Bakterije procesom fermentacije iz supstrata stvaraju soli kratkolančanih masnih kiselina, najčešće acetat, butirat i propionat koji se nakon apsorpcije koriste kao izvor energije. Fermentacija ovisi o količini i vrsti dostupnih supstrata od kojih su najvažniji složeni ugljikohidrati (37).

Daljnim prolaskom kroz debelo crijevo proces fermentacije postaje manje zastupljen i zamjenjuje ga metabolizam proteina i apsorpcija vode koja rezultira formiranjem krute mase. Krajnja faza probave je dolazak fekalne mase u rektum gdje distenzijom potiče nagon defekacije (38-40).



Slika 6. Probavni sustav čovjeka s označenim nazivima dijelova (41).

### 3.5. Simulirani modeli probave

Posljednjih nekoliko desetljeća prevalencija bolesti vezanih uz prehranu je u porastu zbog čega raste interes u što potpunije razumijevanje sudbine hrane u ljudskom gastrointestinalnom traktu. *In vivo* istraživanjima probave hrane u ljudima i životinjama suprotstavljaju se etički i financijski problemi zbog čega su *in vitro* modeli predloženi kao alternativa. *In vitro* modeli dijele se na statične i dinamične metode, obje s ciljem simuliranja fiziologije gornjeg probavnog trakta, posebice oralne i želučane faze, te faze tankog crijeva.

Najčešće korišteni modeli su statični modeli probave u kojima se hrana stavlja u niz bioreaktora od kojih svaki predstavlja jedan stadij probave. Svaki bioreaktor je odjeljak za sebe i hrana se u njemu nalazi u konstantnom omjeru naspram enzima, elektrolita i pH stadija probave koji se rekreira.

Statični modeli se dugi niz godina koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te su se pokazali vrlo korisnima u predviđanju ishoda *in vivo* probave. Danas je dostupna tzv. INFOGEST metoda koja je nastala kao rezultat potrebe za harmonizacijom parametara i uvjeta u kojima su se ovi eksperimenti izvodili. Glavne prednosti ovakvih statičnih metoda su dobra reproducibilnost rezultata, robusnost, jednostavnost i relativno mala cijena. Unatoč tome probava je i dalje dinamičan proces te ovakve metode imaju očite nedostatke i ograničenja: ne postoji protok hrane iz jednog odjeljka u drugi te se koncentracija enzima, žučnih kiselina i pH održavaju konstantnima.

Dinamični modeli su mnogo složeniji, ali i fiziološki mnogo relevantniji od statičnih modela. Njihovim korištenjem otvara se mogućnost regulacije pH, protoka hrane i injektiranja enzima u realnom vremenu u različite dijelove probavnog procesa. Nedostatak ovakvih metoda je odsutnost mikrobiote u distalnim dijelovima probavnog trakta, no vjeruje se kako će ovakvi dinamični modeli biti prekretnica u razumijevanju probavnih procesa u budućnosti. Posebno važnu ulogu igraju već sada u farmaceutskoj industriji u istraživanju načina na koji hrana utječe na raspadanje i otapanje formulacija lijekova te na njihovu isporuku u duodenum (42, 43).

U *in vitro* simuliranim modelima probave najčešće se reproduciraju želučana i intestinalna faza te govorimo o dvofaznim modelima. U nastojanju što bolje replikacije *in vivo* uvjeta mogu se koristiti ljudski probavni sokovi dobiveni iz želuca i crijeva zdravih dobrovoljaca, no aktivnost i sadržaj enzima tu može značajno varirati između pojedinaca. Kako bi se minimizirala interindividualna varijabilnost i povećala reproducibilnost koriste se smjese skupljenih probavnih sokova i određuje im se enzimatska aktivnost. U mnogim se studijama koriste i komercijalni enzimi goveđeg ili svinjskog podrijetla uz mogući dodatak žučnih soli radi bolje lipolize (44).

Želučani sok sastoji se od vode, mukoze, klorovodične kiseline, pepsina i intrizičnog faktora. U ovoj fazi pepsin predstavlja glavni proteolitički enzim odgovoran za cijepanje proteina na manje peptide i amino kiseline. Optimalnu aktivnost pokazuje pri pH 1,5-2, a dolaskom u tanko crijevo gdje je pH iznad 6 gubi aktivnost (45).

Većina enzimatske razgradnje hrane odvija se u tankom crijevu. Gušterača proizvodi važne enzime uključujući pankreasnu amilazu, pankreasnu lipazu, tripsinogen, kimotripsinogen, prokarboksipeptidazu i proelastazu. Ovi enzimi svoje optimalno djelovanje iskazuju pri pH 6-7. Pankreasna amilaza ima ulogu u probavi škroba do maltoze i maltrioze. Pankreasna lipaza djeluje s koenzimom kolipazom u hidrolizi esterskih veza triglicerida, cijepajući ih na diacilglicerole i monoacilglicerole. Kako bi spriječila autodigestiju, gušterača određene enzime izlučuje u obliku zimogena koji se aktiviraju dolaskom u tanko crijevo. Enterokinaza je enzim prisutan u duodenumu koji tripsinogen pretvara u aktivni oblik – tripsin. Tripsin zatim pretvara kimotripsinogen, prokarboksipeptidazu i proelastazu u njihove aktivne oblike.

Osim pankreasnih enzima, crijevni sok sačinjava i žuč koja je smjesa žučnih soli, kolesterola, masnih kiselina, bilirubina i elektrolita, a ima ulogu u emulgiranju lipida u tankom crijevu (46).

### 3.6. Visoko djelotvorna tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa

#### 3.6.1. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda odjeljivanja pri kojoj se tvari raspodjeljuju između dviju faza. Smjesa tvari otopljena je u otapalu (mobilna faza) koje se u jednom smjeru kreće preko nepokretne površine (stacionarna faza). Komponente smjese imaju različit odgovor na sastav stacionarne faze stoga niz nju putuju različitim brzinama što dovodi do njihovog odjeljivanja na putu prema izlazu iz kromatografske kolone. Odjeljivanje može biti rezultat adsorpcije, razdjeljivanja, ionske izmjene i razlika fizikalno-kemijskih svojstava molekule kao što su masa ili veličina (47).

Tekućinska kromatografija jedna je od najčešće korištenih kromatografskih metoda. Mobilnu fazu predstavlja smjesa organskih komponenti otopljenih u prikladnom otapalu, a stacionarna faza je najčešće aluminijev oksid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) ili silikagel ( $\text{SiO}_2$ ). Postupak se provodi dodavanjem otapala na početak kolone čime se komponente ispiru odnosno eluiraju iz kolone. Retencijsko vrijeme je vrijeme potrebno analitu da prođe kroz kolonu odnosno vrijeme između injektiranja uzorka i odziva to jest pojave signala na detektoru.

#### 3.6.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High performance liquid chromatography* - HPLC) je unaprijeđena varijanta prethodno spomenute tekućinske kromatografije. U literaturi se još spominje pod nazivom tekućinska kromatografija pod visokim tlakom (engl. *High pressure liquid chromatography* - HPLC).

Postoji nekoliko vrsta tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, a najčešće korištene su:

- **Kromatografija normalnih faza** – odvajanje se temelji na polarnosti dviju faza. Stacionarna faza je polarna, a mobilna faza nepolarna.
- **Kromatografija obrnutih faza** – stacionarna faza je nepolarna, a mobilna je polarna.
- **Iono-izmjenjivačka kromatografija** – razdvajanje spojeva koji se analiziraju temelji se na njihovom naboju. Dijeli se na kationsku i anionsku.

