Antiproliferativna aktivnost mikrovalnih ekstrakata sjemenki crne (Brassica nigra L.) i smeđe (Brassica juncea L.) gorušice

Divić, Josipa

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:906033

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST MIKROVALNIH EKSTRAKATA SJEMENKI CRNE (*Brassica nigra* L.) I SMEĐE (*Brassica juncea* L.) GORUŠICE

ZAVRŠNI RAD

JOSIPA DIVIĆ

Matični broj: 24

Split, listopad 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST MIKROVALNIH EKSTRAKATA SJEMENKI CRNE (*Brassica nigra* L.) I SMEĐE (*Brassica juncea* L.) GORUŠICE

ZAVRŠNI RAD

JOSIPA DIVIĆ

Matični broj: 24

Split, listopad 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY

FOOD TECHNOLOGY

ANTIPROLIFERATIV ACTIVITY OF BLACK (*Brassica nigra* L.) AND BROWN (*Brassica juncea* L.) MICROWAVE MUSTARD SEEDS EXTRACTS

BACHELOR THESIS

JOSIPA DIVIĆ

Parent number: 24

Split, October 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Preddiplomski studij prehrambene tehnologije

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: mag. ing. chemig. Ivana Vrca

ANTIPROLIFERATIVNA AKTIVNOST MIKROVALNIH EKSTRAKATA SJEMENKI CRNE (*Brassica nigra* L.) I SMEĐE (*Brassica juncea* L.) GORUŠICE

Josipa Divić, 24

Sažetak: Osim što je nužna za život, hrana uvelike utječe na sve aspekte čovjekova života, najviše na zdravlje. Pravilna prehrana ispunjena raznolikom i zdravom hranom posebno biljnim vrstama bogatim fitokemikalijama, osigurava veliku otpornost organizma na različita oboljenja pa tako i na karcinom. Suočen s velikim porastom kroničnih bolesti čovjek sve češće odabire zdravu prehranu i prirodne lijekove s ciljem prevencije različitih oboljenja. U ovom radu istražit će se antiproliferativna aktivnost mikrovalnih ekstrakata crne i smeđe gorušice na stanice karcinoma dojke (MDA MB 231) i mokraćnog mjehura (TCC SUP). Ekstrakti dobiveni metodom mikrovalne ekstrakcije su analizirani plinskom kromatografijom-masenom spektormetrijom (GC-MS) da bi se identificirao dominantan spoj. Potom je MTT testom vršeno mjerenje njihove citotoksične aktivnosti te su dobiveni rezultati aktivnosti s obzirom na razliku u koncentraciji i na period inkubacije ekstrakata.

Ključne riječi: hrana, mikrovalna ekstrakcija, MTT test, antiproliferativna aktivnost

Rad sadrži: 35 stranice, 23 slike, 7 tablica, 23 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić — predsjednik
2. Doc. dr. sc. Danijela Skroza — član
3. Prof. dr. sc. Tea Bilušić — član-mentor

Datum obrane:2.10.2019.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study Food Technology

Scientific area: Biotehnical sciences
Scientific field: Food Technology
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19
Mentor: Prof. dr. sc. Tea Bilušić
Tehnical assistance: mag.ing.cheming Ivana Vrca

ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF BLACK (*Brassica nigra* L.) AND BROWN (*Brassica juncea* L.) MICROWAVE MUSTARD SEEDS EXTRACTS

Josipa Divić, 24

Abstract: Besides being essential for life, food greatly affects all the aspects of human life, mostly to health. Proper nutrition based on healthy food especially with plant species that contain phytochemicals, provides high resistance of the body to various diseases, including cancer. Faced with a huge increase in chronic diseases, man is increasingly choosing healthy nutrition and natural medicines in the prevention of various diseases. This study examines antiproliferative activity of black and brown micowave mustard seeds extracts on breast (MDA MB 231) and bladder (TCC SUP) cancer cells. Extracts obtained by the microwave extraction method are analyzed by gas chromatography-mass spectometry (GC-MS) to identify the dominant compound. Then MTT test measured their cytotoxic activity and so the results were obtained considering the difference in concentration and in incubation period.

Keywords: food, microwave extraction, MTT test, antiproliferative activity

Thesis contains: 35 pages, 23 figures, 7 tables, 23 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić — chair person
2. Doc. dr. sc. Danijela Skroza — member
3. Prof. dr. sc. Tea Bilušić — supervisor

Defence date:2.10.2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed 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 i na Medicinskom fakultetu u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Tee Bilušić u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine.

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Tei Bilušić na vodstvu i ukazanoj pomoći pri izradi ovog rada. Također se uvelike zahvaljujem mag. ing. cheming. Ivani Vrci na posvećenom vremenu i velikodušnoj pomoći.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci tijekom školovanja.

Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima koji su mi oduvijek bili ogromna motivacija i uzor.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Izolirati hlapljive spojeve prisutne u sjemenu crne (*Brassica nigra* L.) i smeđe (*Brassica juncea* L.) gorušice metodom mikrovalne ekstrakcije.
2. Pripremiti uzorke te izvršiti identifikaciju hlapljivih spojeva uporabom vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS).
3. Odrediti antiproliferativnu aktivnost tih ekstrakata na stanične linije karcinoma dojke i mjehura korištenjem MTT testa.

SAŽETAK

Osim što je nužna za život, hrana uvelike utječe na sve aspekte čovjekova života, najviše na zdravlje. Pravilna prehrana ispunjena raznolikom i zdravom hranom posebno biljnim vrstama bogatim fitokemikalijama, osigurava veliku otpornost organizma na različita oboljenja pa tako i na karcinom. Suočen s velikim porastom kroničnih bolesti čovjek sve više odabire zdravu prehranu i prirodne lijekove s ciljem prevencije različitih oboljenja. U ovom radu istražit će se antiproliferativna aktivnost mikrovalnih ekstrakata crne i smeđe gorušice na stanice karcinoma dojke (MDA MB 231) i mokraćnog mjehura (TCC SUP). Ekstrakti dobiveni metodom mikrovalne ekstrakcije su analizirani plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS) da bi se identificirali hlapljivi spojevi. Potom je MTT testom izvršeno mjerenje njihove citotoksične aktivnosti, te su dobiveni rezultati aktivnosti s obzirom na razliku u koncentraciji i na period inkubacije ekstrakata.

Ključne riječi: mikrovalna ekstrakcija, hlapljivi spojevi, MTT test, antiproliferativna aktivnost

SUMMARY

Besides being essential for life, food greatly affects all the aspects of human life, mostly to health. Proper nutrition filled with variety and healthy food especially with plant species that contain phytochemicals, provides high resistance of the body to various diseases, including cancer. Faced with a huge increase in chronic diseases, man is increasingly choosing healthy nutrition and natural medicines in the prevention of various diseases. This study examines antiproliferative activity of black and brown micowave mustard seeds extracts on breast (MDA MB 231) and bladder (TCC SUP) cancer cells. Extracts obtained by the microwave extraction method are analyzed by gas chromatography-mass spectometry (GC-MS) to identify the dominant compound. Then MTT test measured their cytotoxic activity and so the results were obtained considering the difference in concentration and in incubation period.

