

# In vitro bioraspoloživost polifenola komine masline

---

Srbić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:930928>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Marija Srbić**

**In vitro bioraspoloživost polifenola komine  
masline**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2018.

Ovaj rad je prijavljen na kolegiju Biokemija prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Ovaj rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (UIP-2014-09-0143).

*Zahvaljujem mentorici Dubravki Vitali Čepo i asistentici Sanji Jurmanović na susretljivosti, strpljenju i velikoj pomoći tijekom eksperimentalnog rada u laboratoriju i korisnim savjetima u vezi pisanja diplomskog rada, te mom dečku i obitelji koji su mi bili velika podrška.*

## SADRŽAJ

1.UVOD.....	1
1.1.Zdravstveni i farmakološki učinci polifenola komine masline: hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina.....	3
1.1.1.Antioksidativni učinci.....	3
1.1.2.Protuupalni učinci.....	3
1.1.3.Kardiovaskularni učinci.....	3
1.1.3.1.Antihipertenzivni učinci.....	3
1.1.3.2.Antiaterogeni i hipolipemički učinci.....	4
1.1.3.3.Antiagregacijski (antitrombotski) učinci.....	4
1.1.4.Antidijabetički učinci.....	4
1.1.5.Antikancerogeni i kemopreventivni.....	5
1.1.6.Neuroprotektivni učinci.....	5
1.1.7.Imunomodulatorni učinci.....	6
1.1.8.Gastrointestinalni učinci.....	6
1.1.9.Osteoprotektivni učinci.....	6
1.1.10.Respiratorni učinci.....	7
1.1.11.Antimikrobni učinci.....	7
1.1.11.1.Antibakterijski učinci.....	7
1.1.11.2.Antivirusni učinci.....	7
2.OBRAZLOŽENJE TEME. ....	8
3.MATERIJALI I METODE.....	9
3.1.Komina masline.....	9
3.2.Priprema ekstrakata komine masline .....	10
3.3.In vitro gastrointestinalna (GI) digestija.....	12
3.3.1.Materijali i kemikalije.....	14
3.3.1.1.Priprema kemikalija.....	15
3.3.2.Metode.....	16
3.4. Određivanje udjela HTS, TS i OLE HPLC-FLD metodom u frakcijama ekstrakata komine masline nakon simulacije gastrointestinalne digestije.....	21
3.4.1.Kemikalije i oprema.....	21
3.4.2.HPLC metoda.....	22

4. REZULTATI I RASPRAVA.....	24
4.1. Utjecaj in vitro GI digestije na gastričnu stabilnost, biološku dostupnost i dijalizibilnost uzoraka u smislu sumarne koncentracije hidroksitirosola i tirosola ( $\Sigma$ (HTS;TS) [mg/g]) .....	29
5.ZAKLJUČCI.....	34
6.LITERATURA.....	35
7.SAŽETAK/SUMMARY.....	39
8.PRILOZI.....	41
9.TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

## **POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU**

HTS-hidroksitirosol

TS-tirosol

OLE-oleuropein

OPE-ekstrakt komine masline (*eng.* Olive Pomace Extract)

HPLC-FLD –tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s fluorescencijskim detektorom (*eng.* High performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector)

GI digestija-gastrointestinalna digestija

CD-ciklodekstrin (*eng.* cyclodextrin)

R; RAMEB-nasumično metilirani beta ciklodekstrin (*eng.* Randomly Methylated  $\beta$ -cyclodextrine)

HPB-hidroksipropil beta ciklodekstrin

NE-nativni ekstrakt (*eng.* native extract)

PP-polifenoli (*eng.* Polyphenols)

## 1.UVOD

Polifenoli su velika skupina sekundarnih metabolita biljaka koja obuhvaća nekoliko tisuća spojeva te je njihova uloga antioksidativna obrana od UV zračenja te obrana od patogena. Osim toga, polifenoli doprinose organoleptičkim svojstvima (boji, okusu i mirisu) plodova biljaka i njihovih produkata. Primjerice, polifenoli masline doprinose gorkom okusu, boji i mirisu te oksidativnoj stabilnosti maslinovog ulja (Pandey, 2009).

Komina masline je čvrsti nusprodukt koji zaostaje u procesu tiještenja maslinovog ulja, a sastoji se od kožice, pulpe i koštice te dijela ulja. Kemijski gledano, komina masline se sastoji najvećim dijelom od sirovih vlakana i ugljikohidrata (većinom polisaharida), zatim od proteina, masnih kiselina (najzastupljenija je oleinska kiselina 18:1, omega 9), polialkohola te polifenola i drugih pigmenata. Fenolni spojevi komine masline mogu se podijeliti u nekoliko skupina: jednostavne fenole (npr. tirosol (TS) i hidrokstitirosol (HTS)), derivate cimetne kiseline, flavonoide (npr. apigenin, luteolin i rutin) te sekoiridoide (oleuropein (OLE)) (Obied i sur., 2007). HTS i TS nastaju tijekom sazrijevanja plodova masline metabolizmom oleuropeina, odnosno njegovom hidrolizom (Syed Haris, 2010).

Strukturno gledano, oleuropein je ester hidrokstitirosola i elenoične kiseline (sekoiridoidni prekursor HTS-a), dok je hidrokstitirosol, kao što sam naziv govori, zapravo hidrokstilirani tirosol. Razlikovanje hidrokstitirosola i tirosola u samo jednoj hidrokstilnoj skupini je vidljivo i iz njihovih kemijskih naziva: *p*-hidroksifeniletanol i 3,4- dihidroksifeniletanol (Rigacci i Stefani, 2016).

Porastom proizvodnje maslinovog ulja, povećala se i količina komine masline kao njezinog nusprodukta te su se počele preispitivati mogućnosti iskorištavanja nastalog "otpada". Budući da se pokazalo da je komina masline izrazito bogata polifenolima, čak i više nego samo djevičansko maslinovo ulje, odličan način njezinog iskorištavanja bila bi ekstrakcija prisutnih polifenola i njihovo uklapanje u dodatke prehrani. Korištenjem ekscipijensa poput ciklodekstrina (CD) te liofilizacije kao tehnike sušenja, moguće je povećati topljivost i stabilnost tih ekstrakata. Naime, ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi koji se zbog svoje hidrofobne unutrašnjosti, a hidrofilne vanjske površine, koriste kao ekscipijensi (pomoćne tvari) u formulaciji farmaceutskih pripravaka, radi povećanja topljivosti i biorasploživosti djelatnih tvari. Povećanje topljivosti i biorasploživosti postiže se uklapanjem hidrofobne djelatne tvari u hidrofobnu unutrašnjost ciklodekstrina. Nastali inkluzijski kompleks ciklodekstrina i djelatne tvari ima veću topljivost od same djelatne tvari zbog spomenute hidrofilne vanjske površine ciklodekstrina. Nakon otapanja inkluzijskog kompleksa u

gastrointestinalnom traktu, ciklodekstrini djeluju kao nosači koji hidrofobne djelatne tvari isporučuju do mjesta asporpcije (Jug, Bećirević-Laćan, 2008). Liofilizacija, odnosno sušenje smrzanjem, omogućuje sušenje tvari koje su termolabilne i nestabilne u vodenom mediju, budući da se odvija pri niskoj temperaturi te se voda sublimacijom direktno prevodi iz krutog u plinovito stanje bez prolaska kroz tekuću fazu (Lavakumar i sur., 2013.).

Najvažniji predstavnici polifenola komine masline, prisutni u najvećoj koncentraciji te koji su najviše odgovorni za brojne zdravstvene učinke, su hidroksitirozol (HTS), tirozol (TS) i oleuropein (OLE). Neki od važnijih farmakoloških učinaka polifenola su antioksidativno, protuupalno, antimikrobno, imunomodulatorno, antikancerogeno i kemopreventivno djelovanje te protektivni učinci na kardiovaskularni, gastrointestinalni i središnji živčani sustav (Obied i sur., 2012). U podlozi svih tih učinaka nalaze se dva glavna mehanizma djelovanja: nespecifični (kemijski) i specifični (farmakološki). Nespecifični mehanizam djelovanja polifenola obuhvaća uklanjanje reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva, odnosno keliranje metala i reduktivno djelovanje te je odgovoran za njihov antioksidativni učinak. Nasuprot tome, specifični (farmakološki) mehanizmi djelovanja obuhvaćaju modulaciju ekspresije gena i aktivnosti enzima, utjecaj na staničnu signalizaciju te vezanje za receptore. Naime, jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva polifenola omogućila su im sposobnost vezanja za raznovrsne molekularne mete, uključujući lipide, proteine, ugljikohidrate i nukleinske kiseline. Saznanja o njihovim farmakološkim učincima proizlaze iz većeg broja pretkliničkih studija (in vitro, ex vivo te in vivo), uz dodatak nekoliko kliničkih studija (Obied i sur., 2012).

Budući da većina kroničnih bolesti, poput dijabetesa, ateroskleroze, Alzheimerove bolesti i nekih tipova karcinoma, u patogenezi sadrži upalu i oksidativni stres, polifenoli masline sa svojim protuupalnim i antioksidativnim djelovanjem posjeduju velik potencijal u prevenciji i liječenju takvih bolesti.



## **1.1. Zdravstveni i farmakološki učinci polifenola komine masline: hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina**

### **1.1.1. Antioksidativni učinci**

Povećan unos polifenola masline može značajno smanjiti oksidativni stres, koji nastupa kada količina nastalih slobodnih radikala u stanici nadilazi kapacitet endogenog antioksidacijskog sustava, poput glutation peroksidaze. Slobodni radikali mogu narušiti strukturu, a time i funkciju bioloških makromolekula poput lipida, proteina i nukleinskih kiselina te time izazvati apoptozu ili staničnu smrt. Mehanizmi antioksidativnog djelovanja polifenola masline su neutralizacija reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva, keliranje metala i reduktivno djelovanje. Antioksidativni učinak je temelj antidijabetičkog, antiaterogenog, neuroprotektivnog, imunomodulatornog te antikancerogenog i kemopreventivnog učinka.

### **1.1.2. Protuupalni učinci**

Protuupalni učinci polifenola komine masline temelje se na inhibiciji enzima ciklooksigenaze i lipooksigenaze koji prevode arahidonsku kiselinu u medijatore upale (prostaglandine i leukotriene) te inhibiciji proupalnih citokina (kemokina, interleukina 1,6 i 8 te faktora nekroze tumora). Tako su primjerice, in vitro, HTS i TS smanjili ekspresiju ciklooksigenaze-2, a TS ujedno i inhibirao oslobađanje arahidonske kiseline. Oleuropein i hidroksitirosol su smanjili kroničnu upalu i oksidativni stres na modelu štakora kod prehranom inducirane pretilosti i dijabetesa (Obied i sur., 2012).

### **1.1.3. Kardiovaskularni učinci**

Povećan unos polifenola masline smanjuje rizik od hipertenzije, tromboze i ateroskleroze (Obied i sur.,2012).

#### **1.1.3.1. Antihipertenzivni učinak**

Antihipertenzivni učinak polifenola masline temelji se na vazodilataciji postignutoj inhibicijom kalcijevih kanala i povećanjem sinteze dušikovog oksida. Prehrana bogata polifenolima masline tijekom četiri tjedna je smanjila sistolički tlak kod starijih dijabetičara i smanjila doze antihipertenziva (Obied i sur.,2012).

### **1.1.3.2. Antiaterogeni i hipolipemički učinak**

Polifenoli smanjuju vaskularnu disfunkciju uzrokovanu oksidativnim stresom uklanjanjem slobodnih radikala koji prevode LDL u oksidirani LDL, jedan od glavnih čimbenika patogeneze ateroskleroze. Antiaterogena aktivnost polifenola obuhvaća smanjenje razine LDL-a, oksidiranog LDL-a, ukupnog kolesterola i triglicerida te povećanje razine zaštitnog HDL-a. Davanje hidroksitirosola dijabetičkim štakorima rezultiralo je smanjenjem razine triglicerida i LDL-kolesterola, a povećanjem zaštitnog HDL kolesterola (www.ncbi.nlm.nih.gov).

### **1.1.3.3. Antiagregacijski (antitrombotski) učinak**

In vitro, HTS i OLE su inhibirali ekspresiju endotelnih adhezijskih molekula i time prevenirali agregaciju trombocita. HTS je in vitro te u studiji na štakorima postigao antitrombotski učinak sličan onom acetilsalicilne kiseline, tako što je inhibirao sintezu tromboksana, a potaknuo sintezu dušikovog oksida. Osim toga, u maloj kliničkoj studiji, ekstrakt bogat hidroksitirosolom je kod 5 pacijenata s dijabetesom tip 1 tijekom 4 dana smanjio plazmatsku koncentraciju tromboksana B2. U kontroliranoj jednostruko slijepoj studiji, 180 pacijenata je njegovalo mediteransku prehranu bogatu polifenolima masline, što je rezultiralo poboljšanjem endotelne funkcije i smanjenjem vaskularnih upalnih markera (Obied i sur., 2012).

