

# Gastrointestinalna stabilnost izotiocijanata iz mikrovalnog ekstrakta biljke dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) nakon dvofaznog simuliranog modela probave

---

**Antolović, Nikolina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:166415>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-20**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



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

**GASTROINTESTINALNA STABILNOST**  
**IZOTIOCIJANATA IZ MIKROVALNOG EKSTRAKTA**  
**BILJKE DRAGOLJUB (*TROPAEOLUM MAJUS L.*)**  
**NAKON DVOFAZNOG SIMULIRANOG MODELA**  
**PROBAVE**

**ZAVRŠNI RAD**

**NIKOLINA ANTOLOVIĆ**

**Matični broj: 40**

**Split, listopad, 2019.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

**GASTROINTESTINALNA STABILNOST**  
**IZOTIOCIJANATA IZ MIKROVALNOG EKSTRAKTA**  
**BILJKE DRAGOLJUB (*TROPAEOLUM MAJUS L.*)**  
**NAKON DVOFAZNOG SIMULIRANOG MODELA**  
**PROBAVE**

**ZAVRŠNI RAD**

**NIKOLINA ANTOLOVIĆ**

**Matični broj: 40**

**Split, listopad, 2019.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**FOOD TECHNOLOGY**

**GASTROINTESTINAL STABILITY OF  
ISOTHIOCYANATES FROM NASTURTIUM  
(*TROPAEOLUM MAJUS* L.) MICROWAVE EXTRACT  
AFTER SIMULATED TWO-PHASE DIGESTION  
PROCESS**

**BACHELOR THESIS**

**NIKOLINA ANTOLOVIĆ**

**Parent number: 40**

**Split, October 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Prehrambena tehnologija

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Tema rada** je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.  
**Mentor:** prof. dr. sc. Tea Bilušić  
**Pomoć pri izradi:** Ivana Vrca, dipl. ing. cheming., doc. dr. sc. Franko Burčul

### GASTROINTESTINALNA STABILNOST IZOTIOCIJANATA IZ MIKROVALNOG EKSTRAKTA BILJKE DRAGOLJUB (*TROPAEOLUM MAJUS L.*) NAKON DVOFAZNOG SILMULIRANOG MODELA PROBAVE

Nikolina Antolović, 40

#### Sažetak:

Dragoljub (*Tropaeolum majus L.*) je jednogodišnja zeljasta biljka koja je bogat izvor vitamina C, ali i brojnih drugih biološki aktivnih komponenti za koje je dokazano da imaju ljekovita svojstva. Pripada maloj porodici Tropaeolaceae koja spada u red Capparales. Posebno značajna skupina biološki aktivnih spojeva koji se mogu naći u dragoljebu su glukozinolati. Oni su kemijski stabilni i biološki neaktivni spojevi, dok njihovi razgradni produkti mogu imati različite pozitivne učinke na organizam. U ovom radu analizirano je eterično ulje koje je izolirano iz sjemenki dragoljuba postupkom mikrovalne ekstrakcije. Identifikacija spojeva u eteričnom ulju koji nastaju hidrolizom glukozinolata provedena je GC-MS tehnikom. Rezultati ove analize pokazali su prisutnost dva spoja, benzil nitrila u maloj i benzil izotiocijanata u prevladavajućoj količini. Cilj je bio ispitati gastrointestinalnu stabilnost benzil izotiocijanata u dvofazno simuliranom modelu probave. Biodostupnost nekog spoja označava količinu tog spoja koja se oslobađa u probavnom traktu i postaje dostupna za apsorpciju. Nakon provedenog modela *in vitro* probave, analiza urađena GC-FID tehnikom pokazala je veću stabilnost benzil izotiocijanata u želučanoj fazi u odnosu na crijevnu fazu probave i samim time veću biodostupnost ovog spoja u želucu.

**Cljučne riječi:** dragoljub, benzil izotiocijanat, biodostupnost, GC-MS, GC-FID

**Rad sadrži:** 35 stranica, 11 slika, 3 tablice, 25 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

- |                                 |             |
|---------------------------------|-------------|
| 1. doc. dr. sc. Franko Burčul   | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Danijela Skroza | član        |
| 3. prof. dr. sc. Tea Bilušić    | član-mentor |

**Datum obrane:** 16. listopada 2019.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Food Technology**

**Scientific area:** Life sciences  
**Scientific field:** Food technology  
**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19.  
**Mentor:** Tea Bilušić, Ph. D., Full Professor  
**Technical assistance:** Ivana Vrca, B. Sc., Franko Burčul, Ph. D., Assistant Professor

### **GASTROINTESTINAL STABILITY OF ISOTHIOCYANATES FROM NASTURTIIUM (*TROPAEOLUM MAJUS* L.) MICROWAVE EXTRACT AFTER SIMULATED TWO-PHASE DIGESTION PROCESS**

Nikolina Antolović, 40

#### **Abstract:**

Nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) is an annual herbaceous plant, which is a rich source of vitamin C as well as other numerous biologically active compounds which are proved to have healing properties. It belongs to the small family Tropaeolaceae that belongs to the order Capparales. A particularly significant group of biologically active compounds that can be found in nasturtium are glucosinolates. They are chemically stable and biologically inactive compounds, while their degradation products can have various positive effects on the body. In this thesis essential oil isolated from nasturtium seeds by microwave extraction was analysed. The identification of compounds in the essential oil formed by glucosinolate hydrolysis was conducted using GC-MS technique. The results of this analysis showed the presence of two compounds, benzyl nitrile in small and benzyl isothiocyanate in the predominant amount. The aim was to examine the gastrointestinal stability of benzyl isothiocyanate in a simulated two-phase digestion model. The bioavailability of a compound indicates the amount of that compound that is released in the digestive tract and becomes available for absorption. Following an *in vitro* digestion model, analysis performed using GC-FID technique showed greater stability of benzyl isothiocyanate in the gastric phase relative to the intestinal digestion phase and, consequently, greater bioaccessibility of this compound in the stomach.

**Keywords:** nasturtium, benzyl isothiocyanate, bioaccessibility, GC-MS, GC-FID

**Thesis contains:** 35 pages, 11 figures, 3 tables, 25 references

**Original in:** Croatian

#### **Defence committee:**

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Franko Burčul, Ph. D., assistant prof.   | chair person |
| 2. Danijela Skroza, Ph. D., assistant prof. | member       |
| 3. Tea Bilušić, Ph. D., full prof.          | supervisor   |

**Defence date:** October 16, 2019

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Tee Bilušić, u razdoblju od siječnja do listopada 2019. godine.*

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



## ZAHVALA

*Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Tei Bilušić na stručnim savjetima, uloženom trudu, vremenu, prenesenom znanju i detaljnom vođenju prilikom izrade ovoga rada. Zahvaljujem se i asistentici Ivani Vrci, dipl. ing. cheming. na velikodušnoj pomoći koja mi je olakšala izradu ovog rada, kao i na prijateljski posvećenom vremenu, zalaganju i strpljenju. Također, zahvaljujem se i doc. dr. sc. Franku Burčulu na susretljivosti i pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada.*

*Posebno se želim zahvaliti svojoj obitelji na pomoći, bezuvjetnoj podršci, motivaciji i razumijevanju koje su mi pružili tijekom cijelog studiranja, kao i svim prijateljima i kolegama koji su mi bili potpora.*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Izolirati eterično ulje iz sjemenki biljke dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) postupkom mikrovalne ekstrakcije.
- Identificirati prisutne spojeve u mikrovalnom ekstraktu korištenjem vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS).
- Odrediti biodostupnost izotiocijanata nakon dvofaznog simuliranog modela probave uz pomoć plinskog kromatografa s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID).

## SAŽETAK

Dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka koja je bogat izvor vitamina C, ali i brojnih drugih biološki aktivnih komponenti za koje je dokazano da imaju ljekovita svojstva. Pripada maloj porodici Tropaeolaceae koja spada u red Capparales. Posebno značajna skupina biološki aktivnih spojeva koji se mogu naći u dragoljebu su glukozinolati. Oni su kemijski stabilni i biološki neaktivni spojevi, dok njihovi razgradni produkti mogu imati različite pozitivne učinke na organizam. U ovom radu analizirano je eterično ulje koje je izolirano iz sjemenki dragoljuba postupkom mikrovalne ekstrakcije. Identifikacija spojeva u eteričnom ulju koji nastaju hidrolizom glukozinolata provedena je GC-MS tehnikom. Rezultati ove analize pokazali su prisutnost dva spoja, benzil nitrila u maloj i benzil izotiocijanata u prevladavajućoj količini. Cilj je bio ispitati gastrointestinalnu stabilnost benzil izotiocijanata u dvofazno simuliranom modelu probave. Biodostupnost nekog spoja označava količinu tog spoja koja se oslobađa u probavnom traktu i postaje dostupna za apsorpciju. Nakon provedenog modela *in vitro* probave, analiza urađena GC-FID tehnikom pokazala je veću stabilnost benzil izotiocijanata u želučanoj fazi u odnosu na crijevnu fazu probave i samim time veću biodostupnost ovog spoja u želucu.

**Ključne riječi:** dragoljub, benzil izotiocijanat, biodostupnost, GC-MS, GC-FID

## SUMMARY

Nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) is an annual herbaceous plant, which is a rich source of vitamin C as well as other numerous biologically active compounds which are proved to have healing properties. It belongs to the small family Tropaeolaceae that belongs to the order Capparales. A particularly significant group of biologically active compounds that can be found in nasturtium are glucosinolates. They are chemically stable and biologically inactive compounds, while their degradation products can have various positive effects on the body. In this thesis essential oil isolated from nasturtium seeds by microwave extraction was analysed. The identification of compounds in the essential oil formed by glucosinolate hydrolysis was conducted using GC-MS technique. The results of this analysis showed the presence of two compounds, benzyl nitrile in small and benzyl isothiocyanate in the predominant amount. The aim was to examine the gastrointestinal stability of benzyl isothiocyanate in a simulated two-phase digestion model. The bioavailability of a compound indicates the amount of that compound that is released in the digestive tract and becomes available for absorption. Following an *in vitro* digestion model, analysis performed using GC-FID technique showed greater stability of benzyl isothiocyanate in the gastric phase relative to the intestinal digestion phase and, consequently, greater bioaccessibility of this compound in the stomach.