Keywords: microwave extraction, volatile compounds, MTT test, antiproliferative activity

SADRŽAJ

UVOD 1
1. OPĆI DIO 2
1.1. Kupusnjače kao izvor biološki aktivnih spojeva 2
1.2. Crna gorušica 4
1.3. Smeđa gorušica 6
1.4. Antikancerogena aktivnost spojeva iz kupusnjača 8
1.5. Mikrovalna ekstrakcija 11
1.6. Plinska kromatografija 13
2. EKSPERIMENTALNI DIO 16
2.1. Mikrovalna ekstrakcija aroma i eteričnog ulja 16
2.2. GC-MS analiza 18
2.3. Priprema uzorka 19
2.4. MTT test (određivanje citotoksične aktivnosti) 20
3. REZULTATI 22
4. RASPRAVA 31
5. ZAKLJUČAK 33
6. LITERATURA 34

UVOD

Biljke porodice *Brassicaceae* sadrže brojne hlapljive spojeve. Posebno se ističe rod *Brassica* koji je bogat tim spojevima i obuhvaća niz biljaka prisutnih u svakodnevnoj prehrani. Crna i smeđa gorušica iz roda *Brassica* su prisutne u prehrani bilo kao povrće ili začin te su izvor spojeva koji pozitivno utječu na zdravlje čovjeka. Glukozinolati (β-tioglukozidni-N-hidroksisulfati) su spojevi koji nastaju biosintezom iz aminokiselina te daju aromu i začinjen okus biljkama. Biološki su neaktivni i inertni, ali kad dođe do kemijske, mehaničke ili toplinske destrukcije biljnih stanica u kojima se nalaze glukozinolati i oslobađanja enzima mirozinaze, dolazi do razgradnje glukozinolata na hlapljive, biološki aktivne spojeve. Najvažniji produkti razgradnje su izotiocijanati, tiocijanati, nitrili i indoli. Produkti pokazuju niz bioloških učinaka kao antibakterijska, antivirusna, antioksidacijska, protuupalna pa čak i antikancerogena svojstva. Istraživanja su pokazala da ljudi koji u prehrani često konzumiraju kupusnjače imaju smanjen rizik od karcinoma.

1. OPĆI DIO

1.1. Kupusnjače kao izvor biološki aktivnih spojeva

Kupusnjače ili krstašice (*Brassicaceae,* prethodno *Cruciferae*) su porodica cvjetnica (red *Brassicales*) i predstavljaju monofilitsku skupinu rasprostranjenu po cijelom svijetu, osim Antartika i sadrže oko 338 rodova i 3 709 vrsta. Ključni poljoprivredni rod porodice *Brassicaceae* je rod *Brassica* koji uključuje kupus, brokulu, prokulice, kelj, korabu, kinesko zelje, repu, hibridnu repu, cvjetaču, gorušicu, hren. Najviše uzgojeno i korišteno povrće roda *Brassica* uključuje *Brassica oleracea* i *Brassica rapa* koje su gotovo u potpunosti jestive (korijen, stabljika, lišće, cvatovi i sjeme) dok se sjemenke *Brassica nigra*, *Brassica juncea* i *Brassica carinata* koriste kao i začin.(1)

Biljke iz porodice kupusnjača mogu biti jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje. Uglavnom su grmovi, polugrmovi ili zeljaste biljke, listovi su jednostavni, najčešće naizmjenični i rijetko suprotni, cvjetovi sadrže četiri slobodne latice te imaju tipičan križni raspored (otuda stari naziv *Cruciferae*). Sjemenke su obično žute ili smeđe, spljoštene ili ispupčene, jajolike, duguljaste ili okruglaste i proizvode se u suhim plodovim.(2)

Jedinstvene su po tome što su bogat izvor spojeva koji sadrže sumpor, nazvani glukozinolati. Glukozinolati se mogu podijeliti u tri kategorije s obzirom na strukturne sličnosti bočnog lanca: alifatski, aromatski i heterociklički (indolni) glukozinolati.(3)

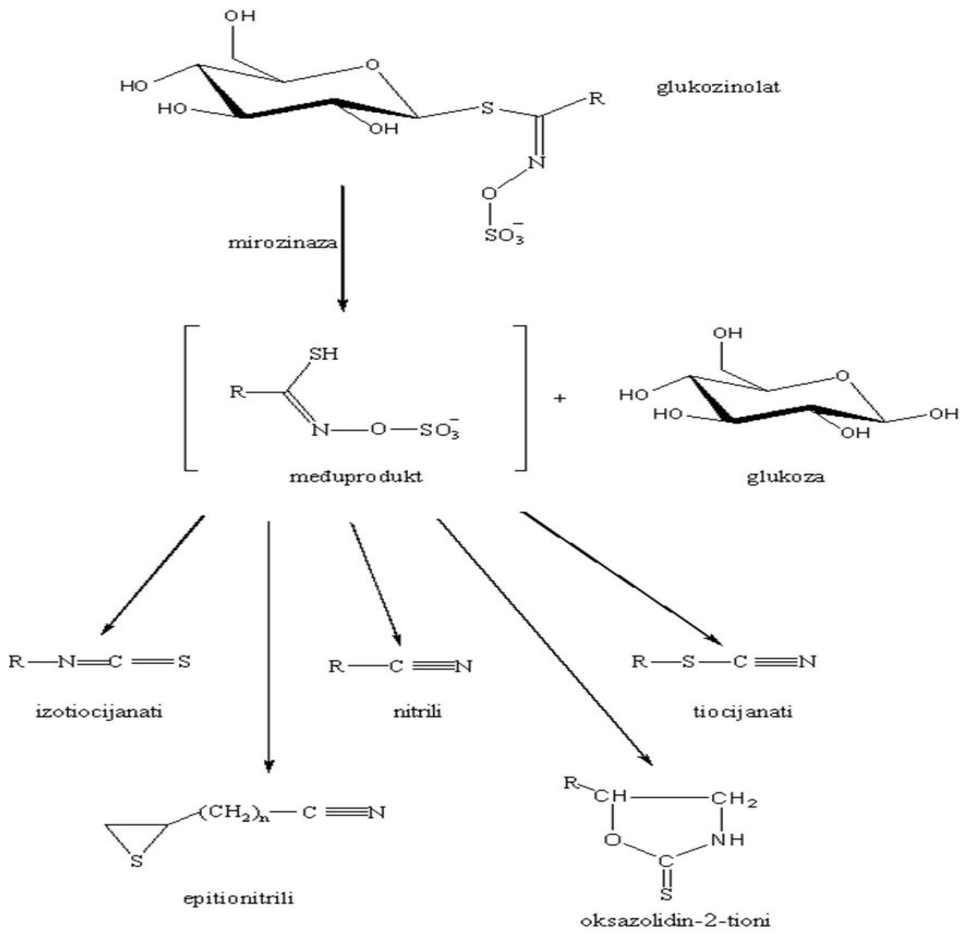
Glukozinolati ili sekundarni biljni metaboliti se sintetiziraju u živim organizmima iz aminokiselina. Predstavljaju grupu organskih aniona koji se iz biljaka mogu izolirati u obliku natrijevih i kalijevih soli. Ono što je svojstveno svim glukozinolatima jesu zajedničke strukturne karakteristike. Oni se sastoje od β-D-tioglukozidnog dijela, sulfatne skupine koja je preko C=N skupine vezana za ostatak molekule i bočnog lanca. Bočni lanac je promjenjiv te se po njemu glukozinolati međusobno razlikuju. Osnova je njihove strukturne raznolikosti kao i biološke aktivnosti produkati koji nastaju razgradnjom. Biljke iz tri porodice reda *Resedaceae, Capparaceae* i *Brassicaceae* sadrže najveće količine glukozinolata, iako je za čovjeka najznačajnija porodica *Brassicaceae* jer u toj porodici spada većina kultiviranih biljaka koje sadrže glukozinolate i koje koristimo u svakodnevnoj prehrani. Glukozinolati su

kemijski stabilni i biološki neaktivni, tek oštećenjem biljnog tkiva prouzrokovanog industrijskom obradom hrane, sjeckanjem, žvakanjem glukozinolati dolaze u kontakt s mirozinazom, endogenim enzimom te dolaze do njihove hidrolize pri čemu nastaju biološki aktivni spojevi kao što su izotiocijanati, tiocijanati, nitrili, indoli i oksazolidin-2-tioni. Pojedini razgradni produkti hidrolize glukozinolata posjeduju antimikrobna, antifugalna, antioksidacijska pa čak i antikancerogena svojstva, dok su neki štetni. Glukozinolati su prisutni u svim dijelovima biljke, ali u različitim oblicima i koncentracijama. Kod većine biljaka najveća koncentracija glukozinolata se nalazi u sjemenu.(4)