### **1.1.4. Antidijabetički učinci**

Oksidativni stres igra ključnu ulogu u patogenezi i razvoju komplikacija dijabetesa oštećivanjem enzima i beta stanica gušterače, potenciranjem lipidne peroksidacije i doprinosom razvoju inzulinske rezistencije. Polifenoli masline postižu euglikemijske učinke na nekoliko načina: zaštitom beta stanice gušterače od disfunkcije i apoptoze uzrokovane oksidativnim stresom, povećanjem sekrecije inzulina te povećanjem osjetljivosti stanica na inzulin (Obied i sur., 2012). In vitro, oleuropein je smanjio nekrozu i apoptozu beta stanica i poboljšao sekreciju inzulina u stanicama izloženim vodikovom peroksidu (Cumaoglu i sur., 2011). OLE i HTS su pokazali hipoglikemijsku aktivnost na različitim životinjskim modelima dijabetesa tip 1 (Jemai i Sayadi, 2009). Povrh toga, polifenoli masline mogu inhibirati probavne enzime zaslužne za razgradnju ugljikohidrata, poput alfa amilaze i alfa glukozidaze, i time doprinijeti kontroli postprandijalne glukoze u krvi (Obied i sur. 2012).

### **1.1.5. Antikancerogeni i kemopreventivni učinci**

Oksidoredukcijska ravnoteža ima važnu ulogu u procesima rasta, signalizacije i smrti stanice. Antikancerogeni i kemopreventivni učinci polifenola masline temelje se na smanjenju oštećenja uzrokovanih oksidativnim stresom i regulaciji staničnog ciklusa inhibicijom proliferacije stanice ili indukcijom apoptoze. Tako je primjerice HTS na stanicama promijelocitne leukemije i adenokarcinoma kolona izazvao apoptozu, a neke zarobio u G0/G1 fazi, dok na zdravim limfocitima nije zabilježen takav učinak (Bartolomeo i Fabiani, 2002). HTS i OLE su inhibirali signalizaciju ovisnu o estrogenu u stanicama raka dojke (Siriani i sur., 2010). U životinjskom modelu raka kolona, HTS je suprimiranjem osi dvaju faktora, hipoksija inducibilnog faktora 1a i vaskularnog endotelnog faktora rasta, izazvao antiangiogenetski učinak (Donnini i Terzuoli, 2010), dok je na modelu raka dojke kod štakora stimulirao ekspresiju gena za apoptozu (Granados-Principal i Quiles, 2011). Polifenoli djevičanskog maslinovog ulja su in vitro inhibirali nekoliko stadija karcinogeneze kolona (inicijaciju, propagaciju i metastazu), suprimirali spontanu tumorigenezu u jetri miša te kod karcinoma dojke, koji pretjerano eksprimira HER 2, potaknuli njegovu proteasomsku razgradnju (Obied i sur., 2012). OLE je in vitro inhibirao proliferaciju vaskularnih glatkih mišića te izazvao potpuno povlačenje spontanih tumora pri oralnoj primjeni kod miša (Castellon i Hamdi, 2005). TS je pokazao antiproliferativni učinak kod humanog karcinoma kolona te je inducirao apoptozu na staničnoj liniji raka dojke (Obied i sur., 2012).

### **1.1.6. Neuroprotektivni učinci**

Kao što je ranije spomenuto, polifenoli masline sa svojim protuupalnim i antioksidativnim djelovanjem imaju potencijal u prevenciji i usporavanju progresije neurodegenerativnih bolesti. Naime, mozak, kao najveći potrošač kisika u ljudskom tijelu, izrazito je podložan oksidativnom stresu, zbog obilja lako oksidirajućih polinezasićenih masnih kiselina i katalitičkih metalnih iona, u kombinaciji s neučinkovitim sustavom za antioksidacijsku obranu. Oksidativni stres djeluje neurotoksično, odnosno izaziva strukturna oštećenja neurona koja rezultiraju ireverzibilnim gubitkom funkcije i staničnom smrti. Povrh toga, kao posljedica nakupljanja oksidiranih biomolekula, sekundarno se razvijaju upalni procesi. Primjerice, prekomjerno stvaranje slobodnih radikala i oksidativni stres (lipidna peroksidacija) su rani markeri u patologiji Alzheimerove bolesti. Na mišjem modelu Alzheimerove bolesti, polifenoli masline su smanjili znakove oksidativnog stresa te povećali spodobnosti učenja i pamćenja, dok su HTS i OLE, in vitro, spriječili nakupljanje amiloid

beta i tau proteina, glavnih markera Alzheimerove bolesti koji dodatno potiču oksidativni stres (Obied i sur., 2012)

#### **1.1.7. Imunomodulatorni učinci**

Stanice imunološkog sustava su izrazito podložne oksidaciji zbog visokog udjela polinezasićenih masnih kiselina u staničnim membranama, stoga je održavanje redoks ravnoteže izuzetno važno za funkciju cjelokupnog imunskog sustava.

Osim toga, oksidirane makromolekule poput DNA, proteina i fosfolipida izrazito aktiviraju imunološki sustav i pridonose razvoju autoimunih bolesti, poput reumatoidnog artritisa. U studiji na miševima se pokazalo da prehrana bogata polifenolima masline poboljšava funkciju stanica imunološkog sustava. Tako primjerice, HTS i TS poboljšavaju signalizaciju i ekscitabilnost monocita povećanjem razine kalcija u citosolu. In vitro, HTS je zaštitio neutrofile uklanjanjem vodikovog peroksida. Ekstrakt komine masline (eng. olive pomace extract, OPE) je poboljšao mobilnost te smanjio bolove i razine serumskog homocisteina kod pacijenata s reumatoidnim artritisom (Obied i sur.,2012).

#### **1.1.8. Gastrointestinalni učinci**

HTS i OL posjeduju baktericidnu aktivnost prema *Helicobacter pylori*, glavnom uzročniku ulkusa želuca. Prehrana bogata polifenolima masline smanjila je oštećenja želučane stijenke izazvana nesteroidnim protuupalnim lijekovima povećanjem aktivnosti glutation peroksidaze i smanjenjem apoptoze, te je smanjenjem sinteze upalnih enzima suprimirala razvoj kolorektalnog karcinoma, na mišjem modelu ulcerativnog kolitisa. Polifenoli masline inhibirali su nuklearni faktor kapa B (NF-kB) u stanicama humanog želučanog adenokarcinoma (Obied i sur.,2012).

#### **1.1.9. Osteoprotektivni učinci**

Polifenoli masline (HTS, TS i OLE), in vitro i in vivo, smanjuju rizik od osteoporoze inhibicijom lučenja upalnih citokina (interleukina 1 i 6 te faktora nekroze tumora), koji potiču resorpciju kostiju, te povećanjem diferencijacije osteoblasta. U prilog postojanju osteoprotektivnih učinaka govore i podaci epidemioloških studija o manjoj zastupljenosti osteoporoze u područjima s mediteranskom prehranom, odnosno većim unosom polifenola masline (Obied i sur., 2012).

### **1.1.10. Respiratorni učinci**

Upala i oksidativni stres igraju ključnu ulogu u patogenezi respiratornih bolesti poput plućne fibroze i kronične opstruktivne bolesti pluća. Budući da polifenoli masline imaju antioksidativno i protuupalno djelovanje, njihov povećan unos prehranom mogao bi poboljšati i terapijski ishod u takvim bolestima. Ekstrakt komine masline bogat hidroksitirolokom prevenirao je oksidativni stres induciran pasivnim pušenjem u štakora (Obied i sur., 2012).

### **1.1.11. Antimikrobni učinak**

#### **1.1.11. 1. Antibakterijski učinak**

Polifenoli masline (HTS, OLE i TS) pokazuju širokospektralnu baktericidnu aktivnost, prema brojnim Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama, aerobnim i anaerobnim te intracelularnim i ekstracelularnim bakterijama. Najširu antibakterijsku aktivnost ima HTS, zatim OLE, a najužu TS. Mehanizam njihovog antibakterijskog djelovanja se temelji na uzrokovanju strukturalnih oštećenja na staničnoj membrani te na peptidoglikanima u staničnoj stijenci bakterija. Rafinirano maslinovo ulje za razliku od djevičanskog sadrži značajno manji udio polifenola i stoga ne posjeduje baktericidnu aktivnost. Neke od bakterija prema kojima HTS in vitro pokazuje antibakterijsku aktivnost su *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholera*, *M. pneumoniae*, *S. aureus* te *Clostridium perfringens*. U atopijskom dermatitisu povećan unos polifenola masline je eliminiralo infekciju sa *Staphylococcus aureusom* u 6 od 12 pacijenata (50%) (Dillague i Verallo-Rowell, 2008).

#### **1.1.11. 2. Antivirusni učinci**

Polifenoli masline sprječavaju ulazak virusa u stanicu, ometaju proizvodnju virusnih proteina, inhibiraju replikaciju i širenje virusa te stimuliraju njihovu fagocitozu; kod retrovirusa ujedno inhibiraju reverznu transkriptazu i proteazu. Zabilježena je in vitro antivirusna aktivnost hidroksitirolosa i oleuropeina prema HIV-1 virusu (Lee-Huang i Huang, 2007) te virusu gripe (Yamada i Ogawa, 2009).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Komina masline je čvrsti nusprodukt koji zaostaje u procesu proizvodnje maslinovog ulja, izrazito bogat polifenolima za koje je poznato da imaju brojne blagotvorne učinke na zdravlje čovjeka. Neki od važnijih zdravstvenih učinaka polifenola su antioksidativni, antimikrobni, imunomodulatorni, kemopreventivni, hipolipemički te hipoglikemički učinak.

Izvrstan način iskorištavanja "otpada" nastalog u procesu proizvodnje maslinovog ulja, bila bi ekstrakcija polifenola prisutnih u komini masline i njihovo uklapanje u dodatke prehrani ili funkcionalnu hranu. No, da bi polifenoli uopće mogli postići pozitivne učinke na zdravlje čovjeka, oni moraju biti biološki dostupni, odnosno moraju se osloboditi iz matriksa hrane tijekom probavnog procesa, zadržati kemijsko-strukturalne karakteristike u uvjetima probavnog trakta te biti dijalizibilni, odnosno kasnije se apsorbirati u tankom crijevu.

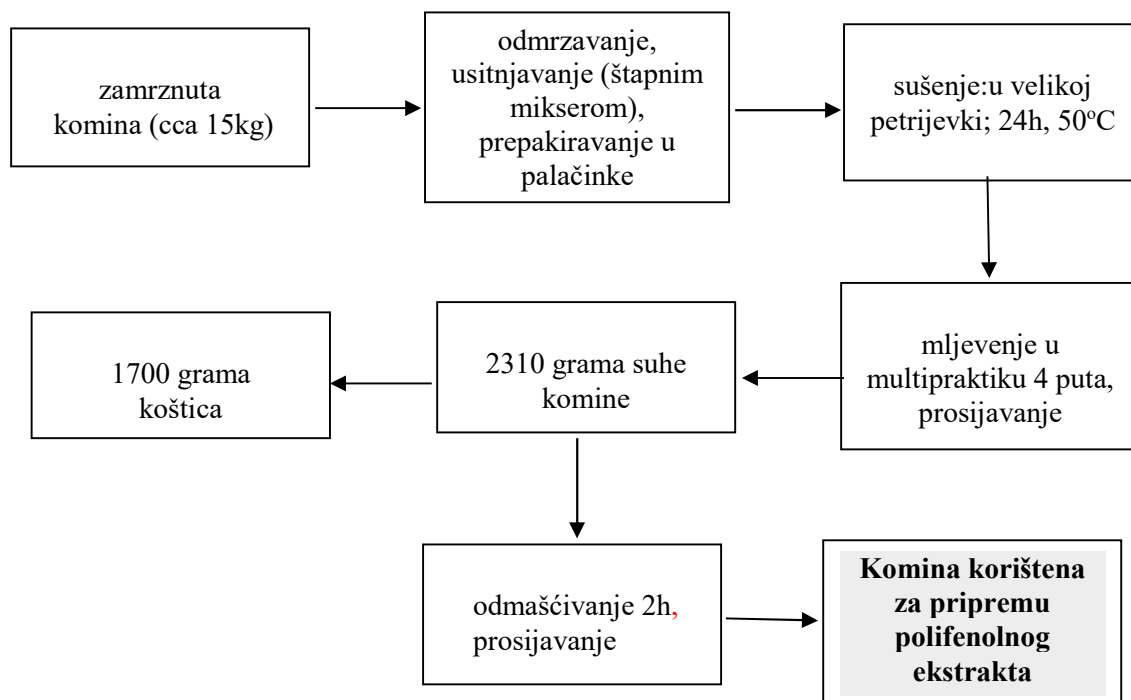
Glavni ciljevi ovog diplomskog rada bili su odrediti gastrointestinalnu stabilnost, biološku dostupnost te dijalizibilnost polifenola komine masline (hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina) korištenjem in vitro simulacije gastrointestinalne digestije s membranskom dijalizom te određivanjem njihovih udjela pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng.HPLC, high performance liquid chromatography), spregnute s fluorescencijskim detektorom (eng.FLD, fluorescence detector).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Komina masline

Uzorke komine masline korištene u ovom radu čini mješavina komina masline iz više hrvatskih uljara, prikupljena tijekom jeseni/zime 2014./2015. godine.

Svježa komina je pohranjena u zamrznutom stanju u obliku tankih ploča prosječne mase oko 100 g. Priprema ispitivanih uzoraka započela je odmrzavanjem, prebacivanjem u velike petrijeve zdjelice i sušenjem u laboratorijskoj peći tijekom 36 sati na 50 °C. Osušena komina je usitnjena, nakon čega je prosijana kroz sito poroziteta 1.25 mm kako bi se uklonile koštice masline. Osušena i prosijana komina potom je odmašćena metodom po Soxhlet-u s otapalom petroleterom tijekom 2 sata te ponovno usitnjena i prosijana kroz sito veličine pora 1.25 mm. Dobivena osušena, prosijana i odmašćena komina masline korištena je za sva daljnja istraživanja (Slika 1.)



Slika 1. : Shematski prikaz pripreme osušene, prosijane i odmašćene komine masline korištene za sva daljnja istraživanja.