**Keywords:** nasturtium, benzyl isothiocyanate, bioaccessibility, GC-MS, GC-FID

# SADRŽAJ

UVOD .....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1. Opće karakteristike biljke dragoljub .....	2
1.1.1. Botanička svojstva .....	2
1.1.2. Kemijski sastav .....	3
1.1.3. Ljekovita svojstva i primjena.....	5
1.2. Biološki aktivni spojevi zastupljeni u biljci dragoljub.....	6
1.2.1. Glukozinolati .....	7
1.2.1.1. Kemijska struktura i vrste glukozinolata.....	8
1.2.1.2. Razgradnja glukozinolata .....	9
1.2.1.2.1. Enzimski razgradnja glukozinolata.....	9
1.2.1.2.2. Neenzimska razgradnja glukozinolata.....	10
1.2.1.3. Produkti razgradnje – izotiocijanati.....	11
1.2.1.4. Gastrointestinalna stabilnost glukozinolata.....	11
1.2.2. Dragoljub kao prirodni izvor glukozinolata.....	13
1.3. Mikrovalna ekstrakcija.....	14
1.3.1. Načelo rada mikrovalne ekstrakcije.....	15
1.3.2. Čimbenici koji utječu na mikrovalnu ekstrakciju .....	15
1.4. Plinska kromatografija .....	17
1.4.1. GC-MS.....	18
1.4.2. GC-FID .....	19
1.5. <i>In vitro</i> probava .....	19
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	21
2.1. Kemikalije i aparatura .....	21
2.2. Priprema biljnog materijala.....	21
2.3. Mikrovalna ekstrakcija.....	22
2.4. GC-MS .....	23
2.5. Uparavanje u struji dušika.....	24
2.6. <i>In vitro</i> dvofazni model probave .....	26
2.7. GC-FID .....	27
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	29
3.1. Rezultati GC-MS analize eteričnog ulja biljke dragoljub .....	29

3.2. Rezultati GC-FID analize nakon <i>in vitro</i> probave .....	31
4. ZAKLJUČAK.....	33
5. LITERATURA.....	34

## UVOD

U današnje vrijeme sve više raste svijest, kako nutricionista, prehrambenih tehnologa te općenito same prehrambene industrije pa tako i potrošača, o važnosti utjecaja prehrane na zdravlje ljudi. Već je od prije poznato, ali i mnoga istraživanja su potvrdila kako prehrana bogata različitim voćem i povrćem može imati razne pozitivne učinke na ljudski organizam. Takvi učinci se pripisuju visokom sadržaju vitamina, ali i brojnih drugih bioaktivnih komponenti koje ovisno o sadržaju u konzumiranom proizvodu te njegovoj biodostupnosti nakon konzumacije, mogu imati različit utjecaj na zdravlje. Brojni biološki aktivni spojevi su podvrgnuti istraživanju, a neki od najvažnijih su glukozinolati, polifenoli, karotenoidi, folati, itd.

Dragoljub je biljka koja se najviše upotrebljavala u dekorativne svrhe, ali zbog svog nutritivnog značaja u posljednjih nekoliko godina koristi se i u prehrani. Iako je dragoljub još uvijek nedovoljno istražena biljka, poznato je da ima određena ljekovita svojstva zbog kojih se još od davnina koristi u narodnoj medicini. Glukozinolati su vrlo važna i specifična skupina sekundarnih metabolita koji se mogu pronaći u nekim biljnim vrstama. Njihovom hidrolizom nastaju različiti razgradni produkti koji imaju brojne biološke utjecaje na zdravlje ljudi. Osim toga, glukozinolati su zanimljivi zbog toga što osiguravaju karakterističnu aromu određenim vrstama povrća te tako utječu na senzorske karakteristike pojedinih vrsta.

Kako bi se mogao odrediti pozitivan utjecaj neke biološki aktivne komponente na ljudsko zdravlje, potrebno je prvo analizirati utjecaj procesa probave na stabilnost te bioaktivne komponente, odnosno potrebno je odrediti njenu biodostupnost. Cilj ovog rada jest istražiti stabilnost izotiocijanata koji je prisutan u eteričnom ulju biljke dragoljub nakon izlaganja eksperimentalnim *in vitro* uvjetima želučane i crijevne digestije.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Opće karakteristike biljke dragoljub

Dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka bogata vitaminom C i mnogim drugim biološkim tvarima te se stoga može koristiti u brojne svrhe koje pridonose zdravlju. Iako se dragoljub najčešće koristi kao ukrasna biljka, njegovi cvjetovi, lišće i sjemenke su jestivi te je sve više zastupljen u ljudskoj prehrani ili kao dekorativni element jelima.[1] Dragoljub pripada maloj porodici Tropaeolaceae te je ujedno i najčešće uzgajani član te porodice. Prvobitno potječe iz države Peru, a krajem 17. stoljeća se proširio na Nizozemsku i ostale države širom Europe. Upravo zbog toga što ima visoku koncentraciju vitamina C široko se rasprostranio u luke, obalna područja i oceanske otoke, jer je služio kao antiskorbutik mornarima na dugim putovanjima morem. Tako se danas dragoljub može lako pronaći duž cijele obale Jadranskog mora.[2]

### 1.1.1. Botanička svojstva

Postoje mnoge podvrste ove biljke koje se razlikuju prema strukturi, veličini i boji cvijeta pa se tako može govoriti o vrstama koje imaju duge ili kratke izdanke. Dragoljub ima puzajuću, razgranatu stabljiku koja može biti duga između 30 centimetara i 5 metara. Izdanci su mesnati, debeli i krhki te se lako ukorijene u tlo. Listovi su okrugli s mekanim rubovima žuto-zelene boje i nalaze se na dugim vijugavim peteljka. Cvjetovi su veliki, prosječne širine 4 do 5 centimetara i sastoje se od pet latica čija boja varira od žute, preko narančaste do crvene. Korijen biljke je kratak i razgranat. Dragoljub ima karakterističan oštar miris i cvijeta u razdoblju od svibnja do studenog.[3]

Zbog svog porijekla vrlo je osjetljiv na niske temperature, a najbolje raste na sunčanim ili malo zasjenjenim mjestima. Sjemenke počinju klijati nakon 15 do 20 dana, a cvjetanje se odvija 8 do 10 tjedana nakon klijanja. Za optimalan rast biljke najpogodnija su lagana tla srednje plodnosti i vlažnosti. Pretjerano korištenje dušikovog gnojiva može imati negativan učinak na biljku što u konačnici rezultira stvaranjem velikog broja listova, a manjeg broja cvjetova. Uzgoj biljke uključuje aeraciju tla i uklanjanje korova.[3]



Na slici 1. su prikazani cvijet, listovi, korijen i stabljika biljke dragoljub koja ima dugi izdanak, odnosno vrsta *Tropaeolum majus* L., koja je i korištena za potrebe ovog rada.



Slika 1. Izgled biljke dragoljub (*Tropaeolum majus* L.) [4]

### 1.1.2. Kemijski sastav

Kemijski sastav dragoljuba nije u potpunosti istražen, ali se iz dostupne literature može vidjeti da se kemijski sastav razlikuje ovisno o dijelu biljke, načinu i mjestu uzgoja te boji cvijeta. Dio biljke koji se zapravo najviše istraživao su cvjetovi.[3]

Postoji velika razlika u kemijskom sastavu između sjemenki i cvjetova ove biljke što je prikazano u tablici 1. Također je vidljivo da su sjemenke bogatiji izvor proteina, vlakana i masti.

Tablica 1. Sadržaj hranjivih tvari u dragoljubu (*Tropaeolum majus* L.) [5,6]

Komponente	Prosječan sadržaj u sjemenkama (%)	Prosječan sadržaj u cvjetovima (%)
Proteini	26,7	1,99

<b>Vlakna</b>	11,0	4,51
<b>Pepeo</b>	5,8	0,63
<b>Neproteinski dušik</b>	0,6	-
<b>Masti</b>	7,6	0,33
<b>Ugljikohidrati</b>	-	7,14
<b>Suha tvar</b>	11,27	-
<b>Kalorije</b>	-	<b>21,44 kcal/100 g</b>

Biljke služe kao prirodni izvor mikroelemenata i makroelemenata. Oni se lako apsorbiraju u ljudski organizam, a uslijed njihove insuficijencije mogu nastati brojni poremećaji. Zastupljenost određenih elemenata u pojedinim biljnim vrstama, kao i u njihovim specifičnim morfološkim dijelovima, može se znatno razlikovati ovisno o čimbenicima, kao što su izlaganje suncu, vrsta tla i gnojidba. Nadzemni i podzemni dijelovi biljke dragoljub su još uvijek u velikoj mjeri neistraženi pa se samo cvjetovi mogu uzeti kao jedini resurs u tom pogledu.[3]

Cvjetovi dragoljuba predstavljaju bogat izvor elemenata kao što su:

- kalij (245,33 mg),
- fosfor (48,13 mg),
- kalcij (33,72 mg),
- magnezij (14,93 mg),
- natrij (8,85 mg),
- cink (0,90 mg),
- željezo (0,64 mg),
- mangan (0,58 mg),
- bakar (0,11 mg),
- molibden (0,02 mg),

gdje su sve vrijednosti iskazane u odnosu na 100 g svježe mase cvjetova.[7]

U cvjetovima dragoljuba se mogu pronaći različiti fenolni spojevi, kao i spojevi iz skupine karotenoida. Ovisno o boji cvijeta količina luteina može varirati pa tako žuti cvjetovi sadrže 450 µg/g, a žuto-smeđi samo 350 µg/g luteina. Spojevi iz antocijanske

skupine najviše su zaslužni za boju cvjetova dragoljuba pa tako razlikujemo žute, narančaste i crvene cvjetove. Glavni antocijan koji se može naći u crvenim cvjetovima je delfinidin, i to 114,5 mg u 100 g svježje mase cvjetova, dok je u narančastim cvjetovima najzastupljeniji pelargonidin u količini od 58,2 mg u 100 g svježje mase cvjetova. U žutim cvjetovima su zastupljene obje vrste antocijana u približno jednakoj količini. Također ovisno o boji cvijeta se razlikuje i sadržaj fenolnih spojeva. U crvenim cvjetovima je u najvećoj količini zastupljen miricetin, a nešto manje ima kempferola i kvercetina. U narančastim cvjetovima je najzastupljeniji kempferol, a zatim slijede klorogenska kiselina i kvercetin, dok miricetina ima u najmanjoj količini. U žutim cvjetovima najbrojniji spojevi iz ove skupine su derivati hidroksicimne kiseline. U odnosu na prethodna dva cvijeta, u žutim cvjetovima je ukupni sadržaj fenolnih spojeva najmanji.[3]

Lišće i sjemenke dragoljuba sadrže brojne skupine spojeva, a neke od najzastupljenijih su:

- masne kiseline (eručna kiselina, oleinska kiselina, linolna kiselina),
- flavonoidi (izokvercetin, kvercetin-3-glukozid, kempferol),
- glukozinolati (benzil glukozinolat, sinalbin).