Glukozinolati se razgrađuju na produkte hidrolizom, enzimskom ili kemijskom, ali i pod utjecajem povišene temperature (toplinski). Hidroliza glukozinolata koju katalizira enzim mirozinaza (tioglukozid-glukohidrolaza) odnosno grupa enzima dovodi do stvaranja produkata razgradnje poput izotiocijanata, tiocijanata, indola, nitrila, oksazolidin-2-tiona. Mirozinaza je fizički odvojena od glukozinolata u netaknutim specifičnim „mirozinskim stanicama“ dok se glukozinolati nalaze u vakuolama biljnih stanica. Ipak kad se biljne stanice oštete bilo sjeckanjem, žvakanjem ili nekom drugom obradom, mirozinaza se oslobađa i dolazi u kontakt s glukozinolatima, katalizirajući njihovu pretvorbu u visoko reaktivne metabolite. Također su važni uvjeti u kojima se događa hidroliza, posebno je važna pH vrijednost. Pri pH=7 dolazi do Lossenove pregradnje i kao glavni razgradni produkti nastaju izotiocijanati. Pri pH<4 glavni produkti razgradnje su nitrili. Također na razgradnju utječe i prisutnost fero iona Fe^{2+} te će bez obzira na pH vrijednost u njihovoj prisutnosti nastati nitrili. Najpoznatiji biološki aktivni spojevi koji nastaju enzimskom hidrolizom glukozinolata su izotiocijanati i indoli.(3)

Izotiocijanati ili „normalni“ produkti razgradnje glukozinolata, kako su prije smatrani, obično nastaju pri neutralnom pH kada početni nestabilni aglukonski međuprodukt podliježe Lossenovoj pregradnji u R-N=C=S konfiguraciju. To su često hlapljivi spojevi sa karakterističnim oštrim mirisom ili ljutim okusom. Izotiocijanati su vrlo reaktivni, ali ipak manje nego njima srodni izotiocijanati. Često su bili razmatrani kao kandidati za pesticidnu aktivnosti zbog poznate toksičnosti. Ponekad nazivani gorušičnim uljima zbog prisutnosti prop-1-en-il-izotiocijanata (alil-izotiocijanat) u gorušici ili hrenu koji je odgovoran za miris i okus.(5) Izotiocijanati koji sadrže β-

hidroksilnu skupinu u bočnom lancu zbog nestabilnosti imaju mogućnost spontanom intramolekulskom reakcijom tvoriti cikličke tionske spojeve-oksazolindin-2-tione.(4)



Slika 1. Opća shema hidrolize glukozinolata i strukture glavnih razgradnih produkata (3)

1.2. Crna gorušica

Gorušica spada među najstarije zabilježene začine prema sanskrt zapisima koji potiču oko 3000 godina prije Krista te je također bila među prvim domaćim usjevima. Spada u rod *Brassica* koji se sastoji od 150 vrsta jednogodišnjih i dvogodišnjih biljaka, od kojih se nekoliko uzgaja kao usjev uljarica ili kao povrće. Najviše se uzgaja u Francuskoj, Njemačkoj, Ujedinjenom Kraljevstvu, Kanadi, Americi, Indiji i Japanu. Koristi se kao začin, a mogu se koristiti listovi, sjemenke i ulje. Osim toga upotrebljavala se i kao lijek. Kao lijek koristio se i senf, začin u obliku paste dobiven iz sjemenki biljke gorušice, za liječenje artritisa i reumatizma, a oblaganje senfom se primjenjivalo za zagrijavanje hladnih stopala, bolju cirkulaciju i opuštanje ukočenih

mišića. Zanimljiva je upotreba gorušice u zaštiti biljaka od bolesti uzrokovanih bakterijskom ili gljivičnom infekcijom ili insektima. Razgradni produkti glukozinolata koji su prisutni u gorušici kao što su izotiocijanati i nitrili mogu djelovati kao fumiganti. Bezbroj vrsta gorušice je dostupno širom svijeta, a tri vrste sjemena gorušice se koriste kao začin: bijela gorušica (*Brassica alba*), crna ili tamno smeđa gorušica (*Brassica nigra*) i smeđa ili orijentalna gorušica (*Brassica juncea*).(6)

Crna gorušica (*Brassica nigra*) je zeljasta biljka iz porodice kupusnjača (*Brassicaceae*). Vjerojatno je endemska vrsta regije južnog Sredozemlja. *Brassica nigra* nije samo važna kao usjevna biljka, već je i pridonijela razvoju nekoliko vrsta iz roda *Brassica*. Jednogodišnja je biljka koja naraste do visine od oko 1 m. Listovi su tamnozeleni dlakavi, peteljkasti i naizmjenični. Donji listovi su veliki i hrapavi, dok su gornji umjereno rebrasti i glatki. Cvjetovi su mali svijetlo žuti križani s četiri latice. Sjemenke su male, crveno-smeđe do crne boje bez koštica. Veličine su oko 2 mm ili manje te imaju tendenciju da su malo više duguljaste. Sjemenke crne gorušice se nazivaju prvim senfom i također su poznate kao senafik (amharski), zwarte mosterd (nizozemski), moutarde noir (francuski), rai (hindski), senape blizu (talijanski), biji sawi hitam (malezijski, indonezijski), mostarda preta (portugalski) i mostaza negra (španjolski). Crna gorušica nije toliko popularna u SAD-u i Europi zbog teškoća u žetvi.(6)



Slika 2. Izgled biljke crna gorušica (7)

U upotrebi su jestivi mladi listovi koji se mogu konzumirati sirovi ili kuhati kao varivo. U 100 g listova gorušice ima 130-160 mg vitamina C i 7 mg karotina. Biljka se većinom uzgaja zbog sjemenki koje imaju značajnu količinu ulje te su jestive, a mogu se koristiti za dobivanje gorušičina ulja, brašna postupkom mljevenja te služe kao začin za pripremu senfa. Glavna komponenta u sjemenkama koja daje ljutkast okus je glukozinolat sinigrin.(13) Ljekoviti učinak je većinom ograničen na sjemenke zbog sadržaja sinigrina čijom hidrolizom dobijemo hlapljivi alil izotiocijanat te se mogu koristiti kao tonik, probavni, emetički stimulans apetita, antiseptici, za tumore i karcinome, itd. (15)

Crna gorušica sadrži flavonole, posebno je karakterizira prisutnost izorhamnetin-3-soforosida.(14) Biljka je obdarena raznim farmakološkim aktivnim fitokemikalijama poput alkaloida, flavonoida, tanina, terpenoida i drugih spojeva, te upravo zbog tih bioaktivnih metabolita u sirovom materijalu crna gorušica pokazuje razna protuupalna, antioksidacijska, antikancerogena i razna druga svojstva.(15)