### 3.2. Priprema ekstrakata komine masline

Polifenoli iz osušene, odmašćene i prosijane komine masline ekstrahirani su postupkom klasične ekstrakcije koja podrazumijeva korištenje otapala kao ekstrakcijskog sredstva. Budući da kvalitativni i kvantitativni sastav polifenola u ekstraktima komine masline izravno ovisi o tipu ekstrakcije i njezinim uvjetima, ekstrakcija se provodila prema prethodno optimiziranim parametrima: korištenjem 60 postotnog etanola kao otapala (ekstrakcijskog sredstva) te stavljanjem smjese uzorka (komine masline) i ekstrakcijskog sredstva u vodenu kupelj tijekom 2 sata na 70°C i 110 rpm-a. Dobiveni ekstrakti su zatim filtrirani kroz gusti filter, raspoređeni u tikvice i upareni na rotacijskom uparivaču, kako bi se iz njih uklonio etanol. Nakon uparavanja su zamrznuti i podvrgnuti liofilizaciji (sušenju smrzanjem) tijekom 48 h na -55°C (Alpha 1-4 freeze-dryer, Martin Christ, Osterode am Harz, Germany), kako bi se iz njih uklonila voda te kako bi se dobili suhi ekstrakti.

Uz nativni uzorak, pripremljeni su i uzorci s dodatkom različitih vrsta ciklodekstrina:  $\beta$ -ciklodekstrina, metiliranog- $\beta$ -ciklodekstrina (Randomly Methylated  $\beta$ -cyclodextrine – RAMEB),  $\gamma$ -ciklodekstrina i hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrina (HPB). Sastav i uvjeti pripreme uzoraka prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Izrada ekstrakata komine masline korištenjem ekscipijensa (ciklodekstrina) različitih vrsta te u različitim koncentracijama (8 mg/mL i 16 mg/mL).

Oznaka uzorka	Odvaga komine/g	Ekscipijens	Odvaga ekscipijensa/g	Volumen ekstrakcijskog sredstva/mL
NE	4	-	-	200
B8	4	$\beta$ -ciklodekstrin	1.6	200
G8	4	$\gamma$ -ciklodekstrin	1.6	200
G16	4	$\gamma$ -ciklodekstrin	3.2	200
HPB8	4	hidroksipropil- $\beta$ -ciklodekstrin	1.6	200



HPB16	4	hidroksipropil- $\beta$ - ciklodekstrin	3.2	200
R8	4	metil- $\beta$ - ciklodekstrin	1.6	200
R16	4	metil- $\beta$ - ciklodekstrin	3.2	200

Tablica 2. Maseni udjeli suhog ekstrakta komine masline (w(suhi OPE, tekući OPE)) i maseni udjeli ekstrakta komine masline (w(OPE, OPE+CD)) za pojedini uzorak.

Oznaka uzorka	w(OPE, OPE+CD)	w(dry OPE, wet OPE))
NE	1,00	0,96
B8	0,49	0,96
R8	0,50	0,96
R16	0,31	0,99
HPB8	0,47	0,98
HPB16	0,31	0,99
G8	0,47	0,99
G16	0,27	1,00

Masa suhih ekstrakata komine masline (eng.olive pomace extract, OPE) u gramima ( $m_{\text{suhi OPE}}$  [g]) dobivena je množenjem mase uzorka u gramima ( $m_{\text{uz}}$  [g]) s masenim udjelom suhog ekstrakta komine masline (w(suhi OPE, tekući OPE)) i masenog udjela ekstrakta komine masline (w(OPE, OPE+CD)):

$$m_{\text{suhi OPE}} [\text{g}] = m_{\text{uz}} [\text{g}] \times w(\text{OPE, OPE+CD}) \times w(\text{dry OPE, wet OPE}))$$

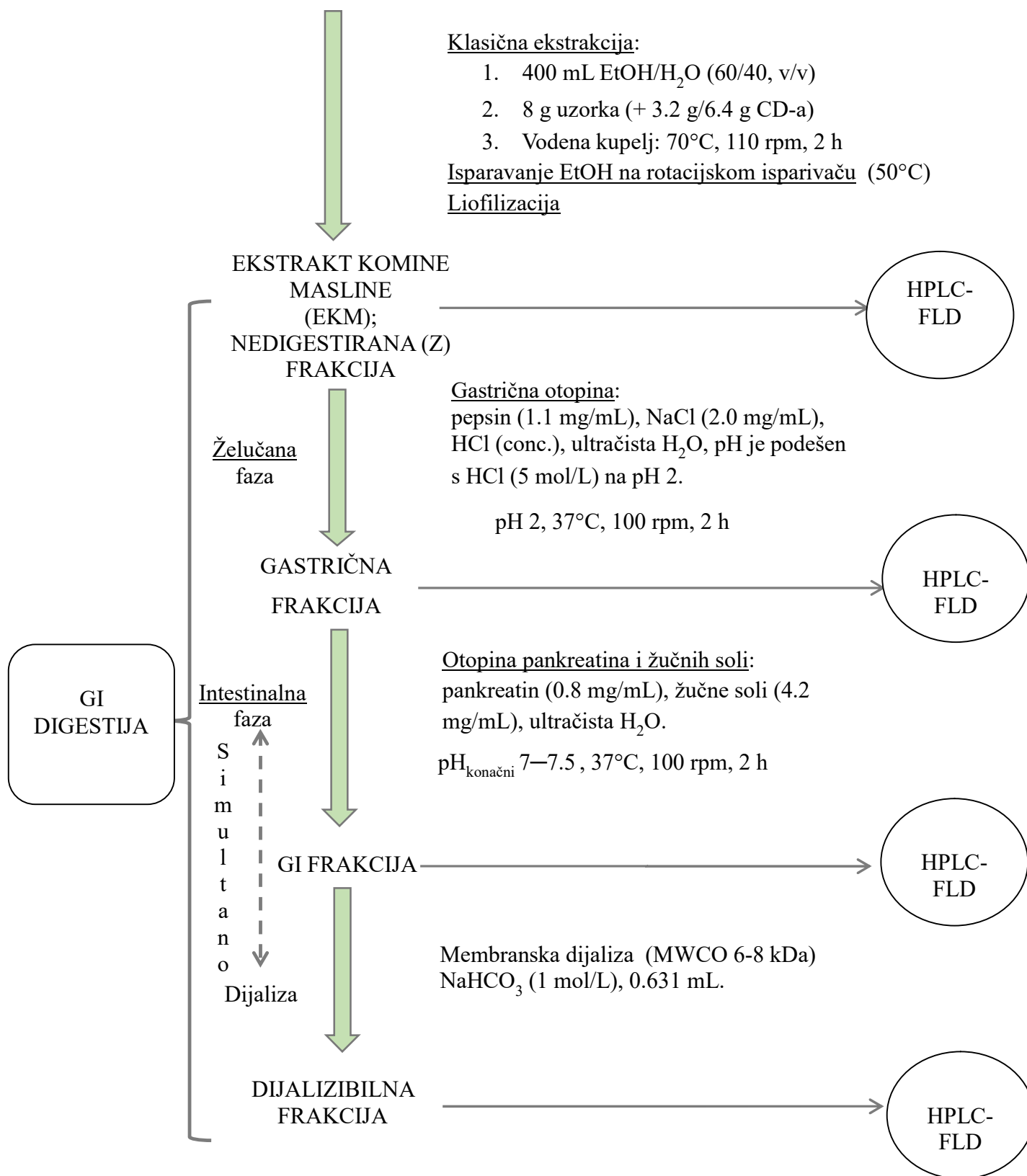
### 3.3. In vitro gastrointestinalna (GI) digestija

Da bi se utvrdila gastrična stabilnost, biološka dostupnost i dijalizibilnost polifenola komine masline, uzorci su podvrgnuti in vitro GI digestiji i paralelno analizirani na HPLC-u (slika 2.). Metoda gastrointestinalne (GI) digestije korištena u ovom istraživanju je bila provođena po uzoru na metodu koju su opisali Liang i sur. (2012), uz neke preinake. Sastoji se od dva sukcesivna koraka: početne digestije otopinom pepsina i klorovodične kiseline (HCl) kako bi se simulirali želučani uvjeti i zatim digestije s otopinom pankreatina i žučnih soli u svrhu imitiranja uvjeta u dvanaesniku, odnosno tankom crijevu. Membrana za dijalizu veličine pora 6-8 kDa je korištena za simulaciju intestinalnog transepitelnog transporta putem pasivne difuzije.

Alikvoti nedigestirane frakcije (ekstrakta komine masline prije početka GI digestije), gastrične frakcije, GI frakcije i dijalizibilne frakcije su analizirani HPLC-FLD metodom, kako bi se odredila koncentracija polifenola (HTS, TS, OLE). Analizom gastrične frakcije utvrđeno je koliko se polifenola oslobodilo nakon gastrične digestije. Otopina izvan membrane se analizirala kako bi se utvrdilo kolika je GI frakcija, odnosno koliko se polifenola oslobodilo nakon GI digestije. Nasuprot tome, analizom sadržaja membrane, odnosno otopine unutar membrane, utvrđeno je kolika je dijalizibilna frakcija, odnosno koliko je polifenola prešlo membranu za dijalizu.

Simultanost intestinalne faze i dijalize navedene na Slici 2. znači da se ta dva procesa odvijaju istodobno. Naime, riječ je o ravnotežnom procesu: mali (dijalizibilni) polifenoli prelaze membranu za dijalizu i vraćaju se nazad u intestinalnu fazu sve dok se njihove koncentracije u otopini izvan i unutar membrane ne izjednače. Postupak in vitro gastrointestinalne digestije je sumarno prikazan na Slici 2.

KOMINA MASLINE (osušena, odmaščena,  
prosijana) (+ ciklodekstrini, CD-i)



Slika 2.: Shematski prikaz *in vitro* gastrointestinalne (GI) digestije koja obuhvaća gastričnu (želučanu) fazu i intestinalnu fazu s dijalizom. Uzorci za HPLC dobiveni GI digestijom su bili nedigestirana (Z) frakcija (ekstrakt komine masline prije početka GI digestije), zatim gastrična frakcija, gastrointestinalna (GI) frakcija te dijalizibilna frakcija.

### 3.3.1. Materijali i kemikalije

- Uzorci: ekstrakti komine masline sa ili bez ekscipijensa (ciklodekstrina), prikazani u Tablici 3.

Tablica 3.: Uzorci korišteni u istraživanju.

Broj uzorka	Uzorak	Kratica
1	Nativni ekstrakt komine masline (OPE bez ekscipijensa)	NE
2	$\beta$ -CD (8 mg/mL)	B8
3	Nasumično metilirani $\beta$ -CD (8 mg/mL)	RAMEB8 ili R8
4	Nasumično metilirani $\beta$ -CD (16 mg/mL)	RAMEB16 ili R16
5	Hidroksipropil $\beta$ -CD (8 mg/mL)	HPB8
6	Hidroksipropil $\beta$ -CD (16 mg/mL)	HPB16
7	$\gamma$ -CD (8 mg/mL)	G8
8	$\gamma$ -CD (16 mg/mL)	G16

\*Ekstrakt komine masline bez ekscipijensa (nativni ekstrakt) te ekstrakti komine masline sa sljedećim ekscipijensima: beta-CD (B), nasumično metilirani beta-CD (RAMEB), hidroksipropil beta-CD (HPB), gama- CD (G). U tablici su u zagradama naznačene koncentracije korištenih ciklodekstrina (8 mg/mL i 16 mg/mL).

- Pepsin ( $\geq 500$  U mg<sup>-1</sup>) (pepsin izoliran iz gastrične mukoze svinje; Sigma-Aldrich)
- Pankreatin (aktivnost ekvivalentna 4x U.S.P. specifikaciji, pankreatin izoliran iz gušterače svinje; Sigma-Aldrich)

- Žučne soli (Sigma-Aldrich)
- Natrij-klorid, krist. p.a. (Almas-trade)
- HCl (konc. i 5 mol L<sup>-1</sup>) (Kemika)
- NaOH (0,5 mol L<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich)
- NaHCO<sub>3</sub> (1 mol L<sup>-1</sup>) (Lach-Ner, s.r.o.)
- Membrana za dijalizu MWCO 6-8 kDa (engl. *molecular weight cut-off*, MWCO) (Spectrum Laboratories, Inc.)
- „Falcon-kivete“, 15 mL

### 3.3.1.1. Priprema kemikalija

- Priprema 5 mol L<sup>-1</sup> HCl iz koncentrirane HCl:  
423,2 mL konc.HCl nadopuniti do 1L s ultračistom vodom u odmjerneji tikvici od 1L.
- Priprema NaOH (0,5 g mol L<sup>-1</sup>): 20,008 g čvrstog NaOH otopiti u ultračistoj vodi i pripremiti 1L otopine u odmjerneji tikvici.
- Priprema NaHCO<sub>3</sub> (1 mol L<sup>-1</sup>): 84,018 g čvrstog NaHCO<sub>3</sub> otopiti u ultračistoj vodi i nadopuniti ultračistom vodom do 1L u odmjerneji tikvici od 1L.

### 3.3.2. Metode

Provođenje metode GI digestije optimizirano je na uzorku koji sadrži nativni ekstrakt komine masline: pokus GI digestije ponovljen je tri puta s nativnim ekstraktom u duplikatu te se metoda pokazala ponovljivom  $RSD < 10\%$ .

Nakon optimiziranja metode, svi ostali uzorci analizirani su unutar jednog radnog dana, u duplikatu.