- **Kromatografija isključenjem (gel kromatografija)** – tehnika se temelji na veličini molekula koje se analiziraju. Stacionarna faza sadrži pore raznih veličina u koje ulaze manje molekule analita, dok one veće putuju dalje niz kolonu.
- **Bioafinitetna kromatografija** – predstavlja vrstu kromatografije temeljenu na reverzibilnim interakcijama između proteina i liganda (48).

Unaprijeđenje HPLC metode je temeljeno na saznanju da su kromatografska razdvajanja mnogo uspješnija ukoliko se u stacionarnoj fazi koriste iznimno male, uniformne i sferične čestice. Manja veličina čestica osigurava veliku adsorptivnu površinu te se tako u praksi često koriste čestice silikagela dimenzija od 2 do 5  $\mu\text{m}$  (49). Visokotlačne pumpe koriste se za generiranje pritiska pod kojim otapalo putuje kroz kolone, a većina uređaja djeluje pod tlakom od 34,47 do 344,73 bar-a. Samo uvođenje uzorka u uređaj vrši se putem injekcijskog ventila, a ubrizgavanje može biti ručno ili putem autoinjektora. Sama kromatografska kolona je zatvorena cijev izrađena od nehrđajućeg čelika ispunjena nepokretnom fazom. Nakon izlaska iz kolone komponente dolaze do detektora, dijela sustava koji ima ulogu generiranja električnog signala razmjernog nekom fizikalnom ili kemijskom svojstvu komponente.

Postoji nekoliko vrsta detektora, a neki od njih su:

- **Ultraljubičasti (UV) detektor** – tri četvrtine HPLC detektora su upravo UV detektori. Mogu se koristiti samo za otkrivanje spojeva koji apsorbiraju UV zračenje poput alkena, aromata i spojeva s višestrukim vezama.
- **Fluorescentni detektor** – mjeri emisiju svjetlosti koja dolazi od pobuđenih atoma analita.
- **Detektor indeksa loma** – koristi se kada tvar od interesa ne apsorbira UV svjetlost. Ovaj detektor mjeri indeks loma svjetlosti koja prolazi kroz uzorak s analitom u odnosu prema referentnom uzorku koji sadrži samo otapalo.
- **Maseni spektrometar kao detektor** – analitička tehnika temeljena na mjerenju omjera mase i naboja molekula u uzorku (50).

### 3.6.3. Vezani sustav tekućinska kromatografija-masena spektrometrija

Sustav tekućinska kromatografija visokog učinka - spektrometrija mase predstavlja sustav koji omogućuje jednostavno odjeljivanje komponenata smjese i njihovu detekciju. Tekućinski kromatograf može se jednostavno spregnuti sa masenim spektrometrom koji detektira molekule na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ) (51).



Slika 7. UHPLC-DAD-MS/MS uređaj Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu.

## **4. MATERIJALI I METODE**

#### 4.1. Etičko odobrenje

Eksperimentalni dio je uključivao *ex vivo* metodu probave s ljudskim probavnim sokovima. Dozvolu za prikupljanje probavnih sokova ljudi odobrili su: Etičko povjerenstvo Kliničko - bolničkog centra - Split i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Ur. Broj: 380-59-10106-20-111/105, klasa: 641-01/20-02/01.

#### 4.2. Kemikalije i aparatura

Kemikalije:

- Etanol (70%), Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev acetat, Merck, Darmstadt, Njemačka,
- Trikloroctena kiselina, Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
- Klorovodična kiselina, Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
- Dekstran (DEAE-sephadex A-25), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD,
- Sulfataza, (iz Helix pomatia, tip H-1), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- RGE (rabbit gastric extract), Lipolytech, Marseille, Francuska,
- Žučne soli, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD,
- Pankreatin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD,
- Kazein, Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, SAD,
- Hemoglobin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD.

Aparatura:

- Električni mlinac za kavu, Sencor Europe, Prag, Češka Republika,
- Analitička vaga, Explorer® Semi-Micro, OHAUS, SAD,
- Vortex, Dragon laboratory, Peking, Kina,
- Ultrazvučna kupelj, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka,
- Vodena kupelj, Julabo, Seelbach, Njemačka,
- Centrifuga, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka
- Inkubator, Thermo-Shaker TS-100, Biosan, Riga, Latvija
- UV/VIS spektrometar, Lambda EZ 201, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD



- UHPLC-DAD-MS/MS, Thermo Fischer Scientific, SAD,
- Eppendorf tube
- Laboratorijske staklene čaše
- Mikropipete

### 4.3. Uzorci

Sjeme bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i smeđe gorušice (*Brassica juncea* L.) nabavljeno je od Harissa Spice Store (Zagreb, Hrvatska).



Slika 8. Sjeme smeđe i bijele gorušice.

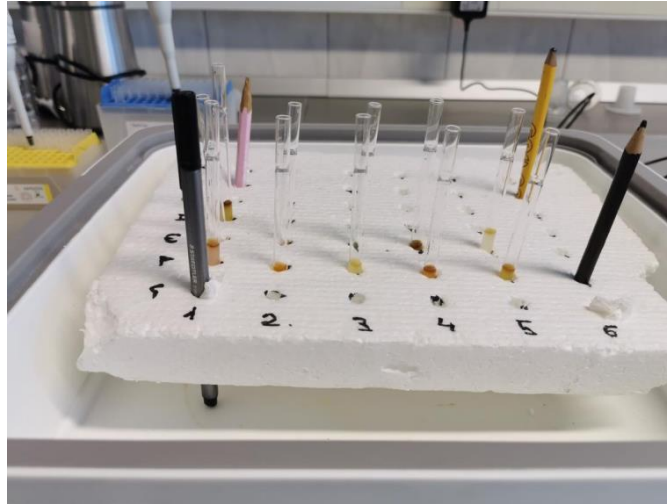
#### 4.4. Metoda ekstrakcije glukozinolata

##### Priprema otopina potrebnih za ekstrakciju

- Pripremljeno je 100 mL otopine 70% etanola miješanjem 70 mL etanola i 30 mL ultračiste vode.
- Otopina natrijevog acetata (NaOAc, 20 mM, pH = 5,5) dobivena je otapanjem 0,8259 g NaOAc u 500 mL ultračiste vode nakon čega je pH podešavan dodatkom klorovodične kiseline (HCl, 25%).
- Otopina dekstrana dobivena je otapanjem 10,0125 g dekstrana u 125 mL ultračiste vode.
- Otopina sulfataze pripremljena je otapanjem 5000 U sulfataze u 30 mL ultračiste vode uz dodatak 30 mL apsolutnog etanola i miješanjem na magnetskoj miješalici 10-15 minuta. Otopina je zatim raspodjeljena u dvije kivete, centrifugirana 20 minuta na 4500 okr/min. Supernatant je zatim prebačen u čistu čašu i pomiješan s 90 mL apsolutnog etanola. Dobivena je otopina raspodjeljena u dvije kivete i centrifugirana na 2500 okr/min u trajanju od 15 minuta. Supernatant je zatim odbačen, a talog otopljen u 25 mL ultračiste vode. Dobivena otopina je stavljena na vorteks i čuvana u Eppendorf tubama na temperaturi od -20°C.

## Priprema kolona

Kao kolone služile su staklene pipete napunjene mljevenim filter papirom u visini 1 cm. Mljeveni materijal je zbijen u svrhu sprječavanja istjecanja gela. U tako pripremljene pipete dodano je 0,5 mL dekstrana i 1 mL ultračiste vode.



Slika 9. Kolone za ekstrakciju.