1.3. Smeđa gorušica

Smeđa gorušica (*Brassica juncea*) izvorno je uvezena iz Kine u sjevernu Indiju od kuda preko Punjaba dospijeva u Afganistan. Popularno je poznata kao rai ili indijska gorušica, Indischer senf (njemački), moutarde de Chine (francuski), senape Indiana (talijanski) i mostaza India (španjolski). Nastala je hibridizacijom *Brassice nigre* s *Brassica campestris* u jugozapadnoj Aziji i Indiji gdje se prirodna rasprostranjenost ove dvije vrste preklapa. Sadrži dvije sorte: „Oriental“ koju uglavnom koriste Kinezi i drugu tamniju i jaču smeđu sortu koju koriste Indijci. To je jednogodišnja zeljasta, razgranata i uspravna biljka koja je glavni izvor oporosti među kultiviranim gorušicama. Cvjetovi su mali i svijetlo žute boje dok su sjemenke male, kuglaste, tvrde te žute do smeđe boje i sadrže 35% ulja. U SAD-u prije 1940. godine se smatrala inferiornom *Brassica nigra*, ali uvođenjem novog žutog sjemena iz Kine smeđa gorušica je postala vrlo popularna, jer je kultura koja je podložna kombiniranoj žetvi.(6)



Slika 3. Sjeme smeđe gorušice (8)

Smeđa gorušica se može koristiti kao povrće, nježna zelena biljka kao i mahune te i lišće koje ima okus rotkvice. Također je na tržištu dostupno i osušeno lišće kao povrće. U upotrebi je i brašno, cijelo sjeme, senf i začinska mješavina kao Bordeaux senf koji se proizvodi od crnog sjemena pomiješanog sa nefermentiranim vinom.(6)

Smeđa gorušica sadrži glukozinolat sinalbin (4-hidroksibenzil glukozinolat) koji hidrolizom uz pomoć enzima mirozinaze ili glukozinolaze daje razgradne produkte p-hidroksibenzil-izotiocijanat, p-hidroksibenzilamin i druge slične spojeve (ulja, proteine, itd.).(6)

Ulje gorušice ima visoku koncentraciju eručne kiseline čak od 22% do 60%, a pošto se ona povezuje s lipidozom miokarda te oštećenjem srca u testiranih životinja nije dobra za ljudsku primjenu. Sastav ulja gorušice proizvedenog bez kondicioniranja čine visoke koncentracije linolne, oleinske i eručne kiseline, umjerene koncentracije linolenske i eikosenske kiseline te niske koncentracije palmitinske i stearinske kiseline od ukupnih masnih kiselina.(9)

Sjeme gorušice sadrži karotenoide i tokoferole kao što su β-karoten i lutein. Tokoferoli, skupina koju neki nazivaju vitaminom E, su liposolubni antioksidansi čija aktivnost ovisi o njihovim koncentracijama i izomerima. Iako se karotenoidi smatraju antioksidansima u ulju, u specifičnim uvjetima β-karoten, likopen i lutein mogu ubrzati oksidaciju.(9) Sjeme je također bogato proteinima izvrsne nutritivne vrijednosti, bogatim lizinom s adekvatnim količinama aminokiselina koje sadrže sumpor.(10)

Najvažnije komponente smeđe gorušice su glukozinolat sinigrin, enzim mirozinaza, sinapska kiselina i sinapin.(6) Sinigrin (2-propenil-glukozinolat) je prirodni alifatski glukozinolat prisutan u sjemenu smeđe gorušice. Studije provedene na farmakološkim aktivnostima sinigrina otkrile su da on ima antikancerogena, protuupalna, antibakterijska, antioksidacijska svojstva.(11) Enzimskom hidrolizom sinigrina uz enzim mirozinazu nastaju razgradni produkti, hlapljivi alil izotiocijanat, glukoza i kalijev biosulfat. Manje hlapljive komponente oslobođene razgradnjom su metil, izopropil, sec-butil, butil, 3-butenil, 4-pentenil, fenil, benzil i β-feniletil izoticijanati.(6)

Alil izotiocijanat ima različite biološke učinke te vitalnu ulogu u prevenciji karcinoma i oštećenja DNA uzrokovanih kancerogenima. Također se koristi kao dodatak prehrani u svrhu preventivnog i ljekovitog djelovanja na različite bolesti.(12)

1.4. Antikancerogena aktivnost spojeva iz kupusnjača

Fitokemikalije ili nutraceutici su biološki aktivni sekundarni metaboliti koji hrani biljnog podrijetla daju aromu, okus, miris, boju, prirodnu toksičnost za štetnike i uglavnom imaju povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje. Glukozinolati, odnosno tioglukozidi su sekundarni biljni metaboliti koji se smatraju fitokemikalijama. Oni su fiziološki neaktivni, tek njihovom razgradnjom se dobivaju razni hlapljivi spojevi kao izotiocijanati, tiocijanati, indoli, nitrili koji pokazaju niz bioloških aktivnosti kao antioksidacijska, antibakterijska, antivirusna, antikancerogena, protuupalna aktivnost i jačanje imunološkog sustava. Koncentracija biološki aktivnih spojeva dobivenih razgradnjom ovisi o koncentraciji glukozinolata i o opsegu hidrolize glukozinolata, koja može varirati od biljne raznolikosti, uvjeta rasta okoliša, aktivnosti mirozinaze i tehnologiji prerade sjemena. Crna gorušica sadrži glukozinolat sinigrin, prirodni alifatski glukozinolat, dok smeđa gorušica sadrži ogromne količine sinigrina u usporedbi sa ostalim biljkama iz porodice *Brassicaceae*, te također sadrži i sinalbin (4-hidroksibenzil glukozinolat). Enzimskom hidrolizom sinigrina dobiva se hlapljivi alil izotiocijanat, koji ima različite biološke učinke.(4,11)

Istraživanja pokazuju da razgradni produkti glukozinolata modificiraju aktivnost enzima Faze 1 i Faze 2 što čini prvu obrambenu liniju organizma od kancerogenih tvari.

Uz to inhibiraju rast stanica tumora i stimuliraju apoptozu (programiranu smrt stanica). Procesi kancerogeneze koji su regulirani enzimima Faze 1 i Faze 2 uglavnom se događaju u mukozi crijeva i jetri.

Enzimi Faze 1 (enzimi citokrom P450) svojim djelovanjem povećavaju reaktivnost tvari topljivih u mastima tvoreći od toksičnih polaznih molekula još toksičnije. Reakcijama oksidacije i redukcije mijenjaju prokancerogene molekule, ali i postupkom hidrolize do hidrofobnih molekula, te se tako dobivaju vrlo reaktivni intermedijeri koji oštećuju DNK i RNK. Razgradni produkti glukozinolata djeluju tako inhibiraju aktivnost ovih enzima.