Budući da je svaki uzorak istraživan u duplikatu ( $n=2$ ), pri računanju daljnjih rezultata korištene su prosječne vrijednosti koncentracija polifenola za pojedinu frakciju GI digestije.

Slijepe probe pripremane su svaki radni dan, kako bi se detektirale interferencije ostalih tvari u pokusu.

#### ➤ Priprema gastrične otopine (GO)

Za jedan uzorak korišteno je 6,67 mL gastrične otopine po pokusu.

Za pripremu 50 mL otopine otopljeno je u miliQ-H<sub>2</sub>O:

- 53,3 mg pepsina ( $c_{kon} 1,066 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i
- 100,6 mg NaCl ( $c_{kon} 2,012 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Zatim je dodano 150  $\mu\text{L}$  HCl (konc.), nadopunjeno s miliQ-H<sub>2</sub>O do konačnog volumena od 50 mL.

pH je namješten s NaOH (0,5 M) na pH 2 (početni pH je svaki put bio oko 1,7-kako bi se postigao pH 2, dodano je oko 20 kapi 0,5 M NaOH).

#### ➤ Priprema otopine pankreatin-žučne soli (PŽ)

Za jedan uzorak korišteno je 1416  $\mu\text{L}$  PŽ otopine po pokusu.

Za pripremu 10 mL otopine otopljeno je u miliQ-H<sub>2</sub>O :

- 8 mg pankreatina ( $c_{kon} 0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ )
- 42 mg žučne soli ( $c_{kon} 4,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

➤ Postupak

1) Gastrična (želučana) faza (2 h, 37 °C, 100 rpm)

U „Falcon-kivete“ od 15 mL izvagano je oko 500 mg nativnog ekstrakta komine masline. Na uzorak je otpipetirano 6,67 mL gastrične otopine (GO). „Falcon-kivete“ su zamotane parafilmom i stavljene u vodenu kupelj na inkubaciju (2 h, 37 °C, 100 rpm). Nakon inkubacije „Falcon-kivete“ su stavljene u led. Otopina u „Falcon-kiveti“, nakon dodatka GO i nakon inkubacije, sadrži gastričnu frakciju, prikazanu na Slici 2, odnosno polifenole oslobođene nakon gastrične digestije.

Za analizu na HPLC-u otpipetiran je 1 mL svakog uzorka u čaše od 5 mL, koji je zatim profiltriran kroz filtere od 0,45 µm u staklene viala.

2) Intestinalna faza s dijalizom (2 h, 37 °C, 100 rpm)

U preostalu otopinu nakon gastrične inkubacije (5,67 mL) otpipetirano je 1418 µL PŽ otopine. Masa suhog ekstrakta komine masline ( $m_{\text{dryOPE}}$ ) u preostaloj gastričnoj otopini je umanjena sukladno uzimanju alikvota u gastričnoj fazi.

Membrane za dijalizu (uk. duljina membrane je oko 6,5 cm, a dio s otopinom je dug oko 4 cm) napunjene su s 631 µL otopine  $\text{NaHCO}_3$  ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Stavljene su u vodenu kupelj na inkubaciju (2 h, 37 °C, 100 rpm). Po završetku inkubacije „Falcon-kivete“ su stavljene u led.

Membrane su izvađene iz „Falcon-kiveta“ pincetom i kratko uronjene u miliQ- $\text{H}_2\text{O}$ . Potom su vrlo kratko stavljene na staničevinu da se osuše, te je sadržaj membrane preliven u čaše od 5 mL tako što je jedan kraj membrane odrezan škarama. U sadržaju membrane se nalazi dijalizibilna frakcija prikazana na Slici 2. Iz čaše je špricom uzet uzorak i zatim profiltriran kroz filtre pora 0,45 µm u viala za HPLC.

Otopini izvan membrana izmjeren je pH (pH je za uzorke iznosio oko 6,9, a za slijepe probe oko 7,5). Svima je dodano oko 250 µL HCl (5 M) (pH je za uzorke iznosio oko 1,7, a za slijepe probe oko 1,3). Zakiseljeni uzorci su profiltrirani kroz filtere za šprice od 0,45 µm u viala za HPLC. Otopina izvan membrane sadrži GI frakciju (Slika 2).

### Uzorci GI digestije:

Z- nedigestirana frakcija: nulta frakcija; uzorak (OPE (+CD-i)) otopljen u ultračistoj vodi.

G- gastrična frakcija; polifenoli oslobođeni nakon gastrične digestije.

Gastrointestinalna (GI) frakcija –polifenoli oslobođeni nakon GI digestije.

M (dijalizibilna frakcija u intestinalnoj fazi) – serumu dostupna frakcija.

dP<sub>TOT</sub> - ukupni (totalni) dijalizibilni polifenoli; serumu dostupna (bioraspoloživa) frakcija

dP<sub>OUT</sub> –dijalizibilni polifenoli koji se nalaze izvan membrane za dijalizu

dP<sub>IN</sub> - dijalizibilni polifenoli koji se nalaze unutar membrane za dijalizu; udio dP<sub>IN</sub> frakcije dobiven je HPLC analizom otopine unutar membrane.

ndP- nedijalizibilna frakcija; debelom crijevu dostupna frakcija.

OUT frakcija-

Biološki dostupni polifenoli- serumu i debelom crijevu dostupna frakcija.

### Formule korištene za izračunavanje udjela dobivenih frakcija uzoraka GI digestije:

Ukupni (totalni) dijalizibilni polifenoli (dP<sub>TOT</sub>) izračunati su kao zbroj dijalizibilnih PP-a koji se nalaze unutar membrane za dijalizu (dP<sub>IN</sub>) te izvan membrane za dijalizu (dP<sub>OUT</sub>), korištenjem formule:  $dP_{TOT} = dP_{IN} + dP_{OUT}$

Vrijednosti nedijalizibilne frakcije (ndP) izračunate su oduzimanjem OUT frakcije (zbroja ndP i dP<sub>OUT</sub> frakcija) i dijalizibilnih polifenola izvan membrane (dP<sub>OUT</sub>) (Tablica 4.)

$ndP = OUT (ndP + dP_{OUT}) - dP_{OUT}$

Biološki dostupni polifenoli izračunati su kao zbroj ukupnih dijalizibilnih polifenola (dP<sub>TOT</sub>) i nedijalizibilnih polifenola (ndP):

Biološki dostupni polifenoli =  $dP_{TOT} (dP_{IN} + dP_{OUT}) + ndP$

G [%] – gastrična stabilnost ili udio polifenola oslobođenih nakon gastrične digestije, dobiven dijeljenjem gastrične frakcije (G) s nedigestiranom frakcijom (Z):

$$G[\%] = \frac{G}{Z} \times 100$$



Dijalizibilnost je izračunata s obzirom na ukupnu količinu dijalizibilnih polifenola ( $dP_{TOT}$ ):

$$\text{Dijalizibilnost [\%]} = (dP_{TOT}/Z) \times 100$$

Udio nedijalizibilnih polifenola izračunat je oduzimanjem biološke dostupnosti i dijalizibilnosti

$$\text{Nedijalizibilna frakcija [\%]} = (\text{Biološka dostupnost [\%]} - \text{Dijalizibilnost [\%]})$$

Udio biološki dostupnih polifenola izračunat je dijeljenjem zbroja  $dP_{TOT}$  i ndP frakcija s nedigestiranom (Z) frakcijom:

$$\text{Biološki dostupni polifenoli [\%]} = (dP_{TOT} + ndP)/Z \times 100$$

Tablica 4. Sumarni prikaz frakcija uzoraka GI digestije i formula korištenih za izračunavanje njihovih udjela.

Z	Nulta frakcija; Nedigestirana frakcija; Uzorak (OPE (+CD-i)) otopljen u ultračistoj vodi.
G	Gastrična (želučana) frakcija; Polifenoli (PP-i) oslobođeni nakon gastrične digestije.
GI frakcija	Polifenoli oslobođeni nakon gastrointestinalne digestije.
$dP_{OUT}$	Dijalizibilni PP-i koji se nalaze izvan membrane za dijalizu.
$dP_{IN}$	Dijalizibilni PP-i koji se nalaze unutar membrane za dijalizu. Udio $dP_{IN}$ frakcije dobiven je HPLC analizom otopine unutar membrane.
OUT ( $ndP+dP_{OUT}$ )	OUT frakcija: zbroj nedijalizibilnih PP-a ( $ndP$ ) i dijalizibilnih PP-a u otopini izvan membrane za dijalizu ( $dP_{OUT}$ ). Udio OUT frakcije dobiven je HPLC analizom otopine izvan membrane.
$dP_{TOT} =$ $dP_{OUT}+dP_{IN}$	Udio ukupnih (totalnih) dijalizibilnih polifenola ( $dP_{TOT}$ ) izračunat je zbrajanjem udjela $dP_{OUT}$ frakcije (dijalizibilni PP-i koji se nalaze izvan membrane za dijalizu) te udjela $dP_{IN}$ frakcije (dijalizibilni PP-i koji se nalaze unutar membrane za dijalizu). Serumu dostupna (bioraspoloživa) frakcija.
M frakcija	Dijalizibilna frakcija u intestinalnoj fazi – serumu dostupna frakcija.

<p>Biološki dostupni PP-i</p>	<p>Udio biološki dostupnih PP-a izračunat je zbrajanjem udjela ndP frakcije (nedijalizibilnih polifenola) i dP<sub>TOT</sub> frakcije (ukupnih dijalizibilnih polifenola).</p> <p>Biološki dostupni PP-i = dP<sub>TOT</sub> (dP<sub>IN</sub> + dP<sub>OUT</sub>) + ndP</p> <p>Frakcija dostupna debelom crijevu i serumu.</p>
<p>ndP</p>	<p>Nedijalizibilna frakcija (ndP); Debelom crijevu dostupna frakcija. Udio ndP frakcije dobiven je oduzimanjem udjela OUT frakcije te udjela dijalizibilnih PP-a izvan membrane (dP<sub>OUT</sub>).</p> <p>ndP = OUT (ndP + dP<sub>OUT</sub>) - dP<sub>OUT</sub></p>
<p>Gastrična stabilnost: G [%]</p>	<p>Gastrična stabilnost je udio polifenola oslobođenih nakon gastrične digestije, dobivena dijeljenjem udjela gastrične frakcije (G) s udjelom nedigestirane frakcije (Z).</p> <p><b>Gastrična stabilnost [%] = <math>\frac{\text{Gastrična frakcija}}{\text{Nedigestirana frakcija}} \times 100</math></b></p> <p>ili skraćeno</p> <p><b>G[%] = <math>\frac{G}{Z} \times 100</math></b></p>
<p>Biološka dostupnost [%]</p>	<p>Biološka dostupnost izračunata je dijeljenjem udjela biološki dostupnih polifenola (zbroja dP<sub>TOT</sub> frakcije i ndP frakcije) s nedigestiranom frakcijom (Z):</p> <p><b>Biološka dostupnost [%] = <math>\frac{\text{Biološki dostupni PP-i}}{\text{Nedigestirana frakcija}} \times 100</math></b></p> <p>Ili</p> <p>Biološka dostupnost [%] = (dP<sub>TOT</sub> + ndP) / Z x 100</p>
<p>Dijalizibilnost [%]</p>	<p>Dijalizibilnost je izračunata dijeljenjem udjela ukupnih dijalizibilnih polifenola (dP<sub>TOT</sub>) s udjelom nedigestirane frakcije (Z):</p> <p>Dijalizibilnost [%] = (dP<sub>TOT</sub> / Z) x 100</p>

% nedijalizibilne frakcije	<p>Udio nedijalizibilnih polifenola izračunat je oduzimanjem postotka biološke dostupnosti i dijalizibilnosti:</p> <p><b>Nedijalizibilna frakcija [%] = (Biološka dostupnost[%] – Dijalizibilnost [%])</b></p>

### 3.4. Određivanje udjela HTS, TS i OLE HPLC-FLD metodom u frakcijama ekstrakta komine masline nakon simulacije gastrointestinalne digestije

#### 3.4.1. Kemikalije i oprema

- Acetonitril (CH<sub>3</sub>CN); HPLC stupnja čistoće ≥99,93 % (Sigma-Aldrich)
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH); HPLC stupnja čistoće ≥99,9 % (Sigma-Aldrich)
- Acetatni pufer
- Octena kiselina p.a., C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (konc. 99,5%) (Kemika)
- Natrij-acetat trihidrat, CH<sub>3</sub>COONa · 3H<sub>2</sub>O PhEur, p.a. (T.T.T.)
- Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u sprezi s fluorescentnim detektorom (HPLC-FLD, eng. *High-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detector*) (Waters 2695); FLD detektor 2475 Multiλ
- Viale 1,5 mL (LLG Labware)
- Filteri za pripremu uzoraka (LLG-PTFE syringe filter, promjer pora: 0,45 μm) (LLG Labware)
- Šprice (6 mL)
- Filteri od celuloze-acetata; promjer pora: 0,45 μm (Whatman)
- *Eppendorf* epruvete od 2 mL za uzorke
- Uzorak odmašćene i osušene komine masline iz dvofaznih sustava proizvodnje maslinovog ulja u Hrvatskoj (Zamrznuta komina → Odmrzavanje → Sušenje u velikoj petrijevki, 24 h, 50 °C → Usitnjavanje u tarioniku → Prosijavanje → Odmašćivanje (2

h) Soxhlet metodom (otapalo: petroleter) → Sušenje u velikoj pertijevki, 24 h, 50 °C  
→ (određivanje masenog udjela masti u komini) ⇒ Suha odmašćena komina

- Ultračista voda za HPLC

### **Priprema acetatnog pufera pH 5 (mobilna faza u HPLC metodi)**

- Pripremiti octenu kiselinu (0,1 M) – 5,88 mL koncentrirane octene kiseline nadopuniti do 1 L u odmjernoj tikvici od 1L s ultračistom vodom.
- Pripremiti natrijev-acetat (0,1 M) – 13,6 g natrijevog-acetata trihidrata otopiti u ultračistoj vodi i pripremiti 1 L otopine u odmjernoj tikvici.
- Pomješati 1 L otopine natrijevog-acetata (0,1 M) i 0,5 L octene kis. (0,1 M) te izmjeriti pH pufera pH-metrom – namjestiti da pH bude 5.
- Profiltrirati pufer (vakuum filtracija; Filteri od celuloze-acetata; promjer pora: 0,45 μm (Whatman))

### **Priprema ekstrakata za HPLC analizu**

- Uzorci se vorteksiraju, te profiltriraju preko šprice i filtera (Filteri za pripremu uzoraka (LLG-PTFE syringe filter, promjer pora: 0,45 μm)) u vialu za HPLC.