## Priprema biljnog materijala

1. Sjeme bijele i smeđe gorušice je svako posebno samljeveno u mlincu za kavu, prosijano te je odvagano 100 mg biljnog materijala.
2. Materijal je raspoređen u Eppendorf reakcijske tube s okruglim dnom. U svaku tubu dodan je 1 mL 70% etanola. Tube su zatvorene sigurnosnim kapticama, vorteksirane i prebačene u vodenu kupelj na temperaturi od 90 °C gdje su držane otprilike 5 minuta.
3. Zatim su prebačene u ultrazvučnu kupelj gdje su držane 10 minuta i konačno su stavljene u centrifugu na 2700 okr/min u trajanju od 10 minuta.



Slika 10. Uzorci u ultrazvučnoj (lijevo) i vrućoj vodenoj kupelji (desno).

#### 4.5. *In vitro* model probave

Dvofazni *ex vivo* i *in vitro* model probave podrazumjeva simuliranje probave želuca i tankog crijeva.

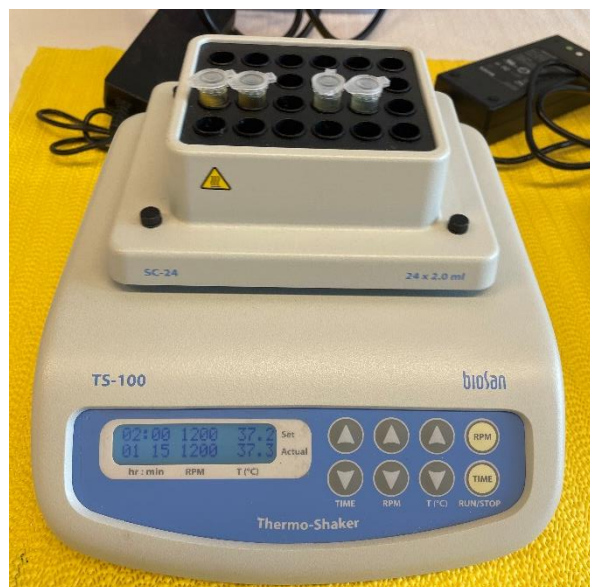
Korišteni su ekstrakti bijele i smeđe gorušice, koji sadrže glukozinolate sinalbin i sinigrin, pripremljeni u 70% etanolu. Ukupni volumen neprobavljenih i uzoraka s probavnim sokovima (ljudskim i komercijalnim) postavljen je na 1,5 mL. Prije dodavanja želučanog soka pH uzorka namješten je na vrijednost 2-3 koristeći 1M HCl. U tu svrhu utrošeno je otprilike 30  $\mu$ L navedene kiseline. U sve Eppendorf tube stavljeno je 650  $\mu$ L pojedinog ekstrakta smeđe i bijele gorušice.

Uzorci s ljudskim želučanim sokom sadržavali su 650  $\mu$ L ekstrakta gorušice, 182  $\mu$ L želučanog soka, 40  $\mu$ L HCl-a i razrijeđeni su destiliranom vodom do konačnog volumena od 1,5 mL. Uzorci s ljudskim crijevnim sokom sadržavali su 650  $\mu$ L ekstrakta gorušice, 442  $\mu$ L crijevnog soka te su nadopunjeni destiliranom vodom do konačnog volumena 1,5 mL. U uzorke koji su sadržavali crijevne sokove nije dodavana 1M NaOH radi namještanja pH jer je pH uzorka već bio u potrebnom području neutralne pH vrijednosti. Neprobavljeni uzorci nisu sadržavali probavne enzime niti su stavljeni na proces inkubacije, ali su nadopunjeni destiliranom vodom do volumena 1,5 mL.

Uzorci s komercijalnim želučanim sokom sadržavali su 650  $\mu$ L ekstrakta gorušice, 40  $\mu$ L HCl i 234  $\mu$ L SGF-a (simulirani želučani sok – engl. *simulated gastric fluid*) u kojem je otopljeno 1 mg/mL RGE-a (engl. *rabbit gastric extract*) (prema metodi Brodkorb i sur. (2019) uz modifikacije) i nadopunjeni destiliranom vodom do konačnog volumena 1,5 mL (52-54).

Uzorci s komercijalnim crijevnim sokom sadržavali su 650  $\mu$ L ekstrakta i 338  $\mu$ L SIF-a (simulirani crijevni sok – engl. *simulated intestinal fluid*) u kojem je otopljeno 5mg/mL pankreatina i 30 mg/mL žučnih soli. Ti su uzorci također nadopunjeni do konačnog volumena 1,5 mL.

Nakon pripreme uzorci su vorteksirani radi postizanja veće homogenosti sadržaja. Simulacija probave u želučanoj i crijevnoj fazi odvija se na 37 °C uz broj okretaja od 1200 okr/min u inkubatoru. Uzorci koji sadrže želučane probavne enzime inkubirani su 30 minuta, dok su uzorci s crijevnim probavnim enzimima inkubirani 120 minuta. Nakon inkubacije uzorci su stavljeni u posudu sa zdrobljenim ledom 5 minuta kako bi se zaustavila enzimatska reakcija. Nakon toga provedeno je centrifugiranje u vremenu 5 minuta na sobnoj temperaturi i uz 10000 okr/min kako bi se izdvojio supernatant od peleta.



Slika 11. Prikaz uzoraka u inkubatoru.

#### 4.6. Desulfatacija

1. Nakon probave supernatanti su mikropipetom prebačen u prethodno pripremljene kolone za ekstrakciju.
2. Nakon toga vrši se ispiranje kolona. U svaku kolonu je dva puta dodano po 1 mL 70% etanola kako bi se uklonile nepolarne molekule, a zatim je dodan 1 mL ultračiste vode kako bi se isprao etanol.
3. Potom je u svaku kolonu dodano dva puta po 1 mL NaOAc kako bi se postigli optimalni uvjeti za djelovanje sulfataze.
4. Zatim se posuda za otpad zamjenila stalkom u kojem su se nalazile označene tube za ekstrakte i iznad njega je pozicioniran stalak s kolonama.
5. U svaku kolonu je zatim dodano 20  $\mu$ L otopine sulfataze i 50  $\mu$ L NaOAc. Kolone su zatim prekrivene aluminijskom folijom i ostavljene preko noći.
6. Idući dan u kolone je dodano dva puta po 0,75 mL ultračiste vode kako bi se eluirali desulfoglukozinolati.
7. Dobiveni su uzorci prebačeni u bočice i čuvani na temperaturi od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.7. Određivanje enzimatske aktivnosti ljudskih i komercijalnih probavnih sokova (želučanih i crijevnih) pri volumenu od 20 $\mu$ L**

U svrhu određivanja enzimatske aktivnosti želučanog ljudskog soka korištena je 2,5%-tna otopina ljudskog hemoglobina pripremljena u fosfatnom puferu (pH 7,6). Otopina hemoglobina zakiseljena je koncentriranom sumpornom kiselinom 10  $\mu$ L na 1 mL hemoglobina. Za određivanje enzimatske aktivnosti ljudskog crijevnog soka korištena je 1%-tna otopina kazeina. Korišten je volumen uzorka od 20  $\mu$ L na 500  $\mu$ L otopine enzima (500  $\mu$ L otopine hemoglobina zakiseljene s koncentriranom sumpornom kiselinom za želučani sok i 500  $\mu$ L otopine kazeina za crijevni sok). Same enzimatske otopine su prije dodavanja uzorka stavljene na kratku inkubaciju u trajanju od 10 minuta pri temperaturi od 37 °C. U Eppendorf tube je zatim stavljeno 500  $\mu$ L enzimatske otopine i 20  $\mu$ L uzorka. Za uzorke slijepe probe enzimatska otopina s uzorkom odmah je prebačena u tubu u kojoj se nalazio 1 mL 10%-tna trikloroetene kiseline kako bi se odmah zaustavila enzimatska reakcija. Ostale tube stavljene su na inkubaciju u trajanju od 20 minuta na 37 °C. Nakon toga uzorci su prebačeni u tube koje su sadržavale 1 mL 10%-tne trikloroetene kiseline u svrhu zaustavljanja enzimatske reakcije probavljenih uzoraka. Uzorci su zatim kratko ostavljeni da se istalože, te potom stavljene na centrifugu na 10 minuta i uz 5000 okr/min. Nakon centrifugiranja odvojen je supernatant i prebačen u čiste tube te zatim u kvarcnu kivetu. Uzorcima je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 280 nm (55).