Isto tako ulje iz sjemenki dragoljuba ima visok sadržaj mononezasićenih masnih kiselina pa tako pojedine sorte ove biljke sadrže i do 80% eručne kiseline. Oleinska kiselina je zastupljena u znatno manjoj mjeri i njezin sadržaj je ispod 2%. Postoje 44 različita kemijska spoja odgovorna za specifičan miris dragoljuba, od kojih najveći utjecaj na miris imaju heks-2-enal koji daje voćnu aromu i dietil trisulfid koji daje miris sumpora.[3]

### **1.1.3. Ljekovita svojstva i primjena**

Dragoljub se zbog svog širokog spektra bioloških i farmakoloških učinaka već dugi niz godina primjenjuje u tradicionalnoj medicini. Nekada se koristio kao antiseptik, diuretik, antiskorbutik, antihipertenziv i antidepresiv. Osim toga, upotrebljavao se i u kozmetici za čišćenje kože i očiju, ali i za liječenje nekih kožnih poremećaja poput akni, furunkuloze, psorijaze, ekcema i skrofuloze. Do današnjeg dana ova biljka se popularno

uzgaja zbog ukrasnih namjena, a budući da ima ugodnu aromu, začinski okus, ali i visoku nutritivnu vrijednost često služi kao dodatak salati.[8]

Budući da postoje razlike u kemijskom sastavu pojedinih dijelova dragoljuba, točnije cvjetova, lišća i sjemenki, tako postoji i njegova različita primjena kao i utjecaj na ljudski organizam. Navedeni dijelovi se koriste u svrhu stvaranja acetata, etanolnog i vodenog ekstrakta, sirupa, macerata i slično. Zbog prisutnosti antocijana u narančastim cvjetnim laticama, ekstrakti iz dragoljuba se često koriste kao prirodna boja u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Također brojna istraživanja su potvrdila da dragoljub ima pozitivan utjecaj na krvožilni sustav. Alkoholni ekstrakti se mogu primjenjivati na koži gdje se masiranjem postiže bolja cirkulacija na određenim područjima. Istraživanje na štakorima je potvrdilo da etanolne frakcije iz dragoljuba, koje su bogate izokvercetinom, kao i vodeno-etanolni ekstrakti imaju hipotenzivni učinak na krvni tlak štakora neovisno o tome na koji način su uneseni u organizam. Dokazano je i da nema nikakvih negativnih učinaka na funkcioniranje srca. Vodeni ekstrakti pripremljeni od sušene biljke ili macerati pripremljeni od svježe biljke imaju pozitivan utjecaj i na probavni sustav. Utvrđeno je da imaju snažan utjecaj na žučni sustav te da stimuliraju probavu, odnosno ubrzavaju metabolizam, reguliraju izlučivanje, ali i sprječavaju kolelitijazu.[3]

## **1.2. Biološki aktivni spojevi zastupljeni u biljci dragoljub**

Brojna su istraživanja koja dokazuju pozitivan utjecaj tvari prisutnih u biljkama koje se često nazivaju „fitokemikalijama“. Tvari koje su zapravo najviše istraživane su polifenoli, karotenoidi, folati i glukozinolati za koje se smatra da imaju važnu ulogu u prevenciji različitih bolesti. Sadržaj aktivnih tvari u finalnom proizvodu, kao i njegova biodostupnost iz finalnog proizvoda nakon probave, određuju koliki će utjecaj na zdravlje imati konzumacija takvih proizvoda.[9]

Brojne studije su pokazale da eterična ulja dobivena iz biljaka mogu imati antibakterijska, antifungalna, antivirusna, insekticidna i antioksidacijska svojstva, jer predstavljaju izvor brojnih biološki aktivnih spojeva. Eterična ulja su aromatski spojevi koji se mogu dobiti iz različitih dijelova biljke (cvijeta, sjemenke, lista) različitim postupcima poput fermentacije ili ekstrakcije. Najveća upotreba ovih ulja u Europskoj

uniji je zabilježena u prehrambenoj industriji, kozmetici i farmaceutskim proizvodima. Budući da se u svakom ulju može naći velik broj različitih skupina kemijskih spojeva, njihovo antimikrobno djelovanje se ne može pripisati jednom specifičnom mehanizmu. Njihova će aktivnost ovisiti i o načinu na koje se eterično ulje dobiva, kao i o kemijskoj strukturi pojedinih spojeva.[10]

Biljka dragoljub ima ljekovitu, prehrambenu i ukrasnu vrijednost. Ona sadrži mnoge biološki aktivne spojeve poput flavonoida, glukozinolata, masnih kiselina, eteričnih ulja, klorogenske kiseline, aminokiselina, kukurbitacina, proteina i karotenoida.[8] Posebno važna i specifična skupina spojeva jesu glukozinolati koji predstavljaju prekursore izotiocijanata, a pronađeni su u 16 porodica reda Capparales gdje se ubraja i sama porodica Tropaeolaceae.[9,11]

### **1.2.1. Glukozinolati**

Glukozinolati su sekundarni metaboliti biljaka. Oni su, kao i njihovi razgradni produkti, često predmet istraživanja zbog svojih nutritivnih, antinutritivnih, antifungalnih, antibakterijskih i antikancerogenih svojstava, ali i zbog velikog utjecaja na karakterističnu aromu određenog povrća. Budući da toksično djeluju na insekte, mogu se koristiti i kao prirodni pesticidi.[9]

Glukozinolati se smatraju kemijski stabilnim i biološki neaktivnim spojevima, ali samo dok su odvojeni u stanicama biljaka od ostalih prisutnih sastojaka. Ukoliko dođe do oštećenja strukture tkiva koje može biti uzrokovano na različite načine, kao što je putem štetočina, tijekom branja, procesiranja, žvakanja ili sjeckanja biljaka, nastupit će hidroliza glukozinolata jer je došlo do kontakta s enzimom mirozinaze. Prilikom hidrolize glukozinolata oslobađaju se mnogi biološki aktivni spojevi.[9]

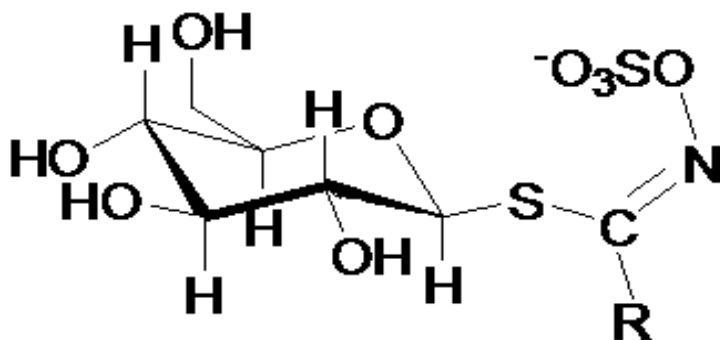
Većina biljaka koja sadrži glukozinolate spada u botaničku porodicu Brassicaceae koja pripada redu Capparales. Svi pojedinačni koraci i čimbenici u lancu hrane, koji kreće od proizvodnje pa sve do konzumacije neke biljke, utječu na unos i biodostupnost glukozinolata i njihovih razgradnih produkata, a samim time i na njihov utjecaj na zdravlje ljudi. Postoji više čimbenika koji utječu na sadržaj glukozinolata, a neki od njih su sastav tla, klimatski uvjeti i gnojidba. Čimbenik koji ima najveći utjecaj jesu genetske varijacije. Također, uzgajivači mogu direktno i indirektno utjecati na

sadržaj glukozinolata nastojeći postići unapređenje neke sorte poboljšavajući njenu aromu ili otpornost na različite nametnike.[9]

### 1.2.1.1. Kemijska struktura i vrste glukozinolata

Prva zapažanja o jedinstvenim svojstvima glukozinolata i njegovih razgradnih produkata zabilježena su još na početku 17. stoljeća. Tada su znanstvenici nastojali objasniti kemijsko podrijetlo oštrog okusa senfa. Tako su početkom 19. stoljeća iz sjemenke crne i bijele gorušice izolirana dva glukozinolata trivijalnih imena sinigrin i sinalbin. Gadamer je 1897. godine predložio prvu strukturu glukozinolata za koju se kasnije ispostavilo da je pogrešna. Kasnije, 1956. godine, Ettliger i Lundeen ukazali su na nedostatke Gadamer-ove strukture te predložili novu, ispravnu strukturu i opisali prvu kemijsku sintezu glukozinolata.[11]

Glukozinolati predstavljaju grupu organskih aniona koji se iz biljaka mogu izolirati u obliku kalijevih i natrijevih soli. Ono što je uobičajeno za sve glukozinolate jesu zajedničke strukturne karakteristike koje podrazumijevaju  $\beta$ -D-tioglukozidni dio, sulfatnu skupinu koja se preko C=N skupine veže za ostatak molekule (sulfonirani oksim) i bočni lanac. Bočni lanac glukozinolata je promjenjiv te kao takav predstavlja osnovu njihove strukturne raznolikosti. Također, produkti koji nastaju enzimskom i neenzimskom razgradnjom glukozinolata imaju različitu biološku aktivnost ovisno o strukturi bočnog lanca. Na slici 2. se može vidjeti prikaz opće strukture glukozinolata gdje je bočni lanac označen slovom „R“ prema kojem se glukozinolati međusobno i razlikuju.[12]



Slika 2. Opća struktura glukozinolata [12]

Do 2001. godine identificirano je oko 120 različitih glukozinolata, ali se u međuvremenu proširio opseg njihovog istraživanja pa je danas poznato oko 200 različitih vrsta. Glukozinolate možemo podijeliti s obzirom na strukturnu sličnost bočnog lanca na alifatske, aromatske i heterociklične (indolne) glukozinolate. Osim navedene podjele, glukozinolati se razlikuju i prema supstituentima na glukonskom dijelu kao što su primjer benzoilni i cimetni glukozinolati. Novija istraživanja spominju tzv. „seleno glukozinolate“ kod kojih je glukonski i aglukonski dio molekule povezan sa selenom umjesto sa sumporom.[12]

Među najbrojnijim glukozinolatima su ipak oni koji imaju nerazgranate ili razgranate alifatske bočne lance. Većina njih u svom bočnom lancu ima dvostruke veze, karbonilne ili hidroksilne skupine te kovalentno vezani sumpor. Jedna trećina svih glukozinolata sadrži atom sumpora u svom bočnom lancu koji može imati različit oksidacijski stupanj kao što su primjer metiltioalkil-, metilsulfinilalkil- ili metilsulfonylalkil-. Neki glukozinolati, kao što je mala grupa benzil glukozinolata sadrži dodatnu molekulu ugljikohidrata (ramnoza ili arabinoza) koja je za aromatski prsten glikozidno vezana.[11]

### **1.2.1.2. Razgradnja glukozinolata**

Razgradnja glukozinolata je glavni uvjet za aktivaciju brojnih bioloških utjecaja koje imaju njihovi razgradni produkti. Glukozinolati su u svom osnovnom obliku stabilni i nemaju velik biološki značaj. Enzim mirozinaza se nalazi u stanicama biljaka. Prilikom oštećenja stanica, mirozinaza stupa u kontakt s glukozinolatima i katalizira njihovu razgradnju. Hidroliza glukozinolata vodi do oslobađanja određenih produkata koji mogu imati velik biološki i farmakološki značaj. Bez obzira o kojem je tipu procesiranja riječ, on uvijek vodi prema hidrolizi glukozinolata u određenom stupnju. Osim enzimske razgradnje, postoji i neenzimska (kemijska) razgradnja glukozinolata koja se može odvijati pod utjecajem kiselina ili lužina.[13]

#### **1.2.1.2.1. Enzimska razgradnja glukozinolata**

Kao što je već prethodno rečeno, enzimsku razgradnju glukozinolata katalizira enzim mirozinaza. Istraživanja su pokazala da se enzimi nalaze u unutrašnjosti

mirozinskih zrnaca, a to su glavne organele mirozinskih stanica, dok su glukozinolati smješteni u proteinskim tijelima (vakuolama) u nemirozinskim stanicama. Prilikom razgradnje glukozinolata nastaju glukoza-glukon i nestabilni međuprodukt koji se naziva aglukon. Aglukon se spontano pregrađuje i pri tome nastaju različiti razgradni produkti, a struktura bočnog lanca, uvjeti hidrolize i prisutni kofaktori određuju vrstu nastalog produkta.[12]

Produkti hidrolitičke razgradnje glukozinolata su izotiocijanati, nitrili, tiocijanati i indoli. Mirozinaza odcjepljuje glukozu, a iz nestabilnog aglukona se Lössenovom pregradnjom uklanja sulfat. Koji će razgradni produkti nastati ovisi o uvjetima hidrolize, posebno o pH vrijednosti. Pri pH 7 doći će do Lössenove pregradnje i tada glavni produkti koji nastaju su reaktivni, hlapljivi i mirisni izotiocijanati, dok će nitrili uglavnom nastati kad se hidroliza provodi u kiselim uvjetima, odnosno kad je pH manji od 4. Pri svim pH vrijednostima, ali u prisustvu fero-iona glavni razgradni produkti su nitrili. Indoli, zajedno sa tiocijanatima, mogu nastati razgradnjom indolnih glukozinolata.[9,12]