Enzimi Faze 2 (glutation-S-transferaza,S-metil-transferaza, aldehid reduktaza, N-acetil-transferaza) djeluju na način da povećavaju topljivost u vodi i izlučivanje štetnih tvari iz tijela. Ovi enzimi konvertiraju kancerogene tvari reakcijama konjugacije s ligandima, acetiliranja, pripajanja sulfatnih skupina i metiliranja u nereaktivne metabolite koje ljudski organizam lako izluči. Razgradni produkti glukozinolata djeluju na ove enzime tako da povećavaju njihovu aktivnost.(4)

Mnogi biljni izotiocijanati kao alil izotiocijanati, benzil izotiocijanati, feniletil izotiocijanati i sulforafan koji se pojavljuju u prehrani ljudi su moćna kemopreventivna sredstva protiv karcinoma. Među antikancerogenim mehanizmima otkrivenim za izotiocijanate je i inhibicija stanične proliferacije. Istraživanja su pokazala da izloženost stanica karcinoma izoticijanatima na samo 3 sata je dovoljno dugo za inhibiciju stanica karcinoma na temelju usporedbe IC50 vrijednosti bez obzira na podrijetlo stanica karcinoma. Otkriće da neki izotiocijanati mogu inhibirati proliferaciju stanica karcinoma na način koji uglavnom nije ovisan o vremenu je značajan jer se izotiocijanati koji ulaze u ljudski organizam brzo uklanjaju mokraćnim izlučivanjem. Na njihovo antiproliferativno djelovanje može u velikoj mjeri utjecati njihov metabolizam. Izotiocijanati se nakon oralne konzumacije metaboliziraju uglavnom putem merkapturne kiseline. Prvo se konjugiraju sa glutationom preko cistein sulfhidrilne skupine koja se pojavljuje spontano, ali je dodatno pojačana glutation-S-transferazom. Istraživanja su pokazala da izvanredna antikancerogena svojstva izotiocijanata proizlaze od njihove sposobnosti da ometaju više koraka u kancerogenom procesu: smanjenje genetskog oštećenje kao rezultat inhibicije enzima koji aktiviraju karcinom (enzimi Faze 1) i indukcija kancerogeno detoksikacijskih enzima (enzimi

Faze 2), inhibirajući proliferaciju genetskih oštećenih stanica kao rezultat indukcije apoptoze i zaustavljanje staničnog ciklusa, te indukciju diferencijacija malignih stanica. Izotiocijanati također mogu biti važna terapijska sredstva protiv karcinoma. Studije su još pokazale da u usporedbi četiri izotiocijanata (alil izotiocijanat,benzil izotiocijanat, feniletil izotiocijanat i sulforafan) koja pokazuju snažno antikancerogeno djelovanje njihova sposobnost da brzo induciraju inhibiciju rasta stanica nije specifična za stanicu, već za specifičan izotiocijanat.(16,17)

Kemopreventivni mehanizmi izotiocijanata uključuju modulaciju proteina povezanih sa karcinomom koji sudjeluju u upali, zaustavljanju staničnog ciklusa, staničnoj smrti, angiogenezi, inavaziji i metastazama, zajedno sa modulacijom enzima koji metaboliziraju karcinom. Benzil izotiocijanati, feniletil izotiocijanati i sulforafan također ciljaju matične stanice karcinoma. Izotiocijanati inhibiraju razvoj karcinoma izazvanih karcinoma u organima glodavaca, uključujući mjehur, debelo crijevo, jednjak,jetru, pluća, gušteraču, kožu. U modelima karcinoma ksenografta, alil izotiocijanat, benzil izotiocijanat, feniletil izotiocijanat i sulforafan inhibiraju karcinom mokraćnog mjehura i dojke. Izotiocijanate karakterizira prisustvo elektorfilne funkcionalne skupine –N=C=S i bočnog lanca jedinstvenog za svaki izotiocijanat. Kemopreventivna djelovanja izotiocijanata posreduju prvenstveno izravnom reakcijom ugljikovog atoma grupe –N=C=S sa staničnim nukleofilima, uključujući mnoge proteine povezane s karcinomom. Bočni lanci mogu modulirati svoju hemopreventivnu aktivnost utječući na elektrofilnost grupe –N=C=S i lipofilnost izotiocijanata. Aktivnost izotiocijanata koja inhibira rast nije specifična za određenu staničnu liniju karcinoma, ali se čini da inhibira stanice karcinoma više od normalnih stanica.(17)

Nekoliko izotiocijanata je poznato da inducira apoptozu i zaustavlja stanični ciklus u nekoliko vrsta kultiviranih stanica karcinoma čovjeka. Nakon što se stanica podijeli prolazi kroz niz faza poznatih kao stanični ciklus. Nakon DNK oštećenja, stanični ciklus može biti prolazno zaustavljen kako bi se omogućio popravak DNK ili aktiviranje putova koji vode do programirane stanične smrti (apoptoza) kada se oštećenja ne mogu popraviti. Regulacija oštećenog staničnog ciklusa i mehanizmi za preživljavanje mogu rezultirati širenjem mutacija koje doprinose razvoju karcinoma. Otkriveno je da izotiocijanati moduliraju ekspresiju regulatora staničnog ciklusa, ciklina i ciklin zavisna kinaza, kao i pokreću apoptozu u velikom broju staničnih linija karcinoma. U mišjem modelu kolorektalnog karcinoma oralno davanje feniletil

izotiocijanata smanjilo je i broj i veličinu polipa, a ove promjene su bile povezane sa aktiviranjem inhibitora CDK, inhibicijom različitih ciklina i indukcijom apoptoze.(18)

1.5. Mikrovalna ekstrakcija

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda koncentriranja i razdvajanja tvari. Provodi se na osnovu različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Mikrovalne pećnice se danas u prehrambenoj industriji koriste u različite svrhe, poput zagrijavanja, sušenja, blanširanja, odmrzavanja. Mikrovalovi koje mikrovalna pećnica koristi ne uzrokuju promjene u strukturi tvari jer imaju ograničen potencijal. Molekule mikrovalova titraju i međusobno se taru te time uzrokuju povišenje temperature. Još jedna svrha korištenja mikrovalova je mikrovalna pasterizacija, ali moguće nejednako zagrijavanje može biti jedna od glavnih prepreka za tu svrhu. Mikrovalna ekstrakcija je nova, brza i pouzdana analitička metoda ekstrakcije koja koristi mikrovalove za analizu tragova organskih spojeva kod krutih uzoraka, ekstrakciju prirodnih spojeva kao što su kofein, flavaonidi, polifenolni spojevi iz čaja i sjemenki grožđa. Upotrebom mikrovalne ekstrakcije moguće je uz puno kraće vrijeme dobiti slične udjele ekstrahiranih tvari kao i standardnim metodama što je ekonomski i energetski isplativo. Prednost ove metode je smanjeno vrijeme ekstrakcije, smanjena upotreba otapala i poboljšani ekstrakcijski prinos, ali pažnju treba obratiti na mane kao što su previsoke temperature što se može negativno odraziti na bioaktivne spojeve te samim time i na kvalitetu ekstrahiranog materijala (19).