Očitane vrijednosti apsorbancija prikazane su u tablici 1. za ljudske probavne sokove i u tablici 2. za komercijalne.

**Tablica 1. Apsorbancija – ljudski probavni sokovi**

<b>Uzorak</b>	<b>Apsorbancija</b>
Želučani – slijepa proba 1	0,528
Želučani – slijepa proba 2	0,481
Želučani – probavljeni 1	1,973
Želučani – probavljeni 2	1,961
Crijevni – slijepa proba 1	0,195
Crijevni – slijepa proba 2	0,203
Crijevni – probavljeni 1	1,366
Crijevni – probavljeni 2	1,417

**Tablica 2. Apsorbancija – komercijalni probavni sokovi**

<b>Uzorak</b>	<b>Apsorbancija</b>
Želučani – slijepa proba 1	0,227
Želučani – slijepa proba 2	0,238
Želučani – probavljeni 1	1,307
Želučani – probavljeni 2	1,427
Crijevni – slijepa proba 1	0,208
Crijevni – slijepa proba 2	0,210
Crijevni – probavljeni 1	1,792
Crijevni – probavljeni 2	1,816



Enzimatska aktivnost izražava se u internacionalnim jedinicama, označeno s U (eng. *unit*). Razlika u apsorbanciji između pojedinog probavljenog uzorka i slijepe probe jednaka je broju U u tom uzorku.

Za ljudsku želučanu probavu dobivena je razlika u apsorbanciji od 1,4625. Dakle u 20  $\mu\text{L}$  uzorka enzimatska je aktivnost bila 1,4625 U. Tijekom eksperimentalnog rada korišten je volumen želučanog soka od 182  $\mu\text{L}$ . Ekstrapolacijom podataka dobivamo rezultat enzimske aktivnosti korištenog želučanog soka koja iznosi 13,31 U. Razlika u apsorbanciji uzoraka za ljudsku crijevnu probavu iznosila je 1,1925 za uzorak od 20  $\mu\text{L}$ . U radu je korišten volumen od 442  $\mu\text{L}$  čemu odgovara enzimatska aktivnost od 26,35 U.

Za komercijalni želučani probavni sok dobivena je razlika apsorbancije od 1,134 što predstavlja enzimsku aktivnost u 20  $\mu\text{L}$  uzorka. Tijekom rada korišteno je 234  $\mu\text{L}$  komercijalnog želučanog soka kojemu odgovara enzimatska aktivnost od 13,26 U. Za uzorak crijevnog probavnog soka dobivena je razlika u apsorbanciji od 1,595. U 20  $\mu\text{L}$  crijevnog probavnog soka prisutna je enzimatska aktivnost od 1,595 U što znači da je u korištenom volumenu od 338  $\mu\text{L}$  enzimatska aktivnost bila 26,96 U.

#### **4.8. HPLC-MS/MS analize**

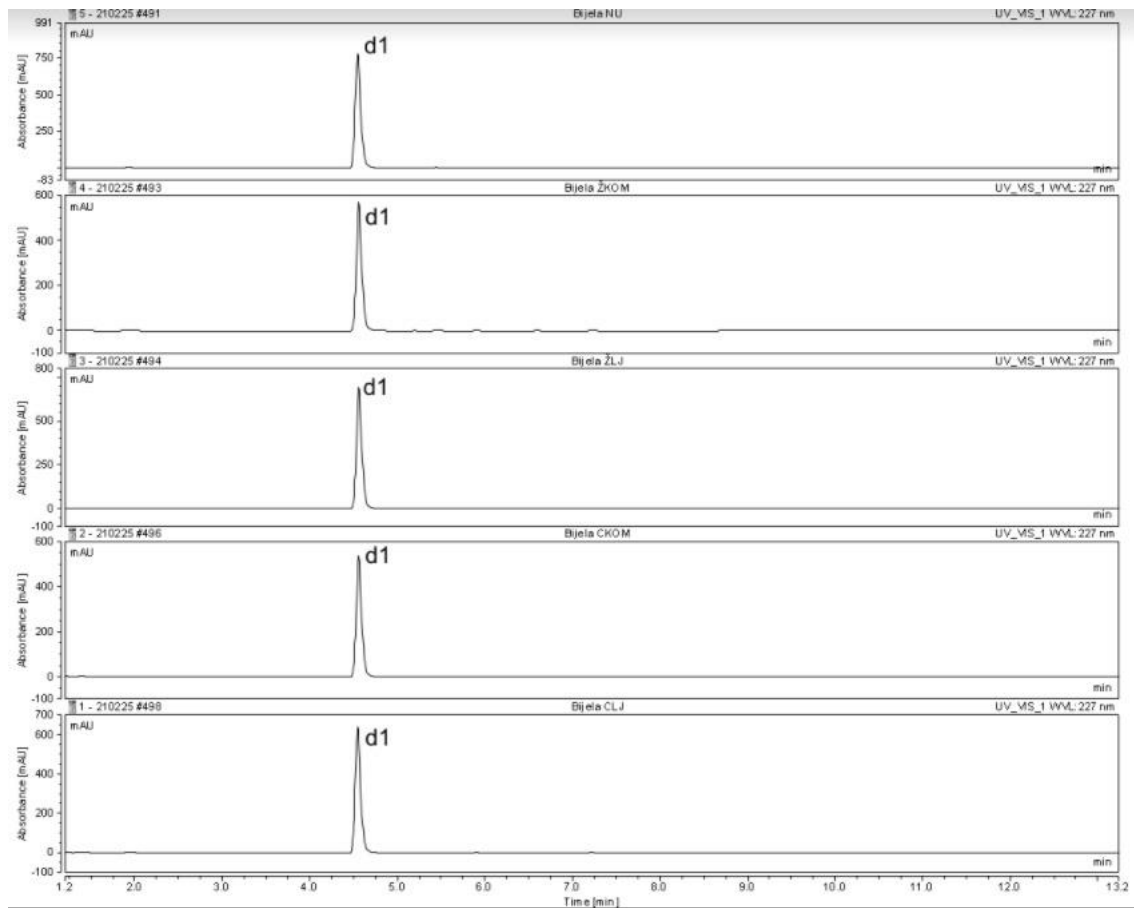
Analiza desulfatiranih glukozinolata dobivenih ekstrakcijom iz biljaka smeđe i bijele gorušice vršena je uređajem UHPLC-DAD-MS/MS Ultimate 3000RS s TSQ Quantis MS/MS detektorom (Thermo Fisher Scientific, SAD) na koloni Hypersil GOLD 3,0 mm  $\times$  100 mm s promjerom čestica 3  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher Scientific, SAD).