#### **1.2.1.2.2. Neenzimska razgradnja glukozinolata**

Neenzimska (kemijska) razgradnja glukozinolata se odvija pod utjecajem povišene temperature. Ovisno o uvjetima ove razgradnje nastat će različiti produkti. Jedan od glavnih faktora koji određuje vrstu razgradnog produkta jest pH otopine u kojoj se razgradnja odvija. U jako kiselim uvjetima glukozinolati se razgrađuju do karboksilne kiseline i glukoze, dok u lužnatim uvjetima razgradnja ide do aminokiselina i tioglukoze.[12]

Jedno od prvih istraživanja koje je dokazalo da izotiocijanati mogu nastati i neenzimskom razgradnjom glukozinolata su proveli MacLeod i suradnici. Oni su proučavali toplinsku razgradnju glukozinolata te razgradne produkte koji nastaju u plinskom kromatografu. Ti su produkti nastajali u koloni i injektoru plinskog kromatografa pri različitim temperaturama. Ovo istraživanje je pokazalo da se prop-2-en-1-il glukozinolat pri temperaturi od 200 °C može razgraditi na 44% nitrila i 32% izotiocijanata. Isto tako pokazalo je da se benzil glukozinolat razgrađuje na 63% nitrila i 13% izotiocijanata.[12]



### 1.2.1.3. Produkti razgradnje – izotiocijanati

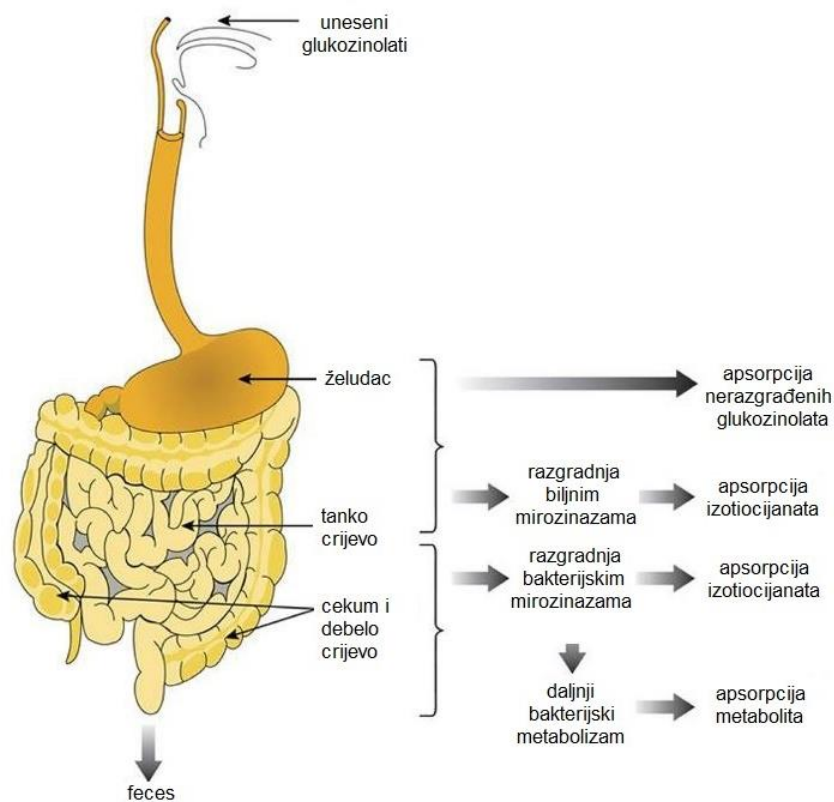
Kao što je već spomenuto, razgradni produkti glukozinolata pokazuju niz bioloških aktivnosti, a smatra se i da su dio obrambenog mehanizma biljaka protiv napada insekata. Zbog svog toksičnog djelovanja na pojedine vrste insekata, mogu se upotrebljavati i kao pesticidi. Osim toga, produkti hidrolitičke razgradnje glukozinolata mogu značajno doprinijeti karakterističnoj aromi pojedinih vrsta povrća. Čest naziv za glukozinolate je taj da su prekursori izotiocijanata i tiocijanata, odnosno spojeva koji u svom sastavu sadrže sumpor te nitrila i indola, odnosno spojeva u čijoj strukturi nema sumpora.[12]

Izotiocijanati se već dugu godinu smatraju „normalnim“ produktima razgradnje glukozinolata. Njihova opća formula je  $R-N=C=S$ . To su zapravo hlapljivi spojevi koji se očituju jakim mirisom i aromom. Budući da je prisutnost propenil-izotiocijanata u gorušici i hrenu zaslužna najvećim dijelom za njihovu aromu, navedeni se izotiocijanati često nazivaju i „gorušičinim uljem“. Nastanak izotiocijanata podrazumijeva da nestabilni aglukonski međuprodukt Lössenovom pregradnjom pređe u  $R-N=C=S$  konfiguraciju. Izotiocijanati su prilično reaktivni, ali ipak manje u odnosu na njima srodne izocijanate. Izotiocijanati koji sadrže  $\beta$ -hidroksilnu skupinu u bočnom lancu imaju sposobnost da spontanom intramolekulskom reakcijom tvore cikličke tionske spojeve, odnosno oksazolidin-2-tione. Upravo ti spojevi su glavni produkti uljane repice.[14]

### 1.2.1.4. Gastrointestinalna stabilnost glukozinolata

Biodostupnost predstavlja količinu ili frakciju koja se oslobađa u probavnom traktu iz nekog prehrambenog proizvoda i time postaje dostupna za apsorpciju.[15] Brojne studije su nastojale objasniti apsorpciju i metabolizam glukozinolata, kao i njihovih raspadnih produkata. Jedna od takvih studija je uspjela dokazati da se molekula indol-3-karbinola u kiseloj sredini, kakvu ima sadržaj želuca, kondenzira u oblik policikličnog aromatskog spoja. Općenito, svaki glukozinolat može istovremeno osigurati različite strukture aglukona. Koja će se struktura aglukona točno oblikovati ovisi o uvjetima okoline i strukturi bočnog lanca glukozinolata.[16]

Kuhanje biljnog materijala dovodi do denaturacije mirozinaze. Intenzitet denaturacije ovisi o visini temperature i vremenu trajanja kuhanja. Kad se mirozinaza inaktivira, glukozinolati prolaze do debelog crijeva i tu ih, zbog njihove hidrofilne prirode, metabolizira crijevna mikroflora. Slika 3. pokazuje dijelove probavnog trakta u kojima se glukozinolati i njihovi raspadni produkti metaboliziraju ili apsorbiraju. Isto tako iz slike 3. je vidljivo da se nerazgrađeni glukozinolati mogu djelomično apsorbirati u samom želucu, a preostali glukozinolati prolaze dalje kroz gastrointestinalni trakt kako bi došli do tankog crijeva gdje ih mogu hidrolizirati biljne mirozinaze, a raspadni produkti mogu biti apsorbirani. Preostali nehidrolizirani glukozinolati prelaze u debelo crijevo i tu se hidroliziraju od strane bakterijske mirozinaze i molekule nastale generiranim raspadom se apsorbiraju ili izlučuju iz organizma.[16]



**Slika 3. Metabolizam i apsorpcija glukozinolata i njegovih raspadnih produkata u probavnom traktu [16]**

Kod izotiocijanata je detaljno proučen metabolizam nakon apsorpcije. Apsorbirani izotiocijanati se u jetri konjugiraju s glutationom te se iz organizma izlučuju putem urina u obliku merkaptanske kiseline. Količina izlučene merkaptanske

kiseline je dobar odraz količine utrošenih izotiocijanata. Upravo iz tog razloga se merkaptanska kiselina koristi kao biomarker za praćenje unosa i/ili formiranja izotiocijanata u organizmu. Dokazano je da biodostupnost izotiocijanata nakon konzumiranja krstašica (Brassicaceae) ovisi o doprinosu biljne mirozinaze i crijevne mikroflore u procesu razgradnje glukozinolata. Nakon konzumiranja svježih krstašica, odnosno uz djelovanje biljne mirozinaze, izlučivanje merkaptanske kiseline iznosilo je 17-88% od ukupno unesenih glukozinolata. Nakon konzumiranja krstašica koje su podvrgnute kuhanju, odnosno uz djelovanje crijevne mikroflore, izlučene merkaptanske kiseline ne prelaze brojku od 20%. Razlika je i u tome što se kod konzumiranja kuhanih krstašica merkaptanska kiselina najviše izlučuje nakon 12 sati od unosa, dok se kod konzumiranja svježih krstašica najviše izlučuje nakon 8 sati. Svi navedeni podaci zapravo govore da konzumiranje svježih krstašica dovodi do poboljšane bioraspoloživosti izotiocijanata.[16]

### **1.2.2. Dragoljub kao prirodni izvor glukozinolata**

Biljka dragoljub, točnije vrsta *Tropaeolum majus* L. je tradicionalna ljekovita biljka koja se koristi za liječenje infekcija mokraćovoda. Najznačajniji glukozinolat kojeg ona sadrži je benzil glukozinolat ili glukotropaeolin. Nakon konzumacije listova dragoljuba, glukotropaeolin se prolaskom kroz probavni sustav hidrolizira pri čemu nastaje benzil izotiocijanat kao glavni produkt njegove razgradnje. Dalje se benzil izotiocijanat transformira u derivate merkaptanske kiseline. U bubrezima se ovi spojevi izlučuju u urin gdje se velike količine rehidroliziraju kako bi se ponovno stvorio benzil izotiocijanat te se potom razvija njegov antimikrobni učinak tako što inhibira rast bakterija koje uzrokuju upale mokraćnog sustava. Međutim, da bi se postigao ovaj učinak, potrebne su dovoljno velike količine unesenog glukotropaeolina kako bi se mogle osigurati dovoljne količine benzil izotiocijanata u urinu. Kada se dragoljub u ove svrhe koristi u suvremenoj medicini, preporučuje se da dnevno unošenje glukotropaeolina mora biti najmanje 150 mg da se osigura dovoljna koncentracija benzil izotiocijanata.[17]

Benzil izotiocijanat ima važne fiziološke uloge, tako na primjer stimulira kemozaštitne mehanizme. On djeluje kao inhibitor enzima Faze I te kao induktor enzima Faze II, koji predstavljaju prvu liniju obrane ljudskog organizma od

kancerogenih tvari. Enzimi Faze I mijenjaju prokancerogene molekule reakcijama oksidacije, redukcije i hidrolize do određenih hidrofilnih molekula koje predstavljaju vrlo reaktivne međuprodukte koji mogu oštetiti DNK, RNK i proteine. Enzimi Faze II povećavaju izlučivanje tih molekula iz tijela tako što povećavaju topljivost u vodi. Ovi enzimi odgovarajućim reakcijama stvaraju nereaktivne metabolite koji se lako izlučuju. Zbog toga je inhibicija enzima Faze I, a indukcija enzima Faze II potrebna za zaštitu od DNK oštećenja uzrokovano djelovanjem kancerogenih tvari. Također, antikancerogena funkcija se očituje i kroz to što povećava pojavu apoptoze stanica raka, odnosno stimulira programiranu smrt stanica.[8,9]