Mikrovalovi su radiovalovi u frekvencijskom rasponu od 0,3 do 300 Ghz. Dio su elektromagnetskog zračenja koje predstavlja gibanje energije i nastaje kao fizikalni fenomen protoka električne struje kroz vodič. Protokom struje kroz neki vodič nastaju dva polja koja okružuju vodič - električno i magnetsko polje. Promjena smjera struje dovodi do pulsiranja oba polja te nastajanje elektromagnetskih valova čiji je smjer širenja okomit na smjer struje koja ih je proizvela. Imaju široku primjenu u radarskoj tehnici, mobitelima, satelitskoj televiziji, a zajedno sa valovima kojima se prenose audio i video signali, infracrvene zrake i zrake vidljive svjetlosti spadaju u kategoriju neionizirajućeg zračenja. Glavne karakteristike mikrovalova su odbijanje od metala, prolazak kroz staklo, plastiku i papir te najvažnija zagrijavanje vode prisutne u hrani. Karakteristika radiovalova u rasponu frekvencija od oko 2,5 GHz je ta da ih voda, masti i šećeri konvertiraju direktno u gibanje te se ono pretvara u toplinu.(19)

Dielektrično zagrijavanje je ovisno o sposobnosti materijala da apsorbira mikrovalnu energiju te je pretvori u toplinu. Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka simultano i tako oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Samo kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriksu i tako potiče otapanje.(19)

Dvije su vrste komercijalno dostupnih sustava mikrovalne ekstrakcije. Prva je ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi te se ona koristi u uvjetima niske i visoke temperature gdje tlak u posudi ovisi o količini i vrelištu otapala. Druga je ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku. Metoda mikrovalne ekstrakcije se često koristi za izdvajanje spojeva osjetljivih na temperaturu kao eterična ulja. Postoje dva postupka mikrovalne ekstrakcije. U prvom se odvija kondenzacija s vodenim hladilom što iziskuje veći utrošak energije i više vremena, dok se u drugom ekstrahirani materijal skuplja na dno uređaja u posudu uz pomoć sile gravitacije bez utroška energije i vremena.(19)

Čimbenici koji utječu na učinkovitost mikrovalne ekstrakcije su : snaga mikrovalova, temperatura, izbor otapala, vrijeme trajanja ekstrakcije, karakteristike matriksa.(20)

Snaga mikrovalova i vrijeme izloženosti mikrovalovima utječu dosta jedno na drugo. Općenito je izabrana kombinacija male ili umjerene snage i duge izloženosti mikrovalovima kako bi se postupak ekstrakcije optimizirao. Prilikom korištenja velike snage uvijek postoji povećani rizik od toplinske degradacije odnosno uništavanja nekih toplinskih osjetljivih komponenti.(20)

Izbor odgovarajućeg otapala ovisi o topljivosti željenog analita, interakciji između otapala i matriksa kao i o svojstvu otapala da dobro apsorbira energiju mikrovalova. Odgovarajuće otapalo također treba imati visoku selektivnost prema željenom analitu u odnosu na ostale komponente u matriksu i dobru kompaktibilnost s daljnjim kromatografskim analitičkim koracima. Ona otapala koja imaju bolju sposobnost apsorbiranja energije mikrovalova se brže zagrijavaju te poboljšavaju postupak ekstrakcije.(20)

Jedan od važnih čimbenika je vrijeme trajanja mikrovalne ektrakcije. Što je duže vrijeme trajanja ekstrakcije dobiva se veća količina ekstrahiranog materijala, ali je i povećan rizik od razgradnje određenih komponenti. Ovisno o vrsti komponente koju

želimo ekstrahirati potrebno je različito vrijeme trajanja, čak je i nekoliko sekundi dovoljno za određene komponente. Na optimizaciju vremena trajanja ekstrakcije utječu i dielektrična svojstva otapala, ali duža izloženost otapala koja apsorbiraju energiju mikrovalova, kao što je voda, opet povećavaju rizik od razgradnju termolabilnih komponenti.(20)

Priroda materijala i veličina čestica koji se analiziraju uvelike utječu na postupak ekstrakcije. Što je veličina čestica uzorka veća, time je veća i površina te je bolji prodor mikrovalova. Manje čestice mogu predstavljati problem tijekom odvajanja matriksa od otapala nakon ekstrakcije. Kao rješenje provode se postupci centrifugiranja ili filtracije. Neki istraživači primjenjuju postupak u kojem se matriks uroni u otapalo na određeno vrijeme prije mikrovalne ekstrakcije, čime su postignuti bolji prinosi. Uzorci koji su tako prethodno obrađeni otapalima koja upijaju energiju mikrovalova, sadrže otapalo i unutar stanica odnosno otapalo se impregira u stanice te se mirkovalnim zračenjem postiže dvostruko zagrijavanje otapala i u okruženju i u stanicama. Kod zatvorenih sustava ekstrakcije treba obratiti pažnju na temperaturu mikrovalne i iskorištenu snagu. Povišenje temperature doprinosi poboljšanoj ekstrakcijskoj učinkovitosti jer pri višim temperaturama viskoznost otapala i površinska napetost opadaju te bolje prodiru u unutrašnjost biljnog materijala.(20)

1.6. Plinska kromatografija

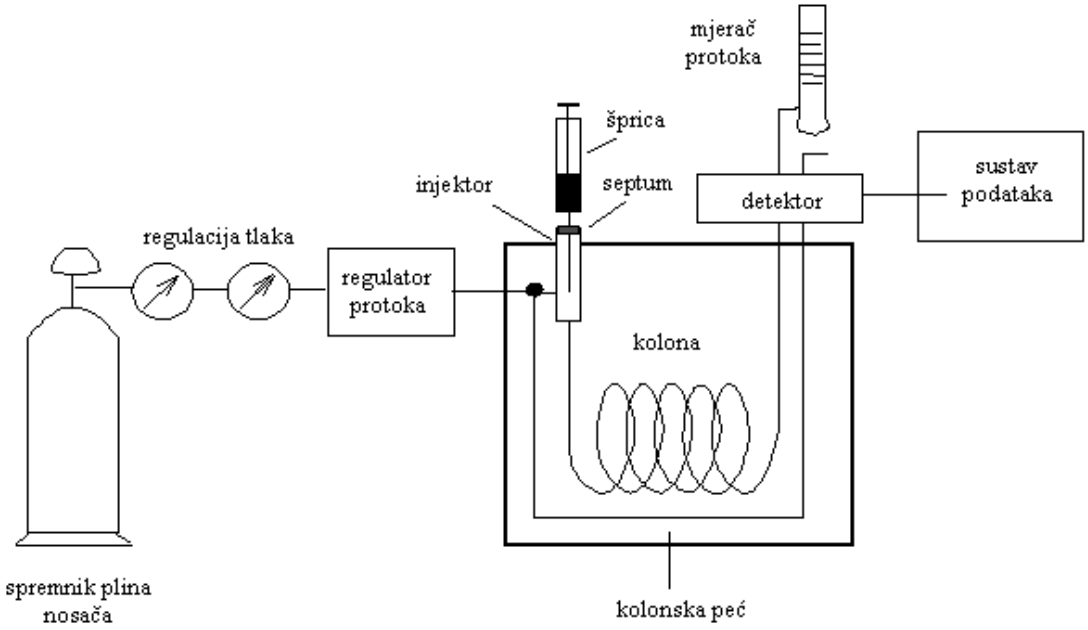
Kromatografija je analitička metoda koja omogućava odvajanje komponenti,te njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje u smjesi. Kromatografske tehnike su: plinska kromatografija, kromatografija u stupcu i kromatografija na tanskom sloju.(5)

Plinska kromatografija služi za odvajanje različitih komponenti u plinskom stanju iz njihovih smjesa. Vrlo je brza metoda odjeljivanja jer nisu potrebne nikakve prethodne operacije. Uređaj za plinsku kromatografiju se sastoji od sljedećih dijelova:

- injekcijski blok,
- kromatografska kolona,
- termostat
- detektor,
- pisač.