Kao mobilna faza korišteni su ultračista voda (otapalo A) i 30% acetonitril (otapalo B). Namješten je protok od 0,5 mL/min kako slijedi: 0,14 min 96% A i 4% B; 7,84 min 14% A i 86% B; 8,96 min 14% A i 86% B; 9,52 min 5% A i 95% B; 13,16 min 5% A i 95% B; 13,44 min 96% A i 4% B; 15,68 min 96% A i 4% B.

Volumen injektiranog uzorka je 5  $\mu\text{L}$  te je temperatura kolone postavljena i održavana na 25 °C. Signali su snimani DAD detektorom na valnoj duljini od 227 nm, a maseni spektri su snimani u pozitivnom načinu pri temperaturi od 350 °C.

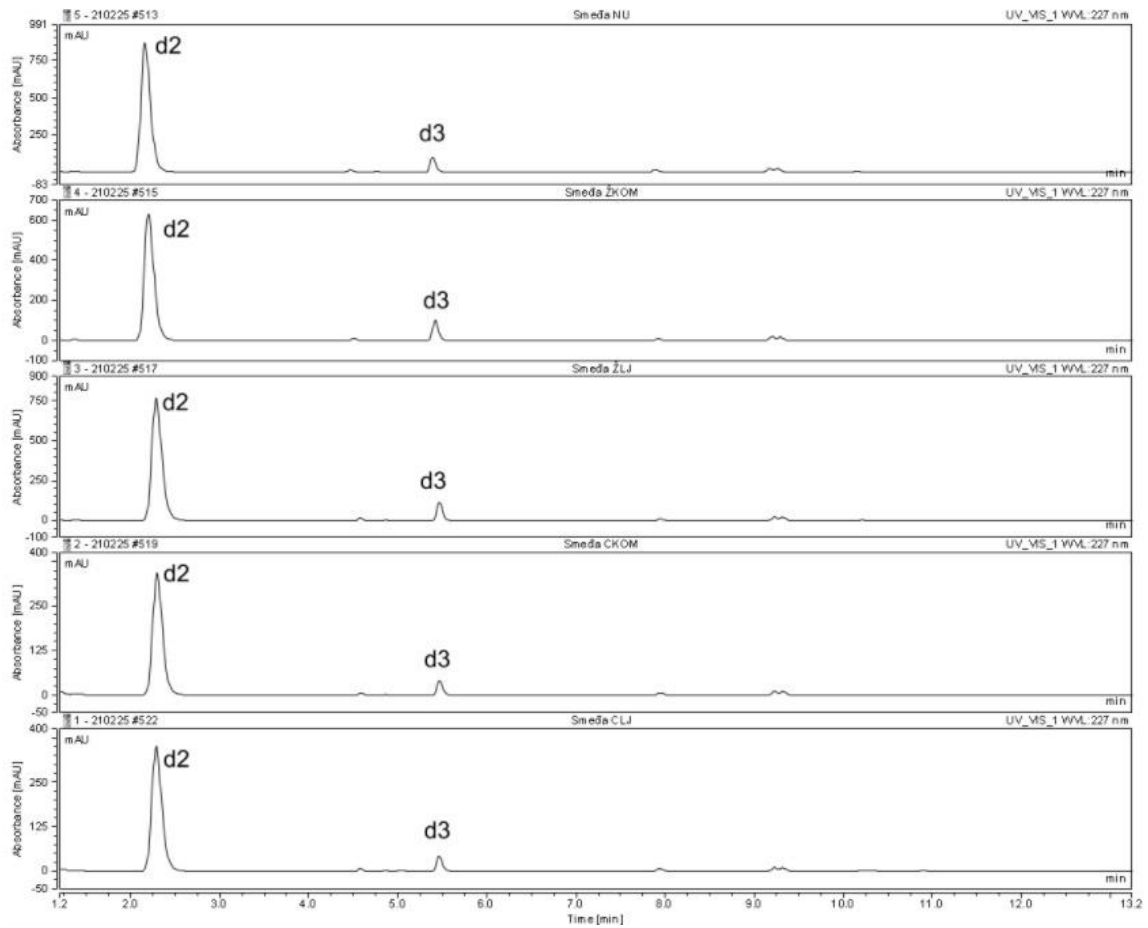
Za kvantizaciju desulfoglukozinolata korišten je desulfosinigrin kao eksterni standard, točnije baždarni pravac za raspon koncentracija od 13,56 do 542,50  $\mu\text{M}$ . Za izračun svakog pojedinog desulfoglukozinolata upotrijebljene su literaturne vrijednosti za faktore odziva.

Slika 12 prikazuje kromatogram bijele gorušice snimljen pri valnoj duljini od 227 nm. Grafovi prikazuju redom odozgo prema dolje - neprobavljeni uzorak, uzorak s komercijalnim želučanim sokom, uzorak s ljudskim želučanim sokom, uzorak s crijevnim komercijalnim sokom te uzorak s crijevnim ljudskim sokom.



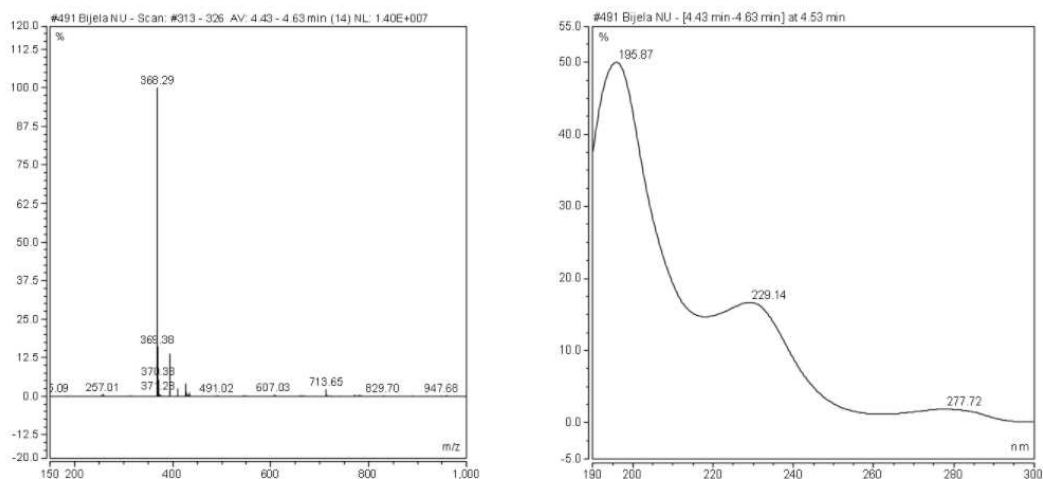
Slika 12. Kromatorami bijele gorušice u različitim fazama probave (odozgo prema dolje - neprobavljeni uzorak, uzorak s komercijalnim želučanim sokom, uzorak s ljudskim želučanim sokom, uzorak s crijevnim komercijalnim sokom te uzorak s crijevnim ljudskim sokom)

Slika 13 prikazuje kromatogram smeđe gorušice snimljen pri valnoj duljini od 227 nm. Grafovi prikazuju uzorke istim redosljedom kao i za bijelu gorušicu.