### **1.3. Mikrovalna ekstrakcija**

Mikrovalne pećnice se danas popularno koriste u prehrambenoj industriji u različite svrhe, poput zagrijavanja, odmrzavanja, sušenja, blanširanja. Mikrovalovi koje one stvaraju ne uzrokuju promjene u strukturi tkiva, jer njihove molekule samo titraju i međusobno se sudaraju što za posljedicu ima samo porast temperature. Još jedna svrha gdje se mikrovalovi mogu koristiti je i za inaktivaciju mikroorganizama što je pogodno za mikrovalnu pasterizaciju. U novije vrijeme razvijena je tehnika mikrovalne ekstrakcije, to je brza i pouzdana analitička tehnika koja služi za ekstrakciju tragova organskih spojeva kod krutih uzoraka, ali se također primjenjuje i za ekstrakciju prirodnih spojeva kao što su primjerice polifenolni spojevi iz čaja i sjemenki grožđa. 1986. godine je prvi put opisano korištenje mikrovalova u laboratorijima i to za organsku sintezu i ekstrakciju bioloških uzoraka zbog analize određenih organskih spojeva. Korištenjem mikrovalne ekstrakcije moguće je dobiti slične udjele ekstrahiranih tvari u odnosu na standardne tehnike, a prednost je ta što je potrebno puno kraće vrijeme, smanjena upotreba otapala, bolji ekstrakcijski prinos te što je ova tehnika energetski i ekonomski isplativija. Nedostatak ove ekstrakcije je to što povišena temperatura može negativno utjecati na biološki aktivne spojeve te samim time i na kvalitetu ekstrahiranog materijala.[18]

### **1.3.1. Načelo rada mikrovalne ekstrakcije**

Mikrovalovi su dio elektromagnetnog zračenja koje zapravo predstavlja gibanje energije i ono nastaje kao fizikalni fenomen protoka električne struje kroz vodič. Protokom struje kroz neki vodič stvaraju se električno i magnetsko polje koji okružuju vodič. Promjenom smjera gibanja struje nastaje pulsiranje oba polja te se pri tome stvaraju elektromagnetni valovi koji se šire okomito na smjer struje koja ih je izazvala. Mikrovalovi, zajedno s valovima kojima se prenose audio i video signali, infracrvene zrake i zrake vidljive svjetlosti spadaju u kategoriju neionizirajućeg zračenja. Mikrovalovi su radiovalovi u frekvencijskom rasponu od 0,3 do 300 GHz. Osnovne karakteristike mikrovalova su to što se odbijaju od metala, prolaze kroz papir, plastiku i staklo, a posebno važno svojstvo je što zagrijavaju vodu prisutnu u hrani. Zanimljivo svojstvo imaju radiovalovi u rasponu frekvencije oko 2,5 GHz zato što ih voda, masti i šećeri mogu konvertirati direktno u gibanje koje se zatim pretvara u toplinu. Dielektrično zagrijavanje je ovisno o sposobnosti materijala da apsorbira mikrovalnu energiju i njenog pretvaranja u toplinu. Mikrovalovi zagrijavanjem cijelog volumena danog uzorka oštećuju vodikove veze i na taj način potiču rotaciju dipola. Kretanjem otopljenih iona povećava se penetracija otapala u matriks te pritom potiče otapanje.[18]

Razlikuju se dvije vrste sustava mikrovalne ekstrakcije dostupnih komercijalnoj upotrebi, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi i ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku. Prva navedena ekstrakcija se koristi u uvjetima niske i visoke temperature gdje tlak u posudi bitno ovisi o količini i vrelištu otapala. Mikrovalna ekstrakcija se često koristi za izdvajanje spojeva osjetljivih na temperaturu, poput eteričnih ulja. Postoje dva postupka mikrovalne ekstrakcije koji se razlikuju tako što se u prvom odvija kondenzacija s vodenim hladilom za što je potreban veći utrošak energije i više vremena, dok se u drugom ekstrahirani materijal skuplja na dnu uređaja u posudu uz pomoć sile gravitacije bez velikog utroška energije i vremena.[18]

### **1.3.2. Čimbenici koji utječu na mikrovalnu ekstrakciju**

Na učinkovitost mikrovalne ekstrakcije utječu čimbenici kao što su:

- snaga mikrovalova,

- temperatura,
- vrijeme trajanja ekstrakcije,
- izbor otapala,
- karakteristike matriksa.

Snaga mikrovalova i vrijeme izloženosti mikrovalovima znatno utječu jedno na drugo. Kako bi se postupak mikrovalne ekstrakcije optimizirao, općenito je izabrana kombinacija male ili umjerene snage, ali s dugom izloženošću. Kod korištenja velike snage uvijek postoji povećani rizik od toplinske degradacije, odnosno propadanja nekih toplinski osjetljivih komponenti. Pojedina izvješća su pokazala da variranje snage od 500 do 1000 W nije imalo značajnih utjecaja na prinos flavonoida.[19]

Kao još jedan važan čimbenik koji utječe na sam proces ekstrakcije je vrijeme trajanja zagrijavanja. Količina ekstrahiranog materijala je veća što je duže vrijeme trajanja ekstrakcije, ali se time povećava rizik od razgradnje određenih komponenti. Kod ekstrakcije različitih vrsta komponenti, potrebna su različita vremenska razdoblja, gdje se čak i nekoliko sekundi može pokazati dosta djelotvornim. Dielektrična svojstva otapala također utječu na optimizaciju vremena izloženosti mikrovalovima. Duža izloženost otapala koja apsorbiraju mikrovalove, kao što je voda, opet predstavlja rizik za razgradnju termolabilnih sastojaka.[19]

Izbor odgovarajućeg otapala je osnovni čimbenik koji utječe na postupak ekstrakcije. Izbor otapala ovisi o topljivosti željenog analita, interakciji između matriksa i otapala, kao i o svojstvu otapala da dobro apsorbira energiju mikrovalova. Odabrano otapalo također treba imati visoku selektivnost prema analitu koji nas zanima u odnosu na ostale komponente matriksa, kao i dobru kompatibilnost s daljnjim kromatografskim analitičkim koracima. Otapala koja imaju dobru sposobnost upijanja energije mikrovalova se brže zagrijavaju i poboljšavaju postupak ekstrakcije. Biljni materijal unutar svog sastava ima određeni udio vlage te zagrijavanjem dolazi do isparavanja molekula vode. Na taj način se stvara velik pritisak na staničnu stijenku i ona puca te se oslobađaju određeni fitokonstituenti u okolinu otapala. Volumen otapala treba biti dovoljan da biljni matriks u potpunosti uroni u otapalo tijekom cijelog postupka izloženosti mikrovalovima.[19]

Veličina čestica i priroda materijala koji se analizira znatno utječu na postupak ekstrakcije. Što je veća veličina čestica uzorka, to je veća površina i bolji je prodor

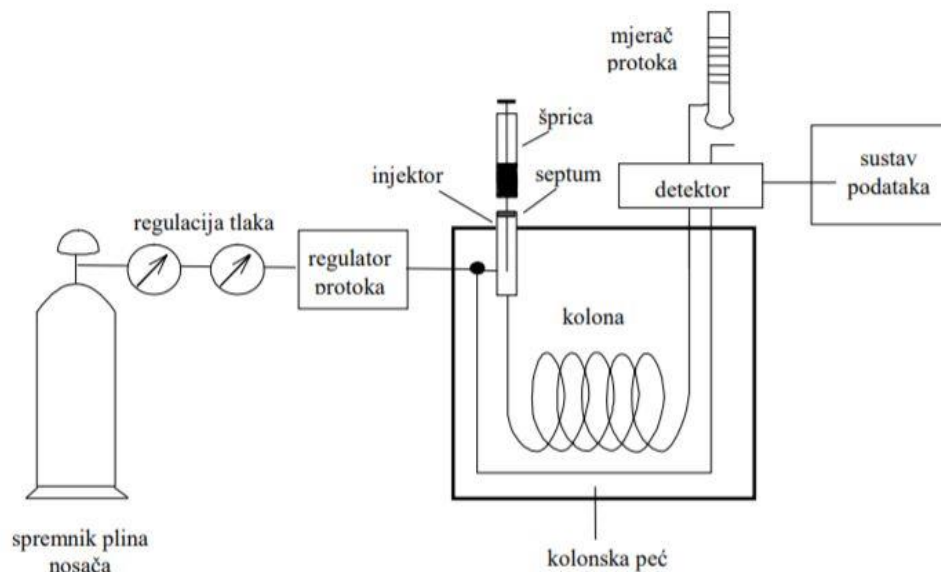
mikrovalova. Manje veličine čestica ponekad mogu predstavljati problem tijekom odvajanja matriksa od otapala nakon postupka ekstrakcije. Kao rješenje toga provode se postupci centrifugiranja ili filtracije. Ako su uzorci prethodno obrađeni otapalima koja apsorbiraju mikrovalove, otapalo se impregnira u stanice, a mikrovalnim zračenjem se postiže dvostruko zagrijavanje otapala u okruženju i u stanicama. Neki istraživači primjenjuju tehniku u kojoj se matriks uroni u otapalo određeno vrijeme prije same ekstrakcije, čime su postignuti bolji prinosi. Tijekom rada sa zatvorenim sustavom ekstrakcije treba obratiti pažnju na iskorištenu snagu i temperaturu mikrovalne. Povećanje temperature rezultira poboljšanom ekstrakcijskom učinkovitošću, jer pri višim temperaturama površinska napetost i viskoznost otapala opadaju pa oni bolje prodiru u unutrašnjost biljnog materijala.[19]

#### **1.4. Plinska kromatografija**

Kromatografske tehnike odjeljivanja imaju široku primjenu u analitici i one podrazumijevaju skup kromatografskih postupaka kojim se omogućuje odjeljivanje, selektivno i osjetljivo dokazivanje i određivanje pojedinih sastavnica nekog složenog uzorka, ubrajajući i one uzorke u kojima su sastavnice kemijski slične ili prisutne u jako malim koncentracijama. Tvari koje je potrebno odijeliti podvrgavaju se ponovljenim razdiobama između dvije faze. Jedna faza je nepokretna (stacionarna) koja može biti čvrsta tvar ili tekućina, dok je druga faza pokretna (mobilna) koja može biti tekućina, plin ili superkritični fluid. Uzorak je otopljen u pokretnoj fazi koja prelazi preko nepokretne faze. Kromatografski postupci odjeljivanja se temelje na odnosu ravnotežnih koncentracija uspostavljenih u ove dvije faze.[20]

U plinskoj kromatografiji pokretnu fazu čini plin. Analizirani spojevi prevode se u plinoviti oblik te uz pomoć pokretne faze (plina) eluiraju uzduž kolone. Na slici 4. su prikazane komponente uređaja za plinsku kromatografiju koji se sastoji od:

- injekcijskog bloka,
- kromatografske kolone,
- termostata,
- detektora,
- pisača.