### **3.4.2.HPLC metoda**

- HPLC kolona: Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm)
- Mobilna faza (gradijentna elucija): A – acetatni pufer (pH 5), B – acetonitril (ACN)
- Valne duljine:  $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 635 \text{ nm}$

Pri identifikaciji i određivanju sadržaja polifenola (hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina) u suhim ekstraktima komine masline korištena je obrnuto fazna C18 kromatografska kolona dimenzija 250x4,6 mm i veličine čestica 5 μm. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 20 μL. Brzina protoka mobilne faze podešena je na 1 mL/min, a temperatura kolone na 40°C. Mobilne faze su činili acetatni pufer (pH 5, podešen s octenom kiselinom) (A) i acetonitril (B). Odjeljivanje (separacija) polifenola HTS, TS i OLE je postignuto gradijentnom elucijom tijekom 20 minuta, odnosno mijenjanjem sastava mobilne faze pod uvjetima prikazanim u Tablici 5.

Tablica 5. Gradijentni elucijski program kromatografske separacije hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina, pri čemu je korištena obrnuto fazna C18 kolona (250 x4,6 mm, 5  $\mu$ m).

<b>t [min]</b>	<b>Brzina protoka [mL min<sup>-1</sup>]</b>	<b>Mobilna faza A [%]</b>	<b>Mobilna faza B [%]</b>	<b>Broj pikova</b>
/	1	90	10	/
<b>4</b>	1	80	20	3
<b>8</b>	1	40	60	7
<b>11</b>	1	30	70	8
<b>15</b>	1	90	10	2
<b>20</b>	1	90	10	2

\* Mobilna faza A je bio acetatni pufer, a mobilna faza B je bio acetonitril.

Detekcija eluiranih pikova provedena je uz pomoć fluorescencijskog detektora pri valnim duljinama 280 (ekscitacija) i 635 nm (emisija) ( $\lambda_{ex}$ =280 nm i  $\lambda_{em}$ =635 nm). Identifikacija polifenola hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina postignuta je usporedbom vremena zadržavanja eluiranih pikova s vremenom zadržavanja njihovih odgovarajućih standarda. Kromatogrami standarda su prikazani u poglavlju Prilozi. Sadržaj (koncentracija) hidroksitirosola, tirosola i oleuropeina u ispitivanim uzorcima određen je iz izmjerene površine pika uz pomoć kalibracijskih krivulja s odgovarajućim jednadžbama. Koncentracija polifenola mjerena je jednom za svaki uzorak posebno.

#### 4.REZULTATI I RASPRAVA

Ovo istraživanje je prvi pokušaj ispitivanja gastrointestinalne (GI) stabilnosti, biološke dostupnosti i dijalizibilnosti polifenola komine masline.

Tablica 6. Rezultati dobiveni nakon in vitro GI digestije uzoraka i HPLC analize dobivenih frakcija izraženi kao zbroj koncentracija hidroksitirosola i tirosoła  $\Sigma(\text{HTS};\text{TS})$ .

		$\Sigma(\text{HTS};\text{TS})$ [mg/g]						
		Z	G	OUT (ndP+dP <sub>OUT</sub> )	dP <sub>OUT</sub>	dP <sub>TOT</sub> = dP <sub>OUT</sub> +dP <sub>IN</sub>	*ndP	Biološki dostupni PP-i= dP <sub>TOT</sub> +ndP
1	NE	1,24	1,13	0,99	0,63	0,69	0,36	1,04
2	B8	1,24	0,99	1,15	0,56	0,61	0,59	1,20
3	R8	1,29	1,08	1,24	0,60	0,66	0,63	1,29
4	*R16	1,37	1,10	1,30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	HPB8	1,38	1,03	1,27	0,47	0,51	0,80	1,31
6	HPB16	1,34	0,97	1,16	0,83	0,90	0,34	1,24
7	G8	1,34	1,33	0,84	0,56	0,61	0,27	0,89
8	G16	1,60	1,73	1,05	0,57	0,62	0,48	1,10

\* Sve frakcije (Z, G, OUT, dP<sub>OUT</sub>, dP<sub>TOT</sub>, ndP i biološki dostupni PP-i) svakog pojedinog uzorka (označenih kraticama NE, R8, R16, HPB8, HPB16, G8, G16) izražene su kao zbroj prosječnih koncentracija hidroksitirosola i tirosoła  $\Sigma(\text{HTS};\text{TS})$ .

\*Z- nedigestirana frakcija: nulta frakcija; uzorak (OPE (+CD-i)) otopljen u ultračistoj vodi.

G- gastrična frakcija; polifenoli oslobođeni nakon gastrične digestije.

dP<sub>TOT</sub> -ukupni (totalni) dijalizibilni polifenoli; serumu dostupna frakcija (bioraspoločiva frakcija)

dP<sub>OUT</sub> - dijalizibilni polifenoli koji se nalaze izvan membrane za dijalizu

dP<sub>IN</sub> - dijalizibilni polifenoli koji se nalaze unutar membrane za dijalizu

ndP - nedijalizibilna frakcija; debelom crijevu dostupna frakcija.

OUT-polifenoli koji se nalaze izvan membrane za dijalizu: zbroj topljive dijalizibilne (dP<sub>OUT</sub>) i nedijalizibilne frakcije (ndP).

\*Vrijednosti nedijalizibilne frakcije (ndP) izračunate su oduzimanjem OUT(ndP+dP<sub>OUT</sub>) frakcije i dP<sub>OUT</sub>.

\*Za uzorak R16 vrijednosti  $dP_{OUT}$ ,  $dP_{TOT}$  i  $ndP$  frakcija te biološki dostupnih polifenola nisu mogle biti definirane jer su bile ispod granice detekcije korištene HPLC metode.

Ciljevi HPLC analize frakcija uzoraka dobivenih tijekom pojedinih faza GI digestije su bili: detekcija i kvantifikacija polifenola HTS, TS i OLE. Da bi se neki analit mogao detektirati u uzorku, mora biti prisutan u količini koja prelazi granicu dokazivanja ili detekcije (*eng.* limit of detection, LOD), a da bi se mogao kvantificirati, mora biti prisutan u količini koja prelazi granicu određivanja ili kvantifikacije (*eng.* limit of quantitation, LOQ). Sva tri polifenola (hidroksitirosol, tirosol i oleuropein) su uspješno detektirana u svim frakcijama GI digestije, kod svakog pojedinog uzorka.

No, pri kvantifikaciji, kod analize nedigestiranog uzorka, ustanovljeno je da oleuropein, za razliku od hidroksitirosola i tirosola, nije moguće kvantificirati. Naime, površina pika oleuropeina bila je oko 6 puta manja od površine pika HTS-a i TS-a te su očitane vrijednosti bile ispod granice kvantifikacije primijenjene metode.

Zbog toga je oleuropein izostavljen iz rezultata, odnosno rezultati su izražavani u obliku zbroja prosječnih vrijednosti koncentracija hidroksitirosola i tirosola za pojedinu frakciju GI digestije:  $\sum(\text{HTS};\text{TS})$  [mg/g].

Biološka aktivnost tvari prvenstveno ovisi o njihovoj biološkoj dostupnosti u GI traktu te o bioraspoloživosti.

Biološka dostupnost (*eng.* bioaccessibility) ili GI stabilnost podrazumijeva oslobađanje tvari iz matriksa hrane u gastrointestinalnom mediju. Biološki dostupni polifenoli su dobiveni nakon ukupne digestije te ih čini zbroj dijalizibilnih polifenola (serumu dostupna frakcije) i nedijalizibilnih polifenola (debelom crijevu dostupne frakcije).

Bioraspoloživost opisuje frakciju tvari koja prelazi u sistemsku cirkulaciju nepromijenjena, odnosno u biološki aktivnom obliku. Bioraspoloživost ovisi o stupnju oslobađanja tvari iz matriksa hrane, odnosno biološkoj dostupnosti, o metabolizmu i stupnju apsorpcije u sistemsku cirkulaciju.

Tvari koje su u intestinalnom mediju topljive, odnosno koje se otpuštaju iz matriksa hrane, bivaju apsorbirane putem crijevnog epitela u sistemsku cirkulaciju. Za njih kažemo da su dijalizibilne ili bioraspoložive te da čine serumu dostupnu frakciju.

Dijalizibilnost govori o udjelu polifenola koji su prešli membranu za dijalizu, i mjera je njihove bioraspoloživosti (koncentracija polifenola koji su nepromijenjeni dospjeli u sistemsku cirkulaciju).

Tvari koje nisu topljive u gastrointestinalnom mediju, odnosno koje se ne otpuštaju iz matriksa hrane odlaze ne mogu se apsorbirati i stoga odlaze u debelo crijevo (frakcija dostupna debelom crijevu).

Dijalizibilni polifenoli prelaze mebranu za dijalizu jer su manji od veličine njezinih pora te stoga prelaze u serum. Drugim riječima, dijalizibilni polifenoli su bioraspoloživi, odnosno apsorbiraju se u tankom crijevu i prelaze u sistemsku cirkulaciju.

Nedijalizibilni polifenoli obuhvaćaju molekule koje su veće od veličine pora membrane za dijalizu, te stoga ne bivaju apsorbirani u tankom crijevu, već završavaju u debelom crijevu. Bioraspoloživost govori o udjelu tvari od unesene doze koja nepromijenjeno dospije u sistemsku cirkulaciju.

Prema rezultatima prikazanim u Tablici 5., dobivenim HPLC analizom frakcija, uočavamo da je kod nekih uzoraka koncentracija polifenola u pojedinim frakcijama bila najveća, a u nekima najmanja.

Primjerice, analizom nedigestirane (Z) frakcije najmanje vrijednosti zbroja koncentracija hidroksitirosola i tirosola ( $\sum(\text{HTS};\text{TS})$ ) bile su zabilježene kod nativnog uzorka (NE) i uzorka B8, a najveće kod uzorka G16, dok su analizom gastrične frakcije (G) najmanje razine HTS-a i TS-a bile prisutne u uzorku HPB16, a najveće također u uzorku G16.

Nasuprot tome, analizom OUT frakcije, najmanje vrijednosti  $\sum(\text{HTS};\text{TS})$  su zabilježene u uzorku G8, a najveće u uzorku \*R16.

U  $dP_{\text{OUT}}$  i  $dP_{\text{TOT}}$  frakcijama su pak najmanje vrijednosti  $\sum(\text{HTS};\text{TS})$  bile prisutne u uzorku HPB8, a najveće u HPB16.

I konačno, analizom \*ndP frakcije i biološki dostupnih PP-a ustanovljeno je da se najmanje vrijednosti  $\sum(\text{HTS};\text{TS})$  nalaze u uzorku G8, a najveće u uzorku HPB8.

Iz rezultata prikazanih u Tablici 5. usporedbom vrijednosti Z i G frakcije, opaža se da je kod svih uzoraka došlo do smanjenja sumarne koncentracije hidroksitirosola i tirosola ( $\sum(\text{HTS};\text{TS})$ ), osim kod uzorka G16. Štoviše, kod uzorka G16 došlo je čak do povećanja koncentracije spomenutih polifenola. Ta činjenica se može objasniti time da gastrični uvjeti



pogoduju otpuštanju HTS-a i TS-a iz kompleksa ekstrakta komine masline s ciklodekstrinom, te da korištenje gama ciklodekstrina u koncentraciji 16 mg/mL, rezultira s najvećom gastričnom stabilnošću ekstrakta komine masline.

Nasuprot tome, usporedbom vrijednosti gastrične (G) frakcije i intestinalne (OUT) frakcije, vidljivo je povećanje koncentracije polifenola u gotovo svim uzorcima: B8, R8, \*R16, HPB8 i HPB16. Do smanjenja koncentracije polifenola došlo je samo u uzorcima NE, G8 i G16. Ovakav trend povećanja sumarne koncentracije hidroksitirosola i tirosola, može se objasniti time da uvjeti u intestinalnoj fazi pogoduju otpuštanju polifenola iz ispitivanih uzoraka više nego uvjeti u gastričnoj fazi. Drugo objašnjenje bi moglo biti da do povećanja sumarne koncentracije hidroksitirosola i tirosola tijekom intestinalne faze dolazi zbog razgradnje oleuropeina u svoj produkt hidroksitirozol, zbog čega se koncentracija HTS-a tijekom GI digestije povećava.