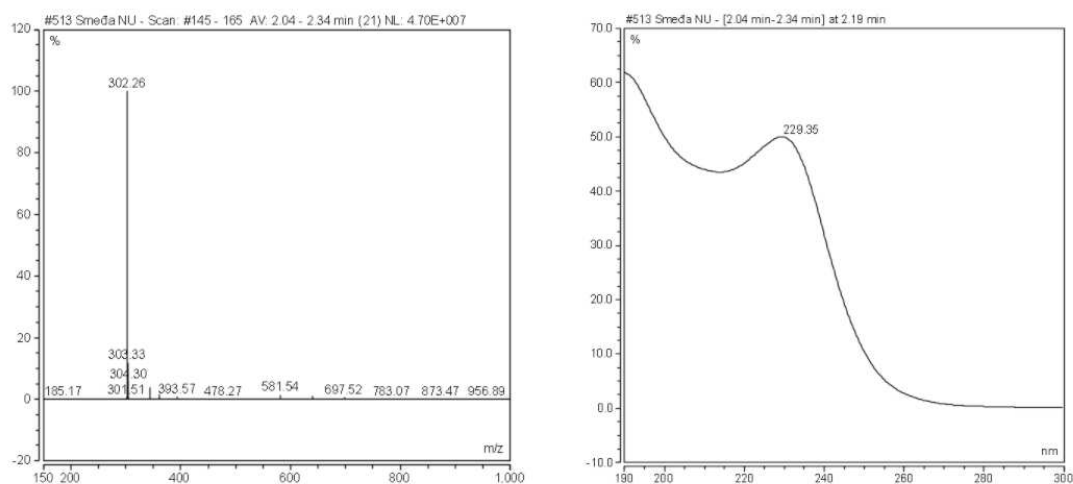


Slika 13. Kromatogrami smeđe gorušice u različitim fazama probave (odozgo prema dolje - neprobavljeni uzorak, uzorak s komercijalnim želučanim sokom, uzorak s ljudskim želučanim sokom, uzorak s crijevnim komercijalnim sokom te uzorak s crijevnim ljudskim sokom).

Slika 14 prikazuje maseni spektar i UV spektar glukosinalbina iz bijele gorušice, a slika 15 prikazuje maseni i UV spektar sinigrina iz smeđe gorušice.



Slika 14. Maseni (lijevo) i UV spektar (desno) glukosinalbina.



Slika 15. Maseni (lijevo) i UV spektar (desno) sinigrina.

## **5. REZULTATI**

Analizom provedenom uz pomoć UHPLC-DAD-MS/MS tehnike dobivene su koncentracije glukozinolata iz smeđe i bijele gorušice nakon što su uzorci biljnog materijala bili podvrgnuti simuliranom dvofaznom modelu probave koristeći ljudske i komercijalne enzime.

Glavni glukozinolat bijele gorušice je sinalbin. Tablica 3. prikazuje koncentraciju glukosinalbina izraženu u mikrogramima po gramu biljnog materijala u neprobavljenom uzorku i u uzorcima nakon pojedinih faza probave.

**Tablica 3. Koncentracija glukosinalbina u bijeloj gorušici**

Uzorci	Koncentracija ( $\mu\text{g/g}$ biljnog materijala)
Neprobavljeni uzorak	142,3255
Želučana faza - ljudski enzimi	121,8007
Želučana faza – komercijalni enzimi	106,6614
Crijevna faza – ljudski enzimi	114,2297
Crijevna faza – komercijalni enzimi	76,9118

Tablica 4. izražava postotak preostalog glukosinalbina u uzorcima nakon pojedinih faza probave. Neprobavljeni uzorak ima vrijednost od 100% jer nije podvrgnut nikakvim procesima probave.

**Tablica 4. Postotak koncentracije glukosinalbina u bijeloj gorušici**

Uzorci	Postotak (%)
Neprobavljeni uzorak	100,00
Želučana faza - ljudski enzimi	85,579
Želučana faza – komercijalni enzimi	74,942
Crijevna faza – ljudski enzimi	80,259
Crijevna faza – komercijalni enzimi	54,039

Sinigrin je glavni glukozinolat iz smeđe gorušice. Koncentracije sinigrina u neprobavljenom uzorku i u uzorcima podvrgnutim raznim fazama probave prikazane su u tablici 5.

**Tablica 5. Koncentracija sinigrina u smeđoj gorušici**

Uzorci	Koncentracija ( $\mu$ /g biljnog materijala)
Neprobavljeni uzorak	53,5558
Želučana faza - ljudski enzimi	50,0083
Želučana faza – komercijalni enzimi	34,0149
Crijevna faza – ljudski enzimi	22,1937
Crijevna faza – komercijalni enzimi	18,9373

U tablici 6. prikazani su postotci preostalog sinigrina u uzorcima smeđe gorušice nakon što su bili podvrgnuti simuliranim fazama probave. Neprobavljeni uzorak nije bio podvrgnut djelovanju enzima te njegova vrijednost u navedenoj tablici iznosi 100%.

**Tablica 6. Postotak koncentracije sinigrina u uzorcima smeđe gorušice**

Uzorci	Postotak (%)
Neprobavljeni uzorak	100,00
Želučana faza - ljudski enzimi	93,376
Želučana faza – komercijalni enzimi	63,513
Crijevna faza – ljudski enzimi	41,440
Crijevna faza – komercijalni enzimi	35,360

## **6. RASPRAVA**



U ovom radu istraživana je stabilnost glukozinolata sinigrina i sinalbina u želučanoj i crijevnoj fazi kao dvjema najvažnijim fazama probave glukozinolata.

Istraživanje je pokazalo kako su glukozinolati podložni razgradnji u obje faze probave. U crijevnoj fazi dokazana je manja stabilnost u odnosu na želučanu fazu. Postotak preostalog glukosinalbina u bijeloj gorušici iznosio je 85,58% u želučanoj fazi s ljudskim enzimima, dok je u crijevnoj fazi s ljudskim enzimima iznosio 80,26%. Nadalje, manja stabilnost uočena je prilikom uporabe komercijalnih enzima u usporedbi s ljudskim probavnim sokovima. Postotak preostalog glukosinalbina u želučanoj fazi koristeći komercijalne enzime iznosio je 74,94%, dok je u crijevnoj fazi s komercijalnim enzimima iznosio 54,04%. Slični su rezultati vidljivi u stabilnosti sinigrina iz smeđe gorušice. Postotak preostalog sinigrina u ljudskoj želučanoj fazi iznosio je 93,38%, a u crijevnoj ljudskoj fazi bio je 41,44%. Nadalje, postotak preostalog sinigrina u komercijalnoj želučanoj fazi iznosio je 63,51%, te 35,36% u komercijalnoj crijevnoj fazi.

Glukozinolati su sami po sebi stabilni i biološki neaktivni. Razgradni produkti glukozinolata su izotiocijanati, spojevi koji su odgovorni za biološku aktivnost. Stoga je podatak stabilnosti samih glukozinolata iznimno važan. Kako bi izotiocijanati postigli svoje djelovanje u organizmu važno je da imaju što veću biodostupnost i bioraspoloživost.

Biodostupnost definiramo kao frakciju hranjivih tvari oslobođenih u probavnom traktu koje su postale dostupne za apsorpciju, dok bioraspoloživost podrazumjeva dio koji je stigao u sistemsku cirkulaciju i dostupan je organizmu za iskorištavanje. Dakle, kako bi bioaktivna komponenta postigla svoj učinak mora biti oslobođena iz matriksa hrane i modificirana u gastrointestinalnom sustavu (56).

Iz rezultata ovog istraživanja vidljivo je da su glukozinolati podložni značajnoj razgradnji u ljudskom probavnom sustavu, osobito u crijevnoj fazi probave. Međutim, istraživanje je provedeno koristeći simulirani dvofazni model u kojemu nema protoka između dviju faza, iz smjera želučane u crijevu, kako to biva u *in vivo* uvjetima. To je činjenica koju je važno uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata.