Injektiranje uzorka se obavlja u injekcijskom bloku pomoću injekcijskih šprica te samo unošenje uzorka mora biti provodeno odjednom, u maloj količini i brzo jer uzorak mora brzo i potpuno ispariti. Za mobilnu fazu upotrebljavamo inertni plin kojem je uloga da provede kromatografsko odjeljivanje hlapljivih spojeva te ih iznese do detektora. Jako je važno da mobilna faza odnosno plin bude potpuno kemijski inertan da ne dođe do reakcije s uzorkom i materijalom koji ispunjava kolonu. Kao plin nositelj se najčešće koristi helij, dušik, argon ili vodik. Temperatura mora biti pažljivo odabrana te protok plina nositelja mora biti stalan. Stacionarnu fazu čini nehlapljiva tekućina koja je vezana za sorbens ili stjenke. Kromatografske kolone su napravljene od metalnih, plastičnih ili staklenih cijevi i pune se stacionarnom fazom. Duge su oko desetak metara i spiralno savijene, a dužina se bira ovisno o složenosti uzorka odnosno broju spojeva koje uzorak sadrži. Smještene su u termostatu kojem se ovisno o prirodi ispitivanog uzorka kontrolira temperatura. Kao detektor može se koristiti bilo koji uređaj koji na osnovu neke kemijske ili fizikalne promjene detektira prisutnost određene komponente. Prednosti ove kromatografije je mogućnost razdvajanja vrlo malih koncentracija smjese zahvaljujući visokoj osjetljivosti. Plinskom kromatografijom se može razdvojiti veliki broj tvari od plinova niskog vrelišta do organskih molekula velikih vrelišta. Jedini uvjet za primjenu ove metode je odgovarajući tlak para pri temperaturi razdavanja komponenti i njihovoj stabilnosti pri toj istoj temperaturi. Također postoje i neki nedostatci ove metode kao:

- nepotpuno razdvajanje spojeva.
- razrijeđenost; pri visokoj razrijeđenosti spojeve s malim sadržajem nije moguće detektirati, a pri većoj koncentraciji glavni konstituenti će preplaviti kolonu što uzrokuje maskiranje pikova manjih konstituenata i njihovu otežanu identifikaciju,
- dugo trajanje; ukoliko nam je u cilju izolacija manjih konstituenata,
- sadržavanje komponenti visokog vrelišta te je potrebno dugo vremena pri visokim temperaturama da bi izolirali spojeve; često se događa da visoko vrijuće komponente dugo zaostaju u koloni i tako je oštete.(21)



Slika 4. Shema plinskog kromatografa (22)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Mikrovalna ekstrakcija aroma i eteričnog ulja

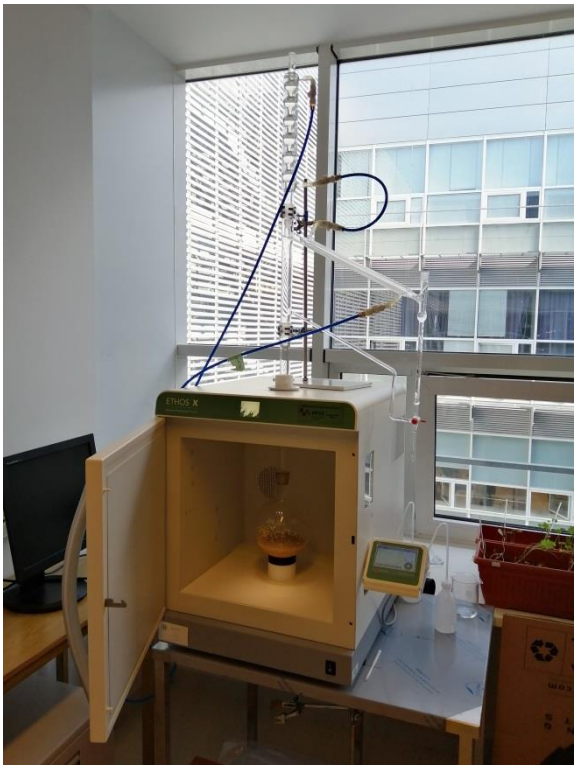
U eksperimentalom dijelu se koristilo sjeme crne i smeđe gorušice. Prije samog postupka mikrovalne ekstrakcije crno sjeme je izvagano, zgnječeno u tarioniku te potopljeno u destiliranu vodu i tako ostavljeno da odstoji 30 do 45 min jer je utvrđeno da je mikrovalna ekstrakcija neučinkovita ukoliko se provodi iz potpuno suhih biljnih materijala. Sjeme smeđe gorušice je također izvagano, ali je prethodno samljeveno te isto potopljeno i ostavljeno u destiliranoj vodi da bi dobili pastu. Nakon hidrolize tako pripremljeno sjeme stavlja se u reaktor u mikrovalnu peć.



Slika 5. Hidroliza crnog gnječenog sjemena

Razlikujemo dva postupka mikrovalne ekstrakcije te će se provoditi oba dva. Kod prvog postupka vrši se kondenzacija s vodenim hladilom te se dobiva eterično ulje. Unutar mikrovalne peći postavi se reaktor sa biljnim materijalom, te na vanjski gornji dio peći spoji se nastavak za dobivanje eteričnog ulja primjenom destilacije, odnosno vodeno hladilo kroz koje će se pare kondenzirati. Hladilo je spojeno na sustav za hlađenje-chiller koji konstantno opskrbljuje sustav vodom za hlađenje temperature 13 °C koja prolazi kroz hladilo. U softveru je potrebno odabrati „fragrance“ te podesiti snagu mikrovalova od 500 W i vrijeme od 30 minuta. Mikrovalovi oslobađaju eterično ulje koje isparava zajedno sa vodom koja je prisutna u samim stanicama biljnog

materijala. Nastale pare prolaze kroz hladilo, a voda u hladilu omogućava kondenzaciju te se eterično ulje skuplja u prostranoj cijevi ispunjenoj destiliranom vodom dok se višak vode prelijeva dodatnim cijevima natrag u reaktor jer se mora nadoknaditi nestala voda iz biljnog materijala. Pošto je prinos eteričnog ulja mali, teško je uočiti graničnu fazu između ulja i vode zbog čega se dodaje pentan kako bi odijeljivanje bilo lakše. Izolat se zatim suši sa bezvodnim natrijevim sulfatom kako bi se uklonila sva voda te dekantira u viale.



Slika 6. Aparatura za dobivanje eteričnog ulja

Drugi postupak mikrovalne ekstrakcije služi za dobivanje aroma te se aparatura razlikuje od one kod destilacije budući da se primjenjuje gravitacijska sila. Aparatura sadrži reaktor koji ima otvor na dnu. Na otvor se nadograđuje staklena cijev te hladilo. Na softveru se odabire „flavor“, odredilo se vrijeme trajanja od 10 min i snaga od 500 W. Izolat se skuplja u čaši na dnu aparature. Izolat može sadržavati i neke nehlapljive molekule veće molekulske mase koje se ne mogu ispariti. Nakon ekstrakcije potrebno je izolat filtrirati da se uklone zaostale ljuske ili nečistoće te potom uzorak ekstrahiramo dva puta sa diklometanom te na kraju se opet doda bezvodni natrijev sulfat radi uklanjanja zaostale vode. Izolat stavljamo u viale.