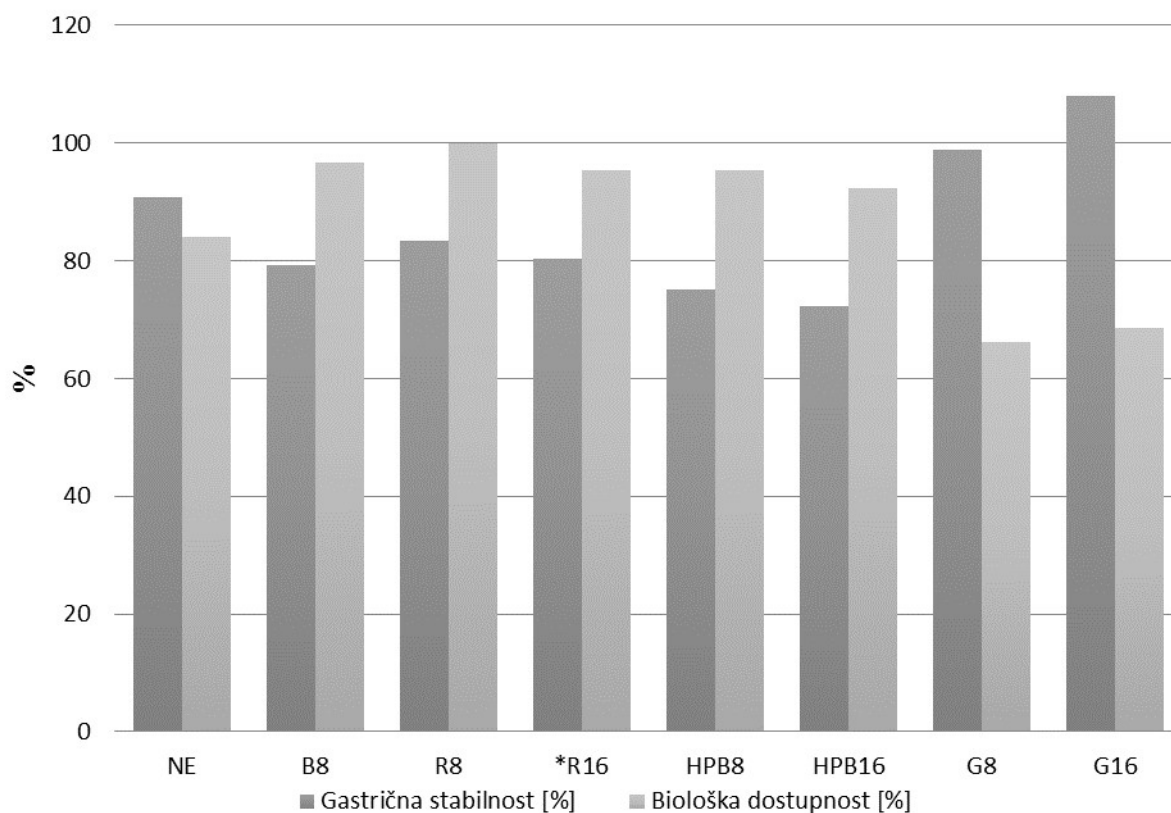
Usporedbom vrijednosti nedigestirane (Z) frakcije i intestinalne (OUT) frakcije prikazanima u Tablici 5., može se uočiti da je nakon prolaska kroz gastričnu i intestinalnu fazu GI digestije, došlo do smanjenja koncentracije hidroksitirosola i tirosola, i to u svim uzorcima. Sadržaj polifenola u uzorcima se nakon prolaska kroz gastričnu i intestinalnu fazu smanjio za 10-40%, s tim da je najmanje smanjenje koncentracije bilo prisutno kod uzorka R16, a najveće kod uzorka G8. Iz toga se može zaključiti da je najveća stabilnost ekstrakta komine masline postignuta kompleksacijom s nasumično metiliranim ciklodekstrinom u koncentraciji 16 mg/mL, a najmanja stabilnost ekstrakta komine masline korištenjem gama ciklodekstrina u koncentraciji 8 mg/mL.

Slični trendovi se opažaju i kod drugih autora. Primjerice, McDonald i sur. (2014) su u biljnoj vrsti *Vaccinium angustifolium*, nakon *in vitro* GI digestije uočili smanjenje sadržaja polifenola za 49%, u usporedbi sa sadržajem polifenola u nedigestiranim uzorcima. Također, u biljnim vrstama *Ribes magellanicum* i *R. Punctatum* sadržaj polifenola se, nakon prolaska kroz sve faze *in vitro* GI digestije, smanjio za 50% (Burgos-Edwards i sur., 2017). No, uočavamo da su, unatoč prethodno spomenutoj visokoj gastrointestinalnoj stabilnosti, kod uzorka R16, točnije u njegovim frakcijama  $dP_{OUT}$ ,  $dP_{TOT}$  i  $ndP$ , vrijednosti  $\sum(HTS;TS)$  bile ispod praga detekcije korištene HPLC metode.

Ta činjenica se može objasniti time da je kompleksiranje ekstrakata komine masline s R16 ciklodekstrinom učinilo kompleksirane molekule polifenola prevelikima da bi one mogle proći kroz pore membrane za dijalizu. Stoga, molekule polifenola nisu mogle biti dijalizibilne i sukladno tome, vrijednosti dijalizibilne frakcije su bile premale da bi se detektirale.

Usporedbom vrijednosti Z frakcije i biološki dostupnih polifenola, također se uočava trend smanjenja koncentracije polifenola u svim uzorcima, osim kod uzorka R8, gdje su vrijednosti  $\Sigma(\text{HTS};\text{TS})$  ostale nepromijenjene ( $\Sigma(\text{HTS};\text{TS})=1,29$ ; Tablica 5). Iz toga se može zaključiti da jedino kompleksacija ekstrakta komine masline s nasumično metiliranim ciklodekstrinom u koncentraciji 8 mg/mL, rezultirala veličinom kompleksiranih molekula HTS-a i TS-a koja nije veća od veličine pora membrane za dijalizu, zbog čega u tom slučaju nije došlo do smanjenja koncentracije dijalizibilne frakcije.

#### 4.1. Utjecaj in vitro GI digestije na gastričnu stabilnost, biološku dostupnost i dijalizibilnost uzoraka u smislu sumarne koncentracije hidroksitirosola i tirosoła ( $\Sigma$ (HTS;TS) [mg/g])



Slika 3. Gastrična stabilnost i biološka dostupnost derivata hidroksitirosola ( $\Sigma$ (HTS;TS)).

**Gastrična stabilnost** je bila 91% za nativni uzorak, 79% za uzorak B8, 83% za uzorak R8, 80% za uzorak \*R16, 75% za uzorak HPB8, 72% za uzorak HPB16, 99% za uzorak G8 i 108% za uzorak G16.

Prema dobivenim rezultatima prikazanim na Slici 3., vidljivo je da je najveća gastrična stabilnost (108%) ekstrakta komine masline postignuta dodatkom gama ciklodekstrina u koncentraciji 16 mg/mL, a najmanja (72%) dodatkom hidroksipropil beta ciklodekstrina u koncentraciji 16 mg/mL.

Iz ovih rezultata se može zaključiti da je gastrična stabilnost relativno visoka kod svih uzoraka i da na njezinu vrijednost ne utječe značajno izbor vrste i koncentracije ciklodekstrina.

Slični rezultati dobiveni su u radu autora Bouayed i sur. (2012), gdje je najveća gastrična stabilnost polifenola u pojedinim sortama jabuka bila  $109.47 \pm 8.11\%$ , a najmanja  $83.93 \pm 11.90\%$ .

### **Biološka dostupnost**

Prema rezultatima prikazanim na Slici 3., može se uočiti da svi uzorci pokazuju relativno visoku biološku dostupnost (od 66 do 101%).

Primjerice, biološka dostupnost je bila 84% za nativni uzorak (NE), 97% za uzorak B8, 101% za uzorak R8, 95% za uzorak \*R16, 95% za uzorak HPB8, 92% za uzorak HPB16, 66% za uzorak G8 i 69% za uzorak G16.

Slični rezultati s visokom biološkom dostupnosti dobiveni su u radu drugih autora.

Primjerice, u radu autorice Rubio i sur. (2014), hidroksitirozol je imao biološku dostupnost preko 100%, točnije 132.3% u ekstraktu maslinovog ulja i 167.6% u smjesi ekstrakata maslinovog ulja i timijana. Udio veći od sto posto je objašnjen time što se hidroksitirozol otpušta tijekom digestije njegovih prekursora, odnosno oleuropeina.

Također, biološka dostupnost polifenola u medu dobivenom od biljke *Mimosa scabrella*, bila je naročito visoka, u rasponu 78.2 - 174.38% te 94.0 - 220.5% (Tischer-Seraglio i sur., 2017). Nasuprot tome, mnogo manja biološka dostupnost polifenola zabilježena je u plodu manga (*Mangifera indica* L.), od čega je 38.67% bila biološka dostupnost polifenola u pulpi, a 40.53% u kori manga (Blancas-Benitez i sur., 2015).

Na temelju dobivenih vrijednosti prikazanih na Slici 3., proizlazi da najveću biološku dostupnost (101%) ima ekstrakt komine masline kojem je dodan nasumično metilirani beta ciklodekstrin (R ili RAMEB) u koncentraciji 8 mg/mL.

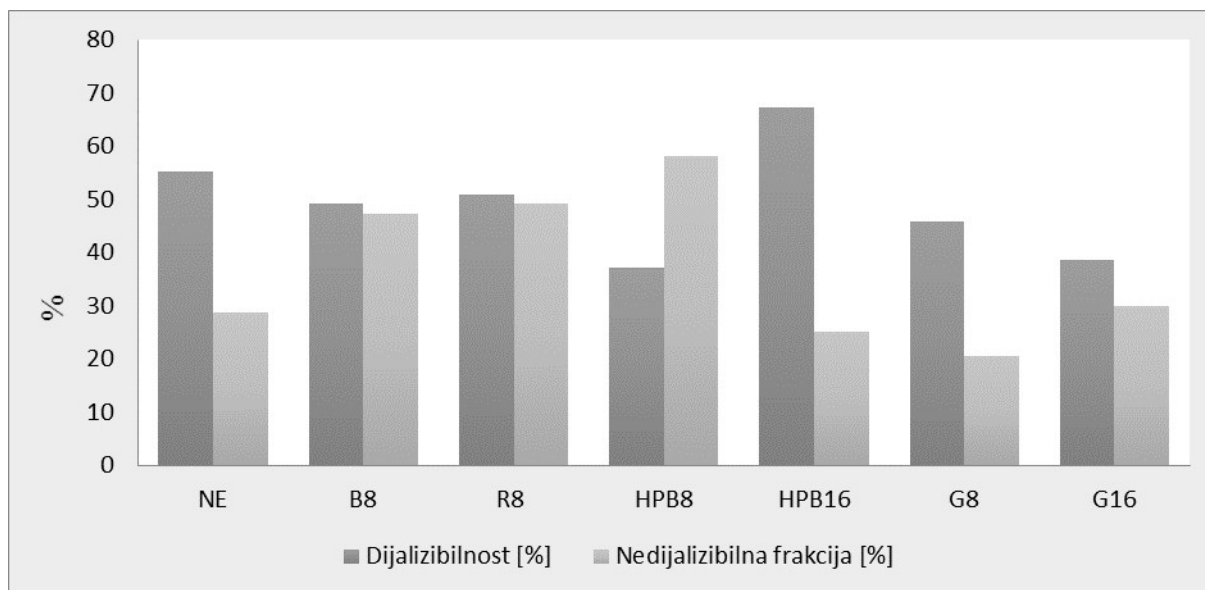
Nasuprot tome, najmanja biološka dostupnost (66%) zabilježena je kod ekstrakta komine masline kompleksiranog s gama ciklodekstrinom u koncentraciji 8 mg/mL.

Iz ovoga se može zaključiti da promjena vrste ciklodekstrina može više utjecati na stupanj biološke dostupnosti ekstrakta komine masline nego promjena koncentracije ciklodekstrina (varijabilnost u vrijednostima biološke dostupnosti pri promjeni koncentracije ciklodekstrina je bila 3-5 posto, dok se promjenom vrste ciklodekstrina, vrijednost biološke dostupnosti promijenila čak za 35 posto (101% za R (8mg/mL), a 66% za G (8 mg/mL)).

Korištenjem ciklodekstrina postiže se veća stabilnost biološki aktivnih tvari u ekstraktima. Tako su primjerice Mourtzinis i suradnici (2008) povećali stabilnost antocijana, u ekstraktu biljke *Hibiscus sabdariffa* L, uz pomoć beta ciklodekstrina. Također, beta-ciklodekstrin se pokazao kao najbolji izbor za enkapsulaciju kurkumina čime se je postignulo značajno povećanje stabilnosti kurkumina pri različitom rasponu temperature i pH vrijednosti (Mangolim i sur., 2014). Također, hidroksipropil beta ciklodekstrin je povećao stabilnost (+)-katehina i (-)-epikatehina pri različitim vrijednostima pH i temperature ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Osim povećanja stabilnosti, stvaranje inkluzijskog kompleksa s ciklodekstrinima rezultiralo je povećanjem topljivosti u vodi i antioksidativnog kapaciteta polifenola. U literaturi postoje brojni primjeri u kojima su postignuti takvi rezultati, primjerice kod kompleksacije resveratrola i rutina s beta ciklodekstrinom te kod enkapsulacije kemferola, hesperetina, kvercetina i miricetina s hidroksipropil beta ciklodekstrinom ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

U ovom istraživanju, najveće vrijednosti gastične stabilnosti su dobivene korištenjem gama ciklodekstrina, a najveće vrijednosti biološke dostupnosti su uočene kod primjene beta ciklodekstrina i nasumično metiliranog ciklodekstrina, oba u koncentraciji 8 mg/mL. Nasuprot tome, najveća dijalizibilnost je dobivena korištenjem hidroksipropil beta ciklodekstrina u koncentraciji 16 mg/mL. U prilog tome ide i studija autora Garcia-Padial i sur. (2013), koji su dokazali da nasumično metilirani beta ciklodekstrin i hidroksipropil beta ciklodekstrin stvaraju inkluzijske komplekse s tirozolom.