Nadalje, komercijalni enzimi su u većoj mjeri razgrađivali glukozinolate u usporedbi s ljudskim enzimima. Ljudski probavni sokovi su složenog sastava, sadrže brojne enzime, inhibitore enzima te žučne soli. (57).

U konačnici, glukozinolati su prolaskom kroz ljudsku probavu podložni značajnoj razgradnji kojom dolazi do oslobađanja njihovih razgradnih produkata – izotiocijanta. Objе faze probave, želučana i crijevna, doprinose degradaciji glukozinolata no crijevna faza u većoj mjeri.

## **7. ZAKLJUČAK**

- Uravnotežena i zdrava prehrana neizostavan je dio brige o ljudskom zdravlju. Brojna nova istraživanja ukazuju na važnost bioaktivnih spojeva iz hrane u prevenciji i liječenju bolesti koje danas u svijetu imaju veliku prevalenciju poput kardiovaskularnih oboljenja, karcinoma, dijabetesa i slično.
- Glukozinolati i njihovi razgradni proizvodi – izotiocijanati važni su pojmovi i sastavnice suvremene zdrave i funkcionalne prehrane. Pokazuju obećavajuće i važne rezultate u borbi protiv bolesti, s posebnim naglaskom na antikancerogeno djelovanje.
- Glukosinalbin iz bijele gorušice pokazuje veću stabilnost u želučanoj fazi u odnosu na crijevnu. Nadalje, glukosinalbin pokazuje veću stabilnost pod utjecajem ljudskih enzima u usporedbi s komercijalnim enzimima u obje faze.
- Sinigrin iz smeđe gorušice također je stabilniji u želučanoj fazi u usporedbi s crijevnom fazom, te pokazuje veću stabilnost uz ljudske enzime u odnosu na komercijalne u objema fazama.

## **8. LITERATURA**

1. Wan MLY, Ling KH, El-Nezami H, Wang MF. Influence of functional food components on gut health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59:1927-36.
2. Alkhatib A, Tsang C, Tiss A, Bahorun T, Arefanian H, Barake R, Khadir A i sur. Functional foods and lifestyle approaches for diabetes prevention and management. *Nutrients.* 2017;9:1310.
3. Bischoff KL. Chapter 40 – Glucosinolates. U: Gupta RC, urednici. *Nutraceuticals.* Prvo izdanje. Academic Pres; 2016. str. 551-4.
4. Nikolov LA. Brassicaceae flowers: diversity amid uniformity. *J Exp Bot.* 2019;70:2623-35.
5. Šamec D, Salopek-Sondi B. Cruciferous (Brassicaceae) vegetables. U: Nabavi SM, Silva AS, urednici. *Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements.* Elsevier; 2019. str. 195–202.
6. Mitrović PM, Stamenković OS, Banković-Ilić I, Djalović IG, Nježić ZB, Farooq M i sur. White mustard (*Sinapis alba* L.) oil in biodiesel production: a review. *Front Plant Sci.* 2020;11:299.
7. Thakur AK, Parmar N, Singh KH, Nanjundan J. Current achievements and future prospects of genetic engineering in Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern & Coss.). *Planta.* 2020;252:56.
8. Galanakis C. *Nutraceutical and functional food components.* Prvo izdanje. Academic Press; 2017. 6. str.
9. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF i sur. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med.* 2002;113:71-88.
10. Santos DI, Saraiva JMA, Vicente AA, Moldão-Martins M. Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. U: Barba FJ, Saraiva JMA, Cravotto G, Lorenzo JM, urednici. *Innovative thermal and non-thermal processing, bioaccessibility and bioavailability of nutrients and bioactive compounds.* Prvo izdanje. Cambridge: Woodhead Publishing; 2019. str. 23-54.
11. Redovnikovic IR, Glivetic T, Delonga K, Vorkapić-Furač J. Glucosinolates and their potential role in plant. *Period Biol.* 2008;110:297–309.
12. Nguyen VPT, Stewart J, Lopez M, Ioannou I, Allais F. Glucosinolates: natural occurrence, biosynthesis, accessibility, isolation, structures, and biological activities. *Molecules.* 2020;25:4537.

13. Barba FJ, Nikmaram N, Roohinejad S, Khelifa A, Zhu Z, Koubaa M. Bioavailability of glucosinolates and their breakdown products: impact of processing. *Front Nutr.* 2016;16:3.
14. PubChem. Sinigrin. [Internet] [citirano 06.09.2021.] Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sinigrin>
15. Bischoff KL. Glucosinolates. U: Gupta RC, Lall R, Srivastava A, urednici. *Nutraceuticals. Drugo izdanje.* Academic Press; 2021. str. 903–9.
16. Tanii H. Allyl nitrile: toxicity and health effects. *Jrnl of Occup Health.* 2017;59:104–11.
17. Mazumder A, Dwivedi A, du Plessis J. Sinigrin and its therapeutic benefits. *Molecules.* 2016;21:416.
18. Borek V, Morra MJ. Ionic thiocyanate (SCN<sup>-</sup>) production from 4-hydroxybenzyl glucosinolate contained in *Sinapis alba* seed meal. *J Agric Food Chem.* 2005;53:8650-4.
19. PubChem. Sinalbin. [Internet] [citirano 06.09.2021.] Dostupno na : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sinalbin#section=3D-Status>
20. Le TN, Chiu C-H, Hsieh P-C. Bioactive compounds and bioactivities of *brassica oleracea* L. var. *italica* sprouts and microgreens: an updated overview from a nutraceutical perspective. *Plants.* 2020;9:946.
21. Gupta C, Prakash D, Gupta, S. Relationships between bioactive food components and their health benefits. U: Martiroszan DM, urednici. *Introduction to functional food science.* Prvo izdanje. Dallas: Food Scienc Publisher; 2013. str. 66-85.
22. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2:270-8.
23. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016;5:47.
24. Eggersdorfer M, Wyss A. Carotenoids in human nutrition and health. *Arch Biochem Biophys.* 2018;652:18-26.
25. Shahidi F, Ambigaipalan P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2018;9:345-81.
26. Williams NT. Probiotics. *Am J Health Syst Pharm.* 2010;67:449-58.
27. Butel MJ. Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect.* 2014;44:1-8.
28. Johnson IT. Glucosinolates: bioavailability and importance to health. *Int J Vitam Nutr Res.* 2002;72:26-31.
29. Miękus N, Marszałek K, Podlacha M, Iqbal A, Puchalski C, Świergiel AH. Health benefits of plant-derived sulfur compounds, glucosinolates, and organosulfur compounds. *Molecules.* 2020;25:3804.

30. Chen S, Andreasson E. Update on glucosinolate metabolism and transport. *Plant Physiol Biochem.* 2001;39:743–58.
31. Prieto MA, López CJ, Simal-Gandara J. Glucosinolates: molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. *Adv Food Nutr Res.* 2019;90:305-50.
32. Dinkova-Kostova AT, Kostov RV. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol Med.* 2012;18:337-47.
33. Johnstone C, Hendry C, Farley A, McLafferty E. The digestive system: part 1. *Nurs Stand.* 2014;28:37-45.
34. Hellström PM, Grybäck P, Jacobsson H. The physiology of gastric emptying. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2006;20:397-407.
35. Volk N, Lacy B. Anatomy and physiology of the small bowel. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2017;27:1-13.
36. Azzouz LL, Sharma S. Physiology, large intestine. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2021.
37. Macfarlane GT, Macfarlane S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *J Clin Gastroenterol.* 2011;45:120-7.
38. Bornhorst GM, Paul Singh R. Gastric digestion in vivo and in vitro: how the structural aspects of food influence the digestion process. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2014;5:111-32.
39. Boland M. Human digestion--a processing perspective. *J Sci Food Agric.* 2016;96:2275-83.
40. Hendry C, Farley A, McLafferty E, Johnstone C. The digestive system: part 2. *Nurs Stand.* 2014;28:37-44.
41. Fiziologija prehrane - EduCooking-Tour. [Internet] [citirano 11.08.2021.] Dostupno na: <https://edu.cooking-tour.eu/fiziologija-prehrane>
42. Brodkorb A, Egger L, Alming M, Alvito P, Assunção R, Ballance S i sur. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc.* 2019;14:991-1014.
43. Dupont D, Alric M, Blanquet-Diot S, Bornhorst G, Cueva C, Deglaire A i sur. Can dynamic *in vitro* digestion systems mimic the physiological reality? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59:1546-62.