Slika 4. Prikaz komponenti uređaja za plinsku kromatografiju [20]

Plinsko kromatografski sustavi se međusobno mogu razlikovati prema tipu plina nosača, sustavu injektiranja, kromatografskim kolonama i detektorima. U injeksijskom bloku se odvija injektiranje uzorka uz pomoć injekcije šprice. Taj postupak mora biti brz te uzorak mora potpuno i brzo ispariti. Plinovi koji se koriste kao pokretna faza su helij, argon, dušik i vodik. Jako je važno da su ti plinovi potpuno inertni kako ne bi stupili u reakciju s uzorkom ili nepokretnom fazom. Njihova uloga je odjeljivanje hlapljivih spojeva te iznošenje istih iz kolone. Nepokretna faza je tekućina koja se veže za stijenke ili sorbens, a ona mora biti termički i kemijski stabilna, niske isparljivosti s temperaturom vrelišta oko 100 °C višom od tražene temperature kolone. Termostati su obično izrađeni od metala, stakla ili plastike. U njima se nalaze kromatografske kolone te se ovisno o prirodi uzorka kontrolira temperatura. Plinska kromatografija je osjetljiva metoda kojom se mogu razdvojiti vrlo male koncentracije smjese. Često se primjenjuje za ispitivanje čistoće supstancija, u preparativne svrhe, kvalitativnoj i kvantitativnoj kemijskoj analizi.[13,20]

### 1.4.1. GC-MS

GC-MS predstavlja vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa te kao takav omogućuje postizanje pouzdanih i brzih rezultata. Plinski kromatograf služi



za razdvajanje smjese uzoraka na pojedine komponente, dok je za identifikaciju tih komponenti zaslužna spektrometrija masa. Za pojedine komponente koje su odijeljene tehnikom plinske kromatografije dobiju se karakteristični podaci, a to su retencijsko vrijeme i površina pika proporcionalna količini sastojka. Karakterističan podatak koji se dobije masenom spektrometrijom je maseni spektar te se na osnovu istog izvodi zaključak o identitetu pojedine komponente. Tijekom obrade podataka uspoređuju se dva spektra, snimljeni spektar analiziranog spoja sa spektrom tog spoja iz Wileyeve banke masenih spektara.[13]

### **1.4.2. GC-FID**

GC-FID predstavlja plinski kromatograf s plameno-ionizacijskim detektorom. Detektori su uređaji koji daju odziv na fizikalno-kemijska svojstva pojedine komponente u nekom uzorku. Oni pojačavaju taj odziv i prevode ga u električni signal što se u konačnici bilježi u obliku pika na kromatogramu. Osnovni parametar za kvalitativnu i kvantitativnu analizu je retencijsko vrijeme, odnosno vrijeme koje je potrebno da komponenta prođe kroz kolonu do detektora. Plameno-ionizacijski detektor se upotrebljava za određivanje hlapljivih ugljikovodika i svih ostalih komponenti koje sadrže ugljik. Princip njegovog rada temelji se na sagorijevanju uzorka na temperaturi vodikovog plamena pri čemu organske molekule daju ione i elektrone. Skupljanjem nastalih iona i elektrona na sabirnoj elektrodi, koja je smještena iznad plamena, detektira se broj ugljikovih atoma koji ulaze u detektor u jedinici vremena.[21]

### **1.5. *In vitro* probava**

Bioiskoristivost pojedinih bioaktivnih komponenti koje se nalaze u hrani nije uvijek poznata. Da bi bioaktivna komponenta bila bioiskoristiva, prvo mora biti oslobođena iz matriksa hrane te modificirana u gastrointestinalnom sustavu. Prije nego se donese zaključak o mogućim učincima na zdravlje čovjeka, prvo se mora provjeriti kako proces probave utječe na stabilnost bioaktivnih komponenti, odnosno na njihovu bioiskoristivost.[22]

Biodostupnost se može ispitati postupcima *in vitro* probave koja se obično sastoji od dvije faze, oponašanje gastične i intestinalne probave. Za mjerenje biodostupnosti, kao i bioiskoristivosti, koriste se različite vrste metoda *in vitro* probave. U svakoj metodi se oponašanje gastične probave provodi zakiseljavanjem uzorka na pH vrijednost najbližu vrijednosti u želucu odraslog čovjeka. Isto tako, oponašanje crijevne probave provodi se neutralizacijom uzorka do pH 6,5-7, što je najbliže vrijednosti pH u crijevima odraslog čovjeka.[22]

Modeli probave *in vitro* naširoko se koriste za proučavanje strukturnih promjena, probavljivosti i otpuštanja sastojaka hrane u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima. Međutim, rezultati *in vitro* probavnih modela često mogu biti različiti od rezultata dobivenih *in vivo* modelom zbog poteškoća u preciznom simuliranju složenih fizikalno-kemijskih i fizioloških događaja koji se odvijaju u probavnim traktima životinja i ljudi. Nekoliko istraživanja je koristilo enzime prikupljene od ljudi, dok su drugi koristili enzime izlučene iz životinjskih ili biljnih izvora.[23] Ljudski probavni sokovi sadrže enzime različitih izoforma koji se mogu razlikovati s obzirom na specifičnost i aktivnost od pročišćenih životinjskih enzima. Provedena su različita istraživanja koja nastoje objasniti te razlike. Ljudski probavni sokovi sadrže enzime i kofaktore u fiziološkoj kombinaciji i zbog toga mogu imati prednost u odnosu na umjetne otopine sastavljene od pročišćenih komercijalnih enzima.[24]

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Kemikalije i aparatura

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- pentan, Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika,
- bezvodni natrijev sulfat, T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska,
- 1 M otopina HCl, BDH Prolabo, UK,
- 70%-tna otopina etanola, Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska.

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korištena je sljedeća aparatura:

- analitička vaga, ALS 120-4, Kern, Inscale, Kingston, UK,
- tehnička vaga, Kern & Sohn, Njemačka,
- električni mlinac za kavu, Sencor Europe, Prag, Češka Republika,
- aparatura za mikrovalnu ekstrakciju,
- GC-MS, Varian Inc., Lake Forest, CA, USA,
- uparivač dušikom, Techne,
- inkubator, Biosan TS-100,
- centrifuga, Thermo Scientific,
- GC-FID, Agilent, Santa Clara, CA, USA.

### 2.2. Priprema biljnog materijala

Prilikom izrade ovog završnog rada korištene su sjemenke visokog dragoljuba (*Tropaeolum majus* L.) proizvođača *Hortus sementi* iz kojih je izolirano eterično ulje.

Priprema biljnog materijala za mikrovalnu ekstrakciju podrazumijeva vaganje 100,20 g sjemenki dragoljuba. Izvagane sjemenke se potom usitne u električnom mlincu te kao takve prebace u tikvicu za destilaciju volumena 2 000 mL. U tikvicu se doda destilirana voda u količini koja je potrebna da sav biljni materijal bude natopljen. Sadržaj u tikvici se lagano promiješa i pusti da tako stoji 1 sat. Naposljetku, nastala je pastozna smjesa, jer je biljni materijal upio svu destiliranu vodu.

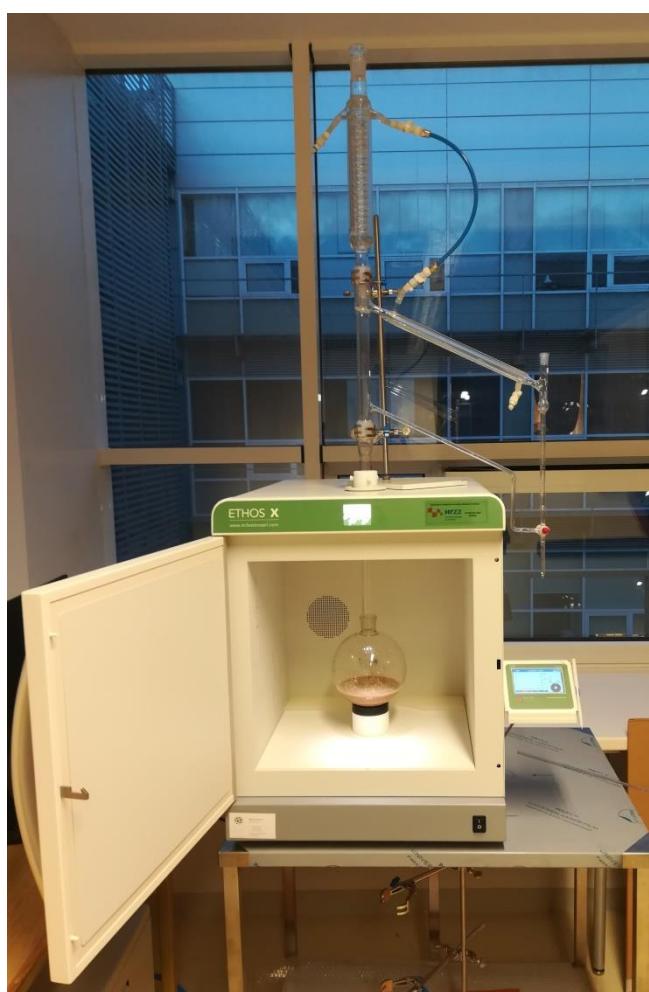


Slika 5. Prikaz cijelih i usitnjenih sjemenki biljke dragoljub

### 2.3. Mikrovalna ekstrakcija

Cjelokupni sustav za brzu mikrovalnu ekstrakciju sastoji se od mikrovalne pećnice, nastavaka za dobivanje eteričnog ulja primjenom postupka destilacije i nastavaka za dobivanje aroma primjenom gravitacijske sile. Za potrebe izrade ovog rada korišteni su samo nastavci za dobivanje eteričnog ulja. Sustav za hlađenje je neophodan zbog konstantne opskrbe cijelog procesa vodom za hlađenje koja prolazi hladilom, čija je temperatura namještena na 13 °C. Na instrumentu je potrebno odabrati opciju „*fragrance*“ te namjestiti određenu snagu mikrovalova koja će ovisiti o količini biljnog materijala. Prilikom izrade ovog rada primijenjena je snaga od 500 W. Početna temperatura destilacije bila je 94 °C, dok je maksimalna postignuta temperatura tijekom cijelog procesa iznosila 99 °C. Osim snage, potrebno je namjestiti vrijeme trajanja samog procesa, koje je u ovom slučaju iznosilo 30 minuta intenzivne destilacije uz dodatnih 5 minuta potrebnih za hlađenje. Prethodno pripremljeni biljni materijal je postavljen u reaktor unutar mikrovalne pećnice kao što je prikazano na slici 6. U ovaj reaktor nije potrebno dodavati vodu, kao što je to slučaj kod hidrodestilacije. Mikrovalovi oslobađaju eterično ulje koje isparava zajedno s vodom koja je prisutna u

samim stanicama biljnog materijala. Voda u hladilu omogućava kondenzaciju nastalih para te se eterično ulje skuplja u postranoj cijevi ispunjenoj destiliranom vodom. Prva kap koja se skupila u postranoj cijevi nastala je nakon 6 minuta od početka procesa. Višak vode se dodatnim cijevima prelijeva natrag u reaktor iz razloga što se mora nadoknaditi nestala voda iz biljnog materijala. Kod biljnog materijala gdje je prinos eteričnog ulja izrazito malen pa je granicu faza između vodenog dijela i eteričnog ulja veoma teško uočiti, dodaje se pentan kako bi se pojednostavilo odjeljivanje izolata. Izolat se potom suši s bezvodnim natrijevim sulfatom i dekantira u prethodno izvagane prazne vijalice za skladištenje.



Slika 6. Prikaz aparature za mikrovalnu ekstrakciju

## 2.4. GC-MS

Nakon prethodno odrađene mikrovalne ekstrakcije, eterično ulje koje je skupljeno u pentanu ide na GC-MS analizu. U ovom radu je za kvalitativnu i

kvantitativnu identifikaciju sastava eteričnog ulja dragoljuba korišten vezani sustav plinske kromatografije (model 3900) i spektrometrije masa (model 2100T) prikazan na slici 7. Uzorci su analizirani na nepolarnoj koloni VF-5MS dužine 30 m, promjera 0,25 mm i debljine sloja stacionarne faze 0,25  $\mu\text{m}$ . Plin nositelj bio je helij, a postavljeni protok iznosio je 1 mL/min. Temperatura injektora je namještena na 250  $^{\circ}\text{C}$ , dok je volumen injektiranog uzorka iznosio 1  $\mu\text{L}$ . Postupak zagrijavanja kolone odvijao se na način da je prve 3 minute temperatura iznosila 60  $^{\circ}\text{C}$  nakon čega je uslijedilo zagrijavanje na 246  $^{\circ}\text{C}$  brzinom od 3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  te se navedena temperatura zadržala 25 minuta. Uvjeti koji su postavljeni u spektrometru masa obuhvaćaju energiju ionizacije od 70 eV, temperaturu izvora iona od 200  $^{\circ}\text{C}$  i područje skeniranja od 40-350 masenih jedinica.