Slika 4. Dijalizibilnost uzoraka i udio nedijalizibilne frakcije u uzorcima u smislu sumarne koncentracije hidroksitirosola i tirosole,  $\sum(\text{HTS};\text{TS})$ .

**Dijalizibilnost** uzoraka je bila 55% za nativni uzorak, 49% za uzorak B8, 51% za uzorak R8, 37% za uzorak HPB8, 67% za uzorak HPB16, 46% za uzorak G8 i 39% za uzorak G16, što je prikazano na Slici 4..

Za uzorak \*R (16 mg/mL) dijalizibilnost nije mogla biti definirana jer su koncentracije dijalizibilne frakcije bile ispod granice detekcije korištene HPLC metode.

Nasuprot tome, polifenoli u različitim sortama jabuka, proučavani u radu autora Bouayed i sur. (2012) su imali značajno manju dijalizibilnost. Primjerice, najveća dijalizibilnost polifenola u pojedinim sortama jabukama je bila  $20.74 \pm 5.34\%$ , dok je najmanja bila samo  $0.52 \pm 0.05\%$ .

Na temelju dobivenih vrijednosti može se zaključiti da najveću dijalizibilnost (67%) ima uzorak koji sadrži ekstrakt komine masline enkapsuliran s hidroksipropil beta ciklodekstrinom u koncentraciji 16 mg/mL, a najmanju (37% i 39%) kada su korišteni hidroksipropil beta ciklodekstrin u koncentraciji 8 mg/mL i gama ciklodekstrin u konc. 16 mg/mL..

Unatoč dobivenim rezultatima, ne može se s potpunom sigurnošću tvrditi s kojim cikodekstrinom se postiže najveća dijalizibilnost ekstrakta komine masline, zbog toga što je dijalizibilnost ovisila također i o brzini difuzije te o veličini pora membrane za dijalizu.

No, budući da korištenjem nasumično metiliranog beta ciklodekstrina u koncentraciji 16 mg/mL dijalizibilnost nije mogla biti definirana, dok je u koncentraciji 8 mg/mL bila 51%, možemo zaključiti da je kod te vrste ciklodekstrina bolji izbor konc. 8 mg/mL.

**Udio nedijalizibilne frakcije** u pojedinim uzorcima je dobivena oduzimanjem biološke dostupnosti i dijalizibilnosti za ispitivani uzorak.

Rezultati za udio nedijalizibilne frakcije, prikazani na Slici 4. su sljedeći: 29% za nativni uzorak, 47% za uzorak B8, 49% za uzorak R8, 58% za uzorak HPB8, 25% za uzorak HPB16, 20% za uzorak G8 i 30% za uzorak G16.

Za uzorak R (16 mg/mL) udio nedijalizibilne frakcije nije mogao biti definiran.

Iz prethodno navedenih vrijednosti proizlazi da najveći udio nedijalizibilne frakcije ima ekstrakt komine masline enkapsuliran s hidroksipropil beta ciklodekstrinom konc. 8 mg/mL, a najmanji kada je za enkapsulaciju korišten gama ciklodekstrin u konc. 8 mg/mL.

Unatoč tome što nedijalizibilni polifenoli ne završavaju u sistemskej cirkulaciji, već u debelom crijevu, oni bi mogli postati bioraspoloživi nakon razgradnje ciklodekstrina bakterijskim enzimima prisutnim u debelom crijevu i time također doprinijeti antioksidativnim i ostalim zdravstvenim učincima polifenola.

Sumarno gledano (s obzirom na sve dobivene rezultate), za postizanje optimalnih vrijednosti gastične stabilnosti, biološke dostupnosti i dijalizibilnosti ekstrakta komine masline, najbolji izbor za njegovu enkapsulaciju bi bili nasumično metilirani beta ciklodekstrin u konc. 8 mg/mL (R (8 mg/mL)) i hidroksipropil beta ciklodekstrin u koncentraciji 16 mg/mL (HPB (16 mg/mL)).

Za potvrdu rezultata da se s R (8 mg/mL) i HPB (16 mg/mL) postiže najveća dijalizibilnost uzoraka, potrebne su dodatne studije koje će ispitati utjecaj brzine difuzije i veličine pora membrane za dijalizu na vrijednosti dijalizibilnosti.

## 5.ZAKLJUČCI

- Ovo istraživanje je prvi pokušaj ispitivanja gastrointestinalne (GI) stabilnosti, biološke dostupnosti i dijalizibilnosti polifenola komine masline.
- Oleuropein se, za razliku od hidroksitirosola i tirosole, nije mogao kvantificirati HPLC-FLD metodom u niti jednom uzorku.
- Svi uzorci pokazuju relativno visoku gastričnu stabilnost (od 72 do 108%) i biološku dostupnost (od 66 do 101%).
- Najveća dijalizibilnost je dobivena kada je kao ekscipijens polifenola komine masline korišten hidroksipropil –beta-ciklodekstrin u koncentraciji 16 mg/mL, a najmanja kada su korišteni hidroksipropil beta-ciklodekstrin u konc. 8 mg/mL i gama ciklodekstrin u konc. 16 mg/mL.
- Može se očekivati da bi nedijalizibilna frakcija mogla postati bioraspoloživa nakon razgradnje ciklodekstrina bakterijskim enzimima crijevne mikroflore.



## 6.LITERATURA

- Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases, 2014, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4237885/>, pristupljeno 4.3.2018.
- Blancas-Benitez FJ, Mercado-Mercado G, Quirós-Sauceda AE, Montalvo-González E, González-Aguilar GA, Sáyago-Ayerdi SG. Bioaccessibility of polyphenols associated with dietary fiber and in vitro kinetics release of polyphenols in Mexican 'Ataulfo' mango (*Mangifera indica* L.) by-products, *Food and function*, 2015, 859-868.
- Bouayed J, Deußer H, Hoffmann L, Bohn T. Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns, *Food Chemistry*, 2012, 1466-1472.
- Burgos-Edwards A, Jiménez-Aspee F, Thomas-Valdés S, Schmeda-Hirschmann G, Theoduloz C. Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after *in vitro* gastrointestinal digestion, *Food Chemistry*, 2017, 237, 1073-1082.
- Campos-Vega R, Vázquez-Sánchez K, López-Barrera D, Loarca-Piña G, Mendoza-Díaz S, & Dave Oomah B. Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability, *Food Research International*, 2015, 156-161.
- Correa-Betanzo J, Allen-Vercoe E, McDonald J, Schroeter K, Corredig M, Paliyath G. Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion, *Food Chemistry*, 2014, 165, 522-531.
- Cumaoglu A, Rackova L, Stefek M, Kartal M, Maechler P, Karasu C. Effects of olive leaf polyphenols against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity in insulin secreting beta-cells. *Acta Biochim. Pol.* ,2011, 45–50.

- Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds: a Review, 2011, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3857059/>, pristupljeno 10.5.2018.
- Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Montedoro G, Morozzi G. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2002, 351.
- García-Padial M, Martínez-Ohárriz MC, Isasi JR, Ve'laz I, Zornoza A. Complexation of tyrosol with cyclodextrins. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2013, 75, 241-245.
- Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa C, Camacho-Corencia P, Sanchez-Rovira P, Vera-Ramirez L, Ramirez-Tortosa M. Hydroxytyrosol inhibits growth and cell proliferation and promotes high expression of sfrp4 in rat mammary tumours. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, 117–126.
- Improved stability of (+)-catechin and (-)-epicatechin by complexing with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: effect of pH, temperature and configuration, 2016, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26593476/>, pristupljeno 11.5.2018.
- Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 8798–8804.
- Lee-Huang S, Huang PL, Zhang D, Lee JW, Bao J, Sun Y, Chang Y-T, Zhang J, Huang PL. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: part II. Integrase inhibition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 879–884.
- Liang L, Wu X, Zhao T, Zhao J, Li F, Zou Y, Mao G, Yang L. In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion, *Food Research International*, 2012, 76-82.

- Mangolim SC, Moriwaki C, Nogueira AC, Sato F, Baesso ML, Medina Neto A, Matioli G. Curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chemistry*, 2014, 153, 361-370.
- Mourtzinou I, Makris DP, Yannakopoulou K, Kalogeropoulos N, Michali I, Karathanos VT. Thermal Stability of Anthocyanin Extract of *Hubiscus sabdariffa* L. in the Presence of  $\beta$ -Cyclodextrin. *J Agric Food Chem*, 2008, 56, 10303-10310.
- Obied HK, Prenzler PD, Syed OH, Ismael R, Servili M, Esposto S, Taticchi A, Selvaggini R, Urbani S. Pharmacology of olive biophenols. U: Advances of molecular toxicology. Fishbein JC, Heilman JM, Urednici, Elsevier, Amsterdam, Oxford, 2012, str.202-216.
- Rigacci S, Stefani M. Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. *Int J Mol Sci.*, 2016, 843.
- Rubió L, Maciá A, Castell-Auví A, Pinent M, Blay MT, Ardévol A, Romero MP, Motilva MJ. Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by in vitro digestion and cell models, *Food Chemistry*, 2014, 149, 277–284.
- Seraglio Tischer SK, Vales Camargo A, Daguer H, Bergamo G, Azevedo Stremel M, Nehring P, Gonzaga Valdemiro L, Fett R, Costa Oliviera AC. Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Benth honeydew honeys, *Food Research International*, 2017, 99, 670-678.
- Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Casaburi I, Rizza, Onofrio A, Iacopetta D, Puoci F, Ando` S, Maggiolini M, Pezzi V. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2010, 833–840.

- Terzuoli E, Donnini S, Giachetti A, Iniguez MA, Fresno M, Melillo G, Ziche M. Inhibition of hypoxia inducible factor-1-alpha by dihydroxyphenylethanol, a product from olive oil, blocks microsomal prostaglandin-E synthase-1/vascular endothelial growth factor expression and reduces tumor angiogenesis. *Clin. Cancer Res.*, 2010, 4207–4216.
- Yamada K, Ogawa H, Hara A, Yoshida Y, Yonezawa Y, Karibe K, Nghia VB, Yoshimura H, Yamamoto Y, Yamada M, Nakamura K, Imai K. Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus, *Antiviral Res.*, 2009, 35–44.

## 7.SAŽETAK

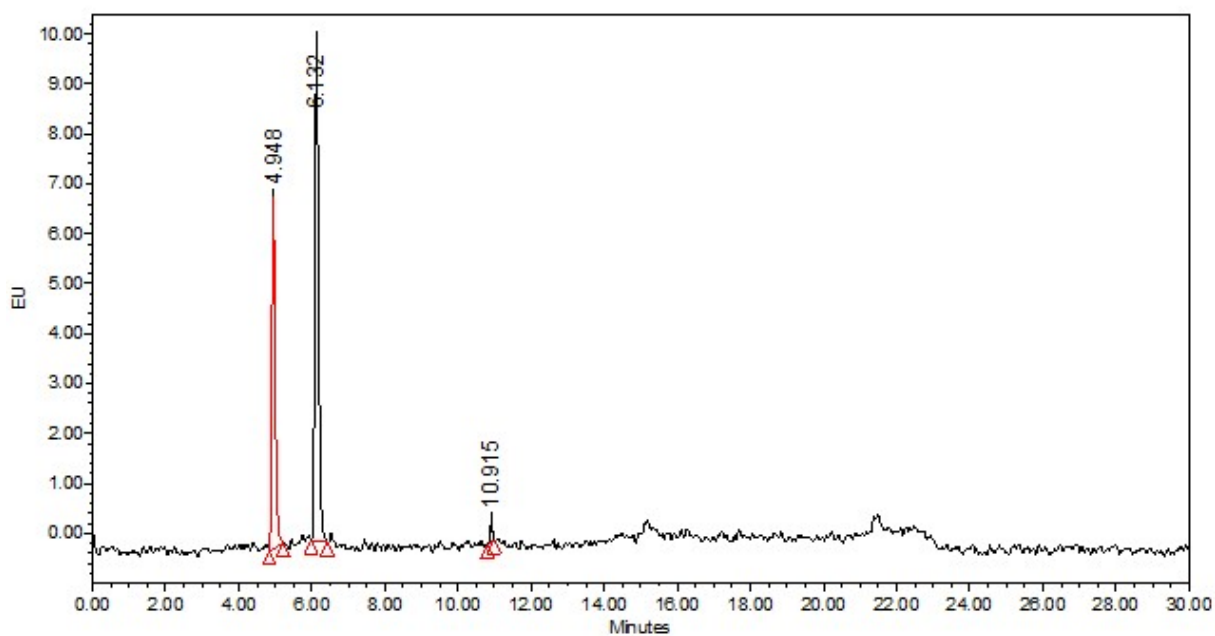
Ekstrakt komine masline sadrži različite biološki aktivne polifenole s brojnim blagotvornim učincima na zdravlje. No, da bi uopće mogli postići zdravstvene učinke, bioaktivni spojevi moraju biti bioraspoloživi, a bioraspoloživost ovisi o biološkoj dostupnosti (oslobađanju iz matriksa hrane tijekom gastrointestinalne digestije) te o dijalizibilnosti (apsorpciji u crijevima). Ciljevi ovog rada bili su odrediti in vitro gastrointestinalnu stabilnost, biološku dostupnost te dijalizibilnost polifenola određivanjem koncentracije hidroksitirosola i tirosola pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s fluorescencijskim detektorom. Uzorci su bili ekstrakt komine masline bez ekscipijensa (nativni ekstrakt) i ekstrakti komine masline sa sljedećim ekscipijensima: beta ciklodekstrinom (B), nasumično metiliranim beta CD-om, (G), hidroksipropil beta CD-om (HPB) i gama CD-om (G). Zaključeno je da svi uzorci pokazuju relativno visoku gastričnu stabilnost (od 72 do 108%) i biološku dostupnost (od 66 do 101%) fenolne frakcije. Najveća dijalizibilnost u smislu sadržaja hidroksitirosola i tirosola je postignuta kada je kao ekscipijens u pripremi ekstrakata korišten hidroksipropil –beta-ciklodekstrin u koncentraciji 16 mg/mL.