44. Ulleberg EK, Comi I, Holm H, Herud EB, Jacobsen M, Vegarud GE. Human gastrointestinal juices intended for use in in vitro digestion models. *Food Dig.* 2011;2:52-61.
45. Heda R, Toro F, Tombazzi CR. Physiology, Pepsin. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing;2021.
46. Patricia JJ, Dhamoon AS. Physiology, Digestion. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing;2021.
47. Šegudović, I. Određivanje rezidua sulfonamida u medu LC-MS/MS metodom [diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 2016.
48. Vučilovski, J. Razvoj i validacija HPLC metode za karakterizaciju bioaktivnog sastava biljnih sirovina. [diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 2016.
49. McMurry J. Organic chemistry: with biological applications. Drugo izdanje. Belmont: Brooks/Cole; 2011. 395 str.
50. Džambić, D. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti [diplomski rad]. Osijek: Sveučilište u Osijeku; 2019.
51. Cindrić, M, Marković, A, Horvatić, A. Sprengute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina: glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora.* 2009;3:218-32.
52. Blažević I, Đulović A, Burčul F, Popović M, Montaut S, Bilušić T i sur. Stability and bioaccessibility during *ex vivo* digestion of glucoraphenin and glucoraphasatin from *Matthiola incana* L. *J. Food Compos Anal.* 2020;90:1-7.
53. Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assuncao R, Ballance S i sur. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc* 2019;14:991-1014.
54. Vrca I, Burčul F, Blažević I, Bratanić A, Bilušić T. Comparison of gastrointestinal stability of isothiocyanates from *Tropaeolum majus* L. *altum* using in vitro and ex vivo digestion methods. *Croat J Food Sci Technol.* 2021. doi:10.17508/CJFST.2021.13.2.04
55. Almaas H, Cases AL, Devold TG, Holm H, Langsrud T, Aabakken L i sur. In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *Int. Dairy J.* 2006;16:961-8.
56. Vanduchova A, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Isothiocyanate from Broccoli, Sulforaphane, and Its Properties. *J Med Food.* 2019;22:121-6.
57. Vrca, I. Gastrointestinalna stabilnost i biološka aktivnost sumporovih spojeva iz porodice Brassicaceae [seminarski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 2020.



## **9. SAŽETAK**

### **Cilj istraživanja:**

Cilj istraživanja bilo je utvrditi stabilnost sinigrina i sinalbina u dvofaznom simuliranom probavnom sustavu. Ispitivani su sinalbin iz bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i sinigrin iz smeđe gorušice (*Brassica juncea* L.) koristeći metodu simulacije želučane i crijevne faze. Daljni cilj bio je usporediti stabilnost glukozinolata u odnosu na komercijalne i ljudske enzime u svakoj od dviju faza probave.

### **Materijali i metode:**

Kao uzorak korištena su sjemena bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i smeđe gorušice (*Brassica juncea* L.). Za simuliranje ljudske želučane i crijevne faze korišteni su ljudski želučani i crijevni sokovi skupljeni u Kliničkom bolničkom centru Split, a kao komercijalni enzimi korištene su smjese SGF (eng. *simulated gastric fluid*) za želučanu i SIF (eng. *simulated intestinal fluid*) za crijevnu fazu.

Rezultati su obrađivani na spojenom sustavu HPLC-DAD-MS/MS.

### **Rezultati:**

Rezultati su prikazani tablično kao koncentracija te postotak preostalih glukozinolata u biljnom materijalu. Veća stabilnost dokazana je u želučanoj fazi u odnosu na crijevnu fazu za oba glukozinolata. Nadalje, veća stabilnost uočena je prilikom korištenja ljudskih probavnih sokova u usporedbi s komercijalnim smjesama enzima, također za oba glukozinolata i u objema fazama probave.

### **Zaključci:**

Izlaganje glukozinolata, u ovom slučaju sinigrina i sinalbina, probavnim sokovima dovodi do njihove degradacije i nastajanja razgradnih produkata izotiocijanata. Glukozinolati su podložni razgradnji i u želučanoj i u crijevnoj fazi probave, no veća razgradnja zbiva se u crijevima. Nadalje, komercijalni enzimi u većoj mjeri razgrađuju glukozinolate od ljudskih probavnih enzima, no u obzir se mora uzeti velika interindividualna varijabilnost između ljudskih probavnih sokova.

## **10. SUMMARY**

**Objectives:**

The aim was to determine the stability of sinigrin and sinalbin in a two-phase simulated digestive system. Sinalbin from white mustard (*Sinapis alba* L.) and sinigrin from brown mustard (*Brassica juncea* L.) were studied using a method that simulates the gastric and intestinal phases. Another objective was to compare the stability of glucosinolates in relation to human and commercial enzymes in each of the two digestion phases.

**Materials and methods:**

White mustard (*Sinapis alba* L.) and brown mustard (*Brassica juncea* L.) seeds were used as samples. To simulate the human gastric and intestinal phases, human gastric and intestinal juices collected from the University Hospital of Split were used. SGF (simulated gastric fluid) for gastric phase and SIF (simulated intestinal fluid) for intestinal phase were used as commercial mixtures. The results were analyzed using HPLC-DAD-MS/MS system.

**Results:**

The results are shown tabulary as the concentration and percentage of remaining glucosinolates in plant material. Higher stability was demonstrated in the gastric phase compared to the intestinal phase. Moreover, when human digestive juices were used, higher stability was observed compared to commercial enzyme mixtures for both glucosinolates and in both digestive phases.

**Conclusions:**

When glucosinolates, in this case sinigrin and sinalbin, are exposed to digestive juices it leads to their degradation and the formation of their degradation products isothiocyanates. Glucosinolates can be degraded in both the gastric and intestinal phase, with degradation being greater in the intestine. In addition, commercial enzymes degrade glucosinolates more than human digestive enzymes, although the large interindividual variability between human digestive juices must be taken into account.

## **11. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI**

Ime i prezime: Leah Radinović

Datum i mjesto rođenja: 24.06.1997., Karlovac RH

Adresa: Gornje Bukovlje 11b, 47250 Duga Resa

Email: le.radinovic@gmail.com

## **OBRAZOVANJE**

2004. - 2008. – Osnovna škola "Vladimir Nazor" Duga Resa – Područna škola Zvečaj, RH

2008. - 2009. – Osnovna škola "Vladimir Nazor", Duga Resa, RH

2009. - 2012. – Osnovna škola "Dragojla Jarnević", Karlovac, RH

2012. – 2016. – Gimnazija Karlovac, Karlovac, RH

2016. – 2021. – Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet; smjer: farmacija

## **RADNO ISKUSTVO**

Veljača 2021. – kolovoz 2021. - Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Marjan

## **POSEBNE VJEŠTINE**

Rad na računalu: MS office, Eskulap 2000

Strani jezici: engleski, njemački