Slika 7. Prikaz GC-MS uređaja

## 2.5. Uparavanje u struji dušika

Nakon provedene GC-MS analize eteričnog ulja dragoljuba slijedi uparavanje otapala. Postupak uparavanja se provodi u struji dušika. Hlapljivi izolat se zagrijava pri temperaturi približnoj 45  $^{\circ}\text{C}$ , kako bi temperatura bila iznad temperature vrenja otapala. Zahvaljujući propuhivanju s inernim dušikom ovaj proces uparavanja je ubrzan. Velika

prednost ovakvog načina uparavanja je ta što se uzorak izlaže niskim temperaturama te se na taj način sprječava mogućnost uništenja eventualno prisutnih termolabilnih komponenti. Uzorak se do analize čuva u zamrzivaču. Cijeli postupak se odvija na uređaju prikazanom na slici 8.



Slika 8. Prikaz uređaja za uparavanje

Konačna masa eteričnog ulja iznosila je 0,0625 g, a određena je iz razlike mase vijalice nakon uparavanja i mase prazne vijalice:

$$m_3 = m_2 - m_1,$$

$m_1$  = masa prazne vijalice = 10,0142 g,

$m_2$  = masa vijalice nakon uparavanja = 10,0767 g,

$m_3$  = masa eteričnog ulja.

Konačni prinos eteričnog ulja iznosio je 0,06%, a određen je na sljedeći način:

$$\text{Prinos} = \frac{m_3}{m_{\text{dragoljub}}} * 100,$$

$m_{\text{dragoljub}}$  = masa ukupne količine sjemenki dragoljuba = 100,20 g.



## 2.6. *In vitro* dvofazni model probave

Dvofazni *in vitro* model probave podrazumijeva simuliranu probavu u želucu i u tankom crijevu te je rađen prema metodi koju su opisali Furlund i suradnici.[25] Za izradu ovog rada korištene su koncentracije za eterično ulje visokog dragoljuba i čistog spoja butil-izotiocijanata od 9 mg/mL. Simulacija probave u želučanoj i crijevnoj fazi odvijala se pri temperaturi od 37 °C i brzini okretanja od 1 200 rpm/min u inkubatoru prikazanom na slici 9. Volumen probavnih sokova koji je odgovarao enzimskoj aktivnosti od 1 U iznosio je 20 µL za želučani sok te 25 µL za crijevni sok.

Ukupni volumen uzorka i probavnih sokova bio je 1,5 mL. Prije dodatka želučanog soka, pH uzorka namješten je na 2,5 koristeći 1 M HCl. Uzorci pripremljeni u 70%-tnom etanolu bez dodavanja lužine bili su u području neutralne pH vrijednosti. U uzorke je dodano 260 µL želučanog soka i 650 µL crijevnog probavnog soka. Uzorci su nakon dodavanja probavnih sokova nadopunjeni etanolom do volumena od 1,5 mL. Neprobavljeni uzorak nije sadržavao probavne sokove niti je išao na postupak inkubacije, ali je ipak nadopunjen etanolom do volumena od 1,5 mL. Uzorci su nakon pripreme stavljeni na miješalicu Vortex radi postizanja veće homogenosti. Period inkubacije želučane faze bio je 30 minuta, dok je period inkubacije crijevne faze bio 120 minuta. Nakon završetka inkubacije, uzorci su stavljeni na led od 5 do 10 minuta da bi se zaustavila enzimska reakcija. Nakon toga, uzorci su centrifugirani u periodu od 5 minuta na sobnoj temperaturi i brzini okretanja od 11 000 rpm/min. Po završetku centrifugiranja odvojen je gornji sloj uzoraka te pohranjen na temperaturi od -20 °C do daljnjih analiza.





Slika 9. Prikaz inkubatora za simulaciju *in vitro* probave

Biodostupnost spoja izražava se kroz udio spoja u gornjem sloju koji je ostao nakon postupka centrifugiranja, a izračunava se prema sljedećoj formuli:

$$\text{Biodostupnost} = \frac{\text{koncentracija uzorka poslije probave u gornjem sloju}}{\text{koncentracija uzorka prije probave}} * 100.$$

## 2.7. GC-FID

Kvantitativna analiza spojeva u odvojenom gornjem sloju određena je uz pomoć plinskog kromatografa (model 7890A) prikazanog na slici 10., koji je opremljen s samouzorkivačem (model 7683B), plamenoionizacijskim detektorom (engl. *Flame Ionisation Detector, FID*), nepolarnom kapilarnom kolonom HP-5 čija je dužina 30 m, promjer 0,32 mm i debljina stacionarne faze 0,25  $\mu\text{m}$ . Prve 3 minute početna temperatura analize iznosila je 60 °C, a nakon toga slijedi zagrijavanje do 246 °C brzinom 10 °C/min i ta temperatura je zadržana 5 minuta. Inertni plin nosilac je helij, a brzina protoka je 1 mL/min. Mjerenje je ukupno trajalo 26,6 minuta. Identifikacija sastojaka je izvršena usporedbom njihovih vremena zadržavanja s vremenom

zadržavanja komercijalnog standarda pri jednakim uvjetima mjerenja. Kvantifikacija je izvršena pomoću krivulje umjeravanja izrađene na način da se niz koncentracija standarda (od 0,01 do 10 mg/mL) mjeri pri jednakim uvjetima.



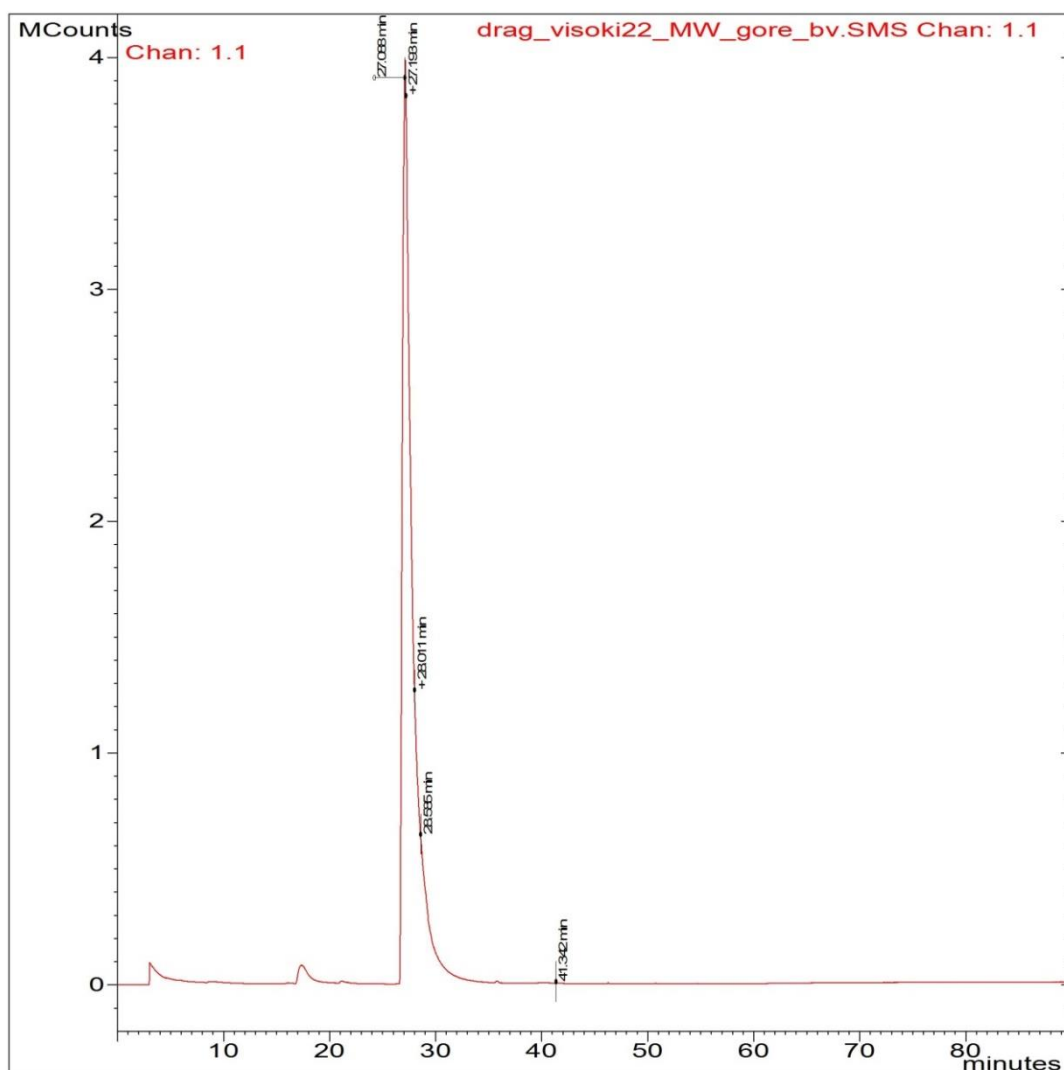
**Slika 10. Prikaz GC-FID uređaja**

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Biljka dragoljub pripada maloj porodici Tropaeolaceae koja je značajna po tome što sadrži važnu skupinu spojeva kao što su glukozinolati. Početni cilj ovog rada bio je izolirati eterično ulje sadržano u sjemenkama dragoljuba. Već od prije je iz dostupne literature poznato da je najznačajniji glukozinolat koji se nalazi u dragoljubu benzil glukozinolat (glupotropaeolin). Bilo kakvo oštećenje stanica potiče enzim mirozinazu da stupa u kontakt s glukozinolatima te katalizira njihovu razgradnju. Hidroliza glukozinolata je započela postupkom mljevenja sjemenki u električnom mlincu, ali puno važnija hidroliza je ona potaknuta mikrovalovima tijekom postupka mikrovalne ekstrakcije. Hidrolitičkom razgradnjom glukozinolata nastaju brojni razgradni produkti kao što su izotiocijanati, nitrili, itd. Kako bi se analizirali produkti razgradnje navedenog glukozinolata korišten je vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa. Analizom kromatograma utvrđena je zastupljenost prisutnih spojeva, a interpretacijom masenih spektara ti su spojevi identificirani. Budući da je iz prethodnih istraživanja utvrđeno da se benzil glukozinolat u većini slučajeva razlaže na benzil izotiocijanat, očekivala se prisutnost toga spoja. Za određivanje stabilnosti navedenog spoja korišten je dvofazni *in vitro* model probave, koji podrazumijeva želučanu i crijevnu fazu. Nakon provedene simulirane probave, uzorci su podvrgnuti analizi pomoću plinskog kromatografa s plameno-ionizacijskim detektorom u svrhu određivanja točne koncentracije prisutnog izotiocijanata. Kako bi se primjenom GC-FID tehnike odredila stabilnost prisutnog izotiocijanata u uzorku, urađena je i analiza čistog benzil izotiocijanata.