## SUMMARY

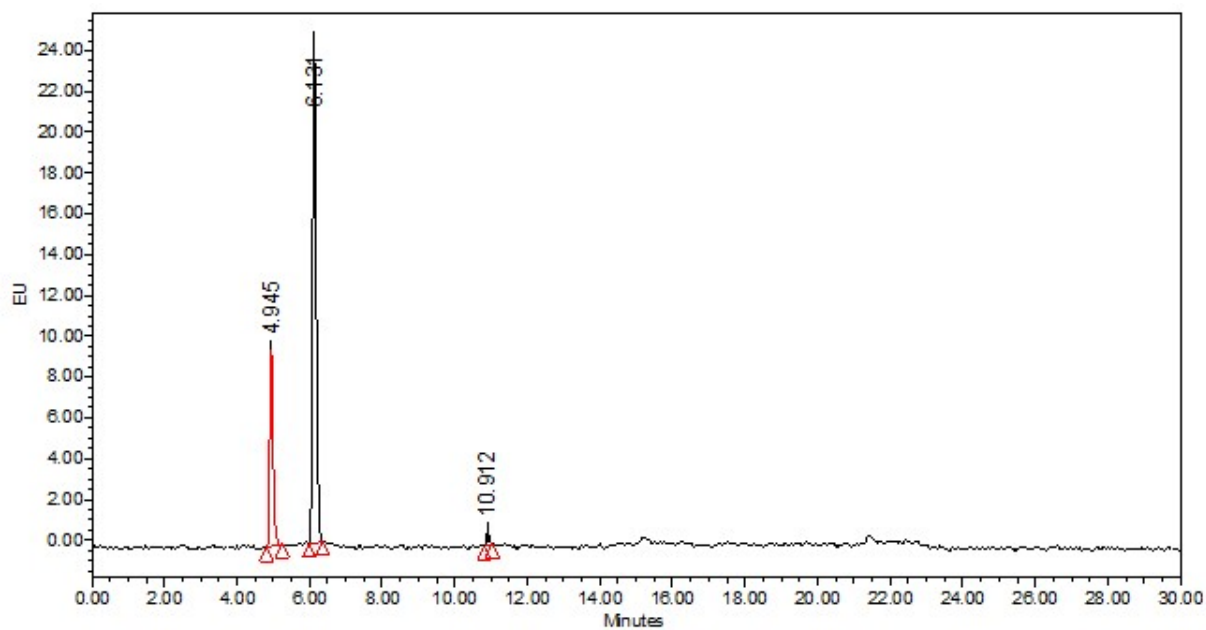
Olive pomace extracts (OPE) contain various biologically active polyphenols (PPs) with numerous health benefits. However, to exert any beneficial effects, bioactive compounds should be bioavailable, and their bioavailability depends on their release from the matrix during the gastro-intestinal (GI) digestion (bioaccessibility) and later intestinal absorption (dialisability). The aims of this research were to determine in vitro GI stability, bioaccessibility and dialysability of PPs in terms of concentration of hydroxytyrosol (HTS) and tyrosol (TS) which were obtained by HPLC-FLD method. Samples were OPE prepared without excipient (native extract, NE), and with following excipients: beta-CD (B), randomly methylated beta-CD (RAMEB), hydroxypropyl beta-CD (HPB), and gamma-CD (G). The in vitro GI digestion consisted of two sequential steps; an initial pepsin/HCl digestion to simulate gastric conditions, followed by a digestion with bile salts/pancreatin and dialysis tubing, to simulate duodenal digestion and absorption by passive diffusion. It is concluded that all samples have relatively high gastric stability (72-108%) and bioaccessibility (66-101%). The highest dialysability (%) in terms of HTS and TS content was obtained for HPB (16 mg/mL) sample.

## 8.PRILOZI

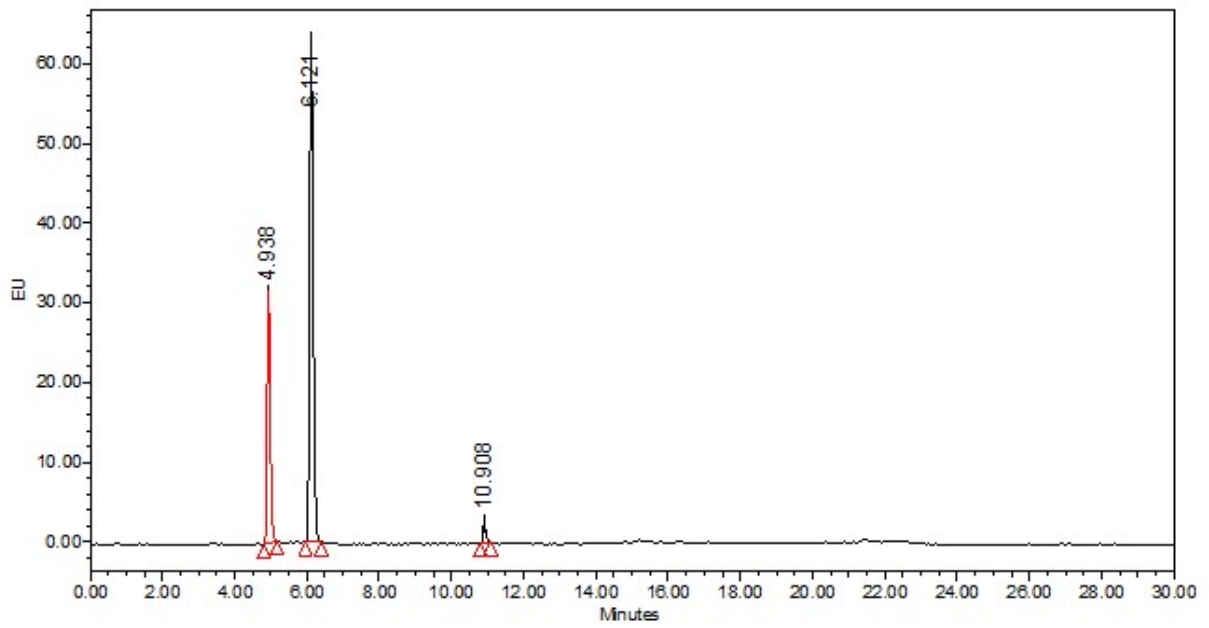
### 8.1.Kromatogrami standarda hidroksitirosola, tirosoila i oleuropeina



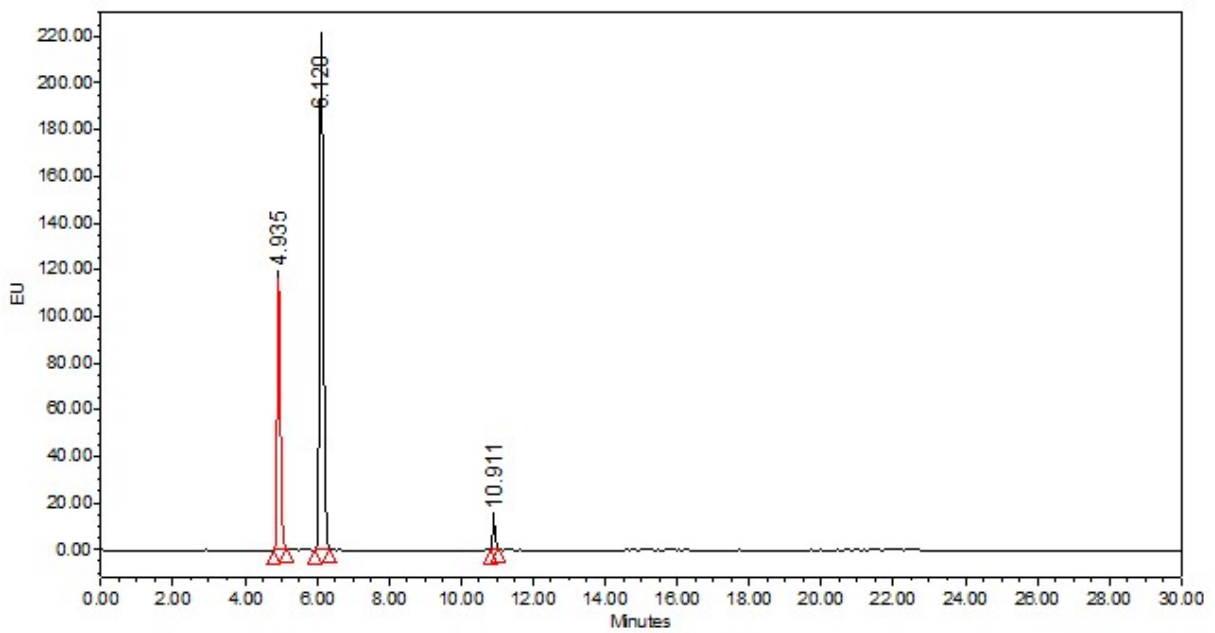
Slika 1. Smjesa (HTS+TS+OLE) 3 ppm



Slika 2. Smjesa (HTS+TS+OLE) 9 ppm



Slika 3. Smjesa (HTS+TS+OLE) 27 ppm



Slika 4. Smjesa (HTS+TS+OLE) 81 ppm



# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Studij: Farmacija

Zavod za kemiju prehrane

Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

## In vitro bioraspoloživost polifenola komine masline

Marija Srbić

### SAŽETAK

Ekstrakt komine masline sadrži različite biološki aktivne polifenole s brojnim blagotvornim učincima na zdravlje. No, da bi mogli postići ikakve zdravstvene učinke, bioaktivni spojevi moraju biti bioraspoloživi, a bioraspoloživost ovisi o biološkoj dostupnosti (oslobađanju iz matriksa hrane tijekom gastrointestinalne digestije) te o dijalizibilnosti (apsorpciji u crijevima). Ciljevi ovog rada bili su odrediti in vitro gastrointestinalnu stabilnost, biološku dostupnost te dijalizibilnost polifenola određivanjem koncentracije hidroksitirosola i tirosola pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s fluorescencijskim detektorom. Uzorci su bili ekstrakt komine masline bez ekscipijensa (nativni ekstrakt) i ekstrakti komine masline sa sljedećim ekscipijensima: beta ciklodekstrinom (B), nasumično metiliranim beta CD-om, (G), hidroksipropil beta CD-om (HPB) i gama CD-om (G). Zaključeno je da svi uzorci pokazuju relativno visoku gastričnu stabilnost (od 72 do 108%) i biološku dostupnost (od 66 do 101%) fenolne frakcije. Najveća dijalizibilnost u smislu sadržaja hidroksitirosola i tirosola je postignuta kada je kao ekscipijens u pripremi ekstrakata korišten hidroksipropil –beta-ciklodekstrin u koncentraciji 16 mg/mL.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 4 grafičkih prikaza, 6 tablica i 24 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Ekstrakt komine masline, ciklodekstrini, polifenoli, hidroksitirosol, tirosol, oleuropein, gastrična stabilnost, biološka dostupnost, dijalizibilnost, in vitro gastrointestinalna digestija, HPLC

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo** *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo** *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ime i Prezime**, *viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ime i Prezime**, *viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2018

Basic documentation card

## **In vitro bioavailability of olive pomace polyphenols**

**Marija Srbić**

### **SUMMARY**

Olive pomace extracts (OPE) contain various biologically active polyphenols (PPs) with numerous health benefits. However, to exert any beneficial effects, bioactive compounds should be bioavailable, and their bioavailability depends on their release from the matrix during the gastro-intestinal (GI) digestion (bioaccessibility) and later intestinal absorption (dialysability). The aims of this research were to determine in vitro GI stability, bioaccessibility and dialysability of PPs in terms of concentration of hydroxytyrosol (HTS) and tyrosol (TS) which were obtained by HPLC-FLD method. Samples were OPE prepared without excipient (native extract, NE), and with following excipients: beta-CD (B), randomly methylated beta-CD (RAMEB), hydroxypropyl beta-CD (HPB), and gamma-CD (G). The in vitro GI digestion consisted of two sequential steps; an initial pepsin/HCl digestion to simulate gastric conditions, followed by a digestion with bile salts/pancreatin and dialysis tubing, to simulate duodenal digestion and absorption by passive diffusion. It is concluded that all samples have relatively high gastric stability (72-108%) and bioaccessibility (66-101%). The highest dialysability (%) in terms of HTS and TS content was obtained for HPB (16 mg/mL) sample.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 4 figures, 6 tables and 24 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Olive pomace extract, cyclodextrins, polyphenols, hydroxytyrosol, tyrosol, oleuropein, gastric stability, bioaccessibility, dialysability, *in vitro* gastrointestinal digestion, HPLC

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** /Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Reviewers: **Ime i Prezime, Ph.D.** /Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Ime i Prezime, Ph.D.** /Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Ime i Prezime, Ph.D.** /Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2018