#### 3.1. Rezultati GC-MS analize eteričnog ulja biljke dragoljub

Analizom kromatograma dobiju se informacije o retencijskom vremenu tj. vremenu zadržavanja pojedinih komponenti prisutnih u uzorku, a integracijom površine ispod formiranog pika dobiju se informacije o relativnom udjelu svake od njih. GC-MS analizom se također dobiju i maseni spektri uz pomoć kojih se vrši potpuna identifikacija prisutnih spojeva. Kako pojedini fragment dolazi na detektor, nastaje specifični signal. Formira se niz pikova te se njihovom interpretacijom dobiju podaci o osnovnom i molekulskom piku na temelju kojeg se vrši točna identifikacija. Maseni spektar koji se dobije analizom se uspoređuje sa spektrima dostupnim u Wileyovoj bazi.



Slika 11. Kromatogram GC-MS analize eteričnog ulja dragoljuba

Kromatogram dobiven GC-MS analizom eteričnog ulja izoliranog iz biljke dragoljub je prikazan na slici 11. Analizom ovog kromatograma utvrđeno je da eterično ulje sadrži dva glavna spoja, od kojih jedan zauzima većinski dio i odgovara velikom piknu prikazanom na slici. Točna identifikacija spojeva prisutnih u eteričnom ulju, kao i njihovo retencijsko vrijeme i relativni udjeli, prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Rezultati GC-MS analize eteričnog ulja dragoljuba

Redni broj	Identificirani razgradni produkti glukozinolata	Retencijsko vrijeme (min)	Relativni udio (%)
1	benzil nitril	17,50	0,80
2	benzil izotiocijanat	27,11	97,81

Prema dobivenim rezultatima analize eteričnog ulja na kromatogramu su vidljiva dva pika, od kojih je jedan na retencijskom vremenu od 17,50 minuta s relativnim udjelom spoja u uzorku 0,80%, a drugi na retencijskom vremenu od 27,11 minuta s relativnim udjelom spoja 97,81%. Na osnovu dobivenih podataka i usporedbom s bazama podataka može se zaključiti da su u eteričnom ulju dragoljuba prisutna dva spoja, i to benzil nitril i benzil izotiocijanat. Na osnovu podataka iz tablice zaključuje se da je glavni produkt razgradnje benzil glukozinolata, kada se podvrgne prethodno opisanim uvjetima, benzil izotiocijanat.

### 3.2. Rezultati GC-FID analize nakon *in vitro* probave

Primjena GC-FID tehnike je korištena samo u svrhu određivanja kvantitativne analize te je zbog toga za identifikaciju spojeva prisutnih u uzorku eteričnog ulja dragoljuba bilo potrebno injektirati i standard kako bi se potvrdilo retencijsko vrijeme na kojem oni izlaze. Kvantifikacija spojeva je određena uz pomoć krivulje umjeravanja koja se izrađuje na način da se niz različitih koncentracija mjeri pri jednakim uvjetima.

Tablica 3. Rezultati GC-FID analize nakon *in vitro* probave

Uzorak	Koncentracija (mg/mL)	Površina pika	Biodostupnost (%)
Neprobavljeni uzorak EU dragoljuba	4,00702	1024,02966	-
Uzorak EU dragoljuba nakon želučane faze probave	3,87886	991,25629	96,75
Uzorak EU dragoljuba nakon crijevne faze probave	1,90036	485,29745	47,50
Neprobavljeni uzorak BITC	2,68029	684,74585	-
Uzorak BITC nakon želučane faze probave	2,64338	675,30731	98,50
Uzorak BITC nakon crijevne faze probave	1,98339	506,53055	73,88

EU – eterično ulje; BITC – benzil izotiocijanat

U tablici 3. su prikazani rezultati nakon provedene GC-FID analize, odnosno koncentracija benzil izotiocijanata u uzorku eteričnog ulja dragoljuba nakon želučane i crijevne faze probave te koncentracija čistog spoja benzil izotiocijanata nakon provedenih faza probave. Također, u tablici 3. su prikazane koncentracije ovog spoja u uzorcima koji nisu podvrgnuti *in vitro* metodi probave. Postotak biodostupnosti spoja je izračunat prema formuli koja je opisana u prethodnim poglavljima.

Rezultati analize su pokazali da je benzil izotiocijanat iz eteričnog ulja u želučanoj fazi probave stabilan spoj, što potvrđuje podatak da se njegova koncentracija smanjila za neznatnih 0,13 mg/mL u odnosu na neprobavljeni uzorak. S druge strane, benzil izotiocijanat iz eteričnog ulja podvrgnut crijevnoj fazi probave je manje stabilan jer se njegova koncentracija smanjila za gotovo polovinu svoje vrijednosti u odnosu na neprobavljeni uzorak.

Čisti benzil izotiocijanat koji se analizirao je nakon želučane faze također ostao stabilan jer se njegova koncentracija smanjila za samo 0,04 mg/mL u usporedbi s neprobavljenim uzorkom. Nakon crijevne faze probave, čisti benzil izotiocijanat je manje stabilan jer se njegova koncentracija smanjila za nešto više od četvrtine svoje početne vrijednosti u usporedbi s neprobavljenim uzorkom.

Budući da je benzil izotiocijanat iz eteričnog ulja više stabilan u želučanoj nego u crijevnoj fazi probave, samim time je i njegova biodostupnost u želucu znatno veća i iznosi 96,75%, dok je u crijevnoj fazi samo 47,50%. Isto tako, čisti spoj benzil izotiocijanata je više stabilan u želučanoj fazi probave, jer je njegova biodostupnost 98,50%, u odnosu na crijevu fazu gdje je ta vrijednost 73,88%.

Kod usporedbe benzil izotiocijanata iz eteričnog ulja s čistim spojem benzil izotiocijanata, iz rezultata se može zaključiti da su gotovo jednako stabilni u želučanoj fazi probave, jer njihova biodostupnost se razlikuje za samo 1,75%. S druge strane, benzil izotiocijanat iz eteričnog ulja u usporedbi s čistim spojem u crijevnoj fazi probave pokazuje drukčije ponašanje. Naime, benzil izotiocijanat iz eteričnog ulja ima puno manji postotak biodostupnosti u odnosu na čisti spoj. Brojni su razlozi zbog kojih može doći do promjene u koncentraciji pa tako i u biodostupnosti, ali se može pretpostaviti da je jedan od njih taj što su u eteričnom ulju dragoljuba, osim benzil izotiocijanata, prisutni i drugi spojevi koji u zadanim uvjetima izazivaju takve promjene, što bi se moglo dodatno istražiti.

#### 4. ZAKLJUČAK

- GC-MS analizom eteričnog ulja dragoljuba identificirana je prisutnost dvaju spojeva koji nastaju hidrolitičkom razgradnjom benzil glukozinolata, a to su benzil nitril u relativno maloj količini i puno zastupljeniji benzil izotiocijanat.
- Rezultati GC-FID analize dokazuju puno veću stabilnost benzil izotiocijanata kao čistog spoja i onog prisutnog u eteričnom ulju u želučanoj nego u crijevnoj fazi probave.
- Benzil izotiocijanat iz eteričnog ulja dragoljuba i čisti spoj benzil izotiocijanata imaju skoro jednaku stabilnost u želučanoj fazi, ali različitu u crijevnoj fazi probave.

## 5. LITERATURA

1. Parađiković N, Tkalec M, Komljenović V, Vinković T. Morfološki pokazatelji i sadržaj C vitamina u listu dragoljuba (*Tropaeolum majus*). 50. hrvatski i 10. međunarodni simpozij agronoma; 16.-20. veljače 2015, Opatija, Hrvatska.
2. Christenhusz MJM. *Tropaeolum majus*. Curtis's Botanical Magazine. 2012;29(4):331-340.
3. Jakubczyk K, Janda K, Watychowicz K, Łukasiak J, Wolska J. Garden nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) - a source of mineral elements and bioactive compounds. Rocznik Panstw Zakl Hig. 2018;69(2):119-126.
4. <https://www.pinterest.com/pin/112519690661595028> (Pristupljeno 24.7.2019.)
5. Navarro-González I, González-Barrio R, García-Valverde V, Bautista-Ortín AB, Periago MJ. Nutritional Composition and Antioxidant Capacity in Edible Flowers: Characterisation of Phenolic Compounds by HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>. Int. J. Mol. Sci. 2015;16:805-822.
6. Carlson KD, Kleiman R. Chemical Survey and Erucic Acid Content of Commercial Varieties of Nasturtium, *Tropaeolum majus* L. JAOCS. 1993;70(11):1145-1148.
7. Rop O, Mlcek J, Jurikova T, Neugebauerova J, Vabkova J. Edible Flowers – A New Promising Source of Mineral Elements in Human Nutrition. Molecules. 2012;17:6672-6683.
8. Brondani JC, Cuelho CHF, Marangoni LD, de Lima R, Guex CG, Bonilha IF, Manfron MP. Traditional usages, botany, phytochemistry, biological activity and toxicology of *Tropaeolum majus* L. - A review. Bol. Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2016;15(4):77-86.
9. Kopjar M, Šubari D, Piližota V. Glukozinolati: biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi. Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku. 2012;1(1):22-35.
10. Butnariu M, Bostan C. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of the volatile oil compounds from *Tropaeolum majus* L. (Nasturtium). Afr. J. Biotechnol. 2011;10(31):5900-5909.
11. Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. Phytochemistry. 2001;56:5-51.
12. Zekić M. Glukozinolati odabраниh samonikliх biljaka porodice *Brassicaceae* [doktorski rad]. Zagreb, Hrvatska: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; 2013.



13. Sedlar A. Izolacija i identifikacija hlapljivih sumporovih spojeva odabranih biljaka porodice Brassicaceae [diplomski rad]. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017.
14. Brown J, Morra MJ. Glucosinolate – Containing Seed Meal as a Soil Amendment to Control Plant Pests: 2000-2002. Kolorado, SAD: National Renewable Energy Laboratory; 2005.
15. Heaney RP. Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. *Journal of Nutrition*. 2001;131:1344-1348.
16. 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;3(24):1-12.
17. Kleinwächter M, Schnug E, Selmar D. The Glucosinolate – Myrosinase System in Nasturtium (*Tropaeolum majus* L.): Variability of Biochemical Parameters and Screening for Clones Feasible for Pharmaceutical Utilization. *J. Agric. Food Chem*. 2008;56:11165-11170.
18. Blekić M, Režek Jambrak A, Chemat F. Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol*. 2011;3(1):32-47.
19. Tatke P, Jaiswal Y. An Overview of Microwave Assisted Extraction and its Applications in Herbal Drug Research. *Res. J. Med. Plant*. 2011;5(1):21-31.
20. Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu, 4. izdanje. Zagreb, Hrvatska: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2011.
21. Jurić D. Primjena plinske kromatografije za određivanje sastava i udjela hlapivih komponenti različitih vrsta rakija s područja Hercegovine [diplomski rad]. Osijek, Hrvatska: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek; 2018.
22. Antolić N. Gastrointestinalna stabilnost ekstrakata komine masline [diplomski rad]. Zagreb, Hrvatska: Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2018.
23. Jin Hur S, Ou Lim B, Decker EA, McClements DJ. *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*. 2011;125:1-12.
24. 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.
25. Furlund CB, Kristoffersen AB, Devold TG, Vegarud GE, Jonassen CM. Bovine lactoferrin digested with human gastrointestinal enzymes inhibits replication of human echovirus 5 in cell culture. *Nutrition Research*. 2012;32(7):503–513.