Slika 7. Aparatura za dobivanje aroma

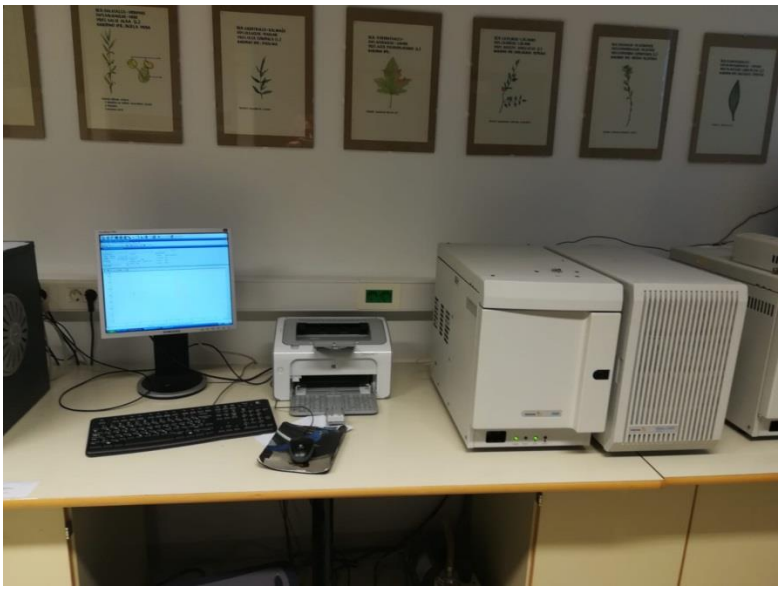


Slika 8. Filtracija izolata

.

2.2. GC-MS analiza

Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa omogućava dobivanje maksimuma podataka uz korištenje minimalne količine materijala. Plinska kromatografija je vrlo dobra metoda za separaciju i kvantizaciju, ali je nepouzdana za kvalitativno određivanje pa za tu analizu koristimo spektometriju masa. Metode rade s uzorkom u plinovitom stanju pri čemu koriste minimalnu isparljivost uzorka. Dobiveni podaci za izolirane komponente su njegovo vrijeme retencije te površina pika koja je proporcionalna količini uzorka. GC-MS analizom izolata se određuje identifikacija komponente te njihova zastupljenost u izolatima.



Slika 9. GC-MS uređaj

2.3. Priprema uzorka

Izolat je potrebno upariti da se dobije čisti uzorak bez otapala te da se izračunaju prinosi. Uparivanje se provodi u struji dušika koji je inertan da ne bi došlo do interakcije sa komponentama iz izolata. Hlapljivi izolat se zagrijava pri temperaturi 47,2°C, a zahvaljujući propuhivanju dušikom taj proces je ubrzan. Prednosti ove tehnike su izlaganje uzorka niskim temperaturama zbog eventualne prisutnosti temolabilnih komponenti.

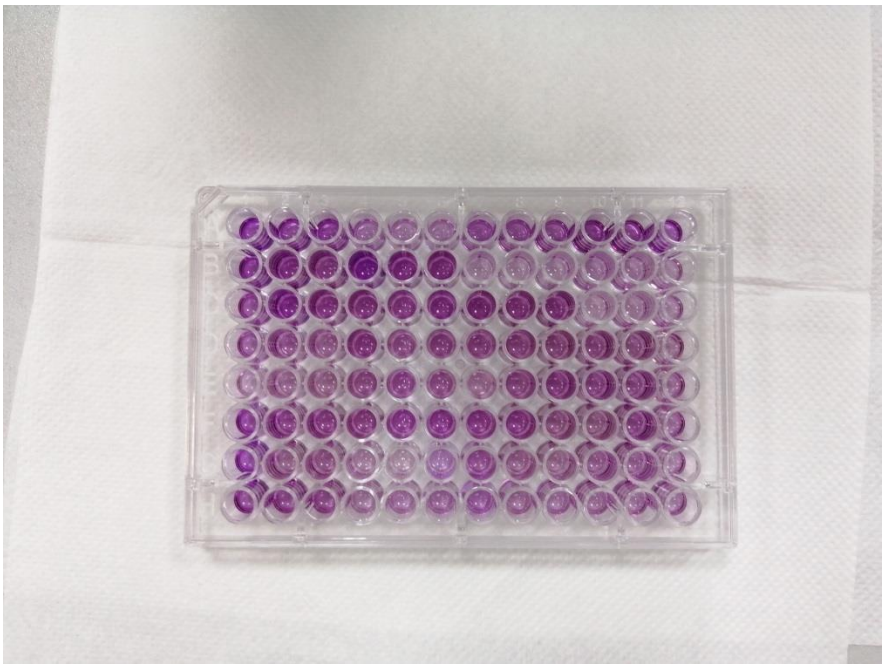


Slika 10. Uparivač

2.4. MTT test (određivanje citotoksične aktivnosti)

Nakon odmrzavanja stanične linije su uzgojene u DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) u inkubatoru na 37°C uz 5% CO_2. DMEM medij sadrži sve potrebne hranjive tvari kao što su minerali, aminokiseline, FBS (goveđi serum) te se u njemu nalaze i antibiotici i Red fenol indikator mijenja boju u žutu kada medij nije valjan te ga treba promijeniti. Nakon uklanjanja DMEM-a stanice koje su adherirale na podlogu tretiraju se tripsinom, enzimom koji cijepanjem peptidnih veza omogućuje odvajanje stanica od podloge i njihovo presađivanje. Potom se vrši brojanje stanica tako da se 10 µl stanica pomiješa sa 90 µl Trypan Blue boje koja oboji samo mrtve stanice te tako omogućuje brojanje neobojanih živih stanica. Jednak broj stanica se presađuje u 96 jažica u 3 replikata te se ostave preko noći da se prihvate za pologu. Stanice se potom tretiraju prethodno pripremljenim vodenim otopinama izotiocijanata u koncentracijama 1µg/mL, 5µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL i 100 µg/mL tijekom 4, 24, 48 i 72 sata. Tri jažice ostavljene samo u mediju predstavljaju kontrolu.(23)

Proliferacija i živost stanica određena je mjerenjem staničnog metabolizma primjenom MTT testa. MTT (3-(4,5-dimetiltiazolid-2)-2,5-difeniltetrazolin bromid) je prah žute boje koji se pripremi otapanjem u fosfatnom puferu (PBS). U metaboličkim aktivnim stanicama se MTT reducira, dok ga metabolički neaktivne stanice odnosno mrtve ne vežu. Žive odnosno metabolički aktivne stanice pretvaraju MTT u ljubičasto obojen spoj formazan. Mehanizam pretvorbe vjerojatno uključuje reakciju sa NADH koji prenosi elektrone do MTT-a. Ljubičasti spoj formazan se može mjeriti spektrofotometrijski, a da bi se mogla očitati apsorbancija potrebno ga je otopiti u DMSO (dimetil sulfoksid). Jedan sat nakon dodavanja MTT je ispran i dodan je DMSO. Pločice se inkubirane na 37 °C na 10 min uz treskanje. Apsorbancija je mjerena na 570 nm. Omjer apsorbancije stanica tretiranih vodenom otopinom izotiocijanata i apsorbancije onih koje nisu tretirane pokazatelj je citotoksične aktivnosti izotiocijanata. (23)



Slika 11. Ljubičasto obojenje nakon dodatka DMSO

3. REZULTATI

Nakon mikrovalne ekstrakcije i uparavanja izračunati su prinosi:

Tablica 1. Početne mase sjemena su:

Uzorci	Mikrovalna ekstrakcija eteričnog ulja (g)	Mikrovalna ekstrakcija aroma (g)
Crna gorušica	52,77	51,40
Smeđa gorušica	72,25	71,62

Tablica 2. Izračunat prinos:

Uzorci	Mikrovalna ekstrakcija eteričnog ulja (mg)	Mikrovalna ekstrakcija aroma (mg)
Crna gorušica	0,63	2,18
Smeđa gorušica	0,8	2,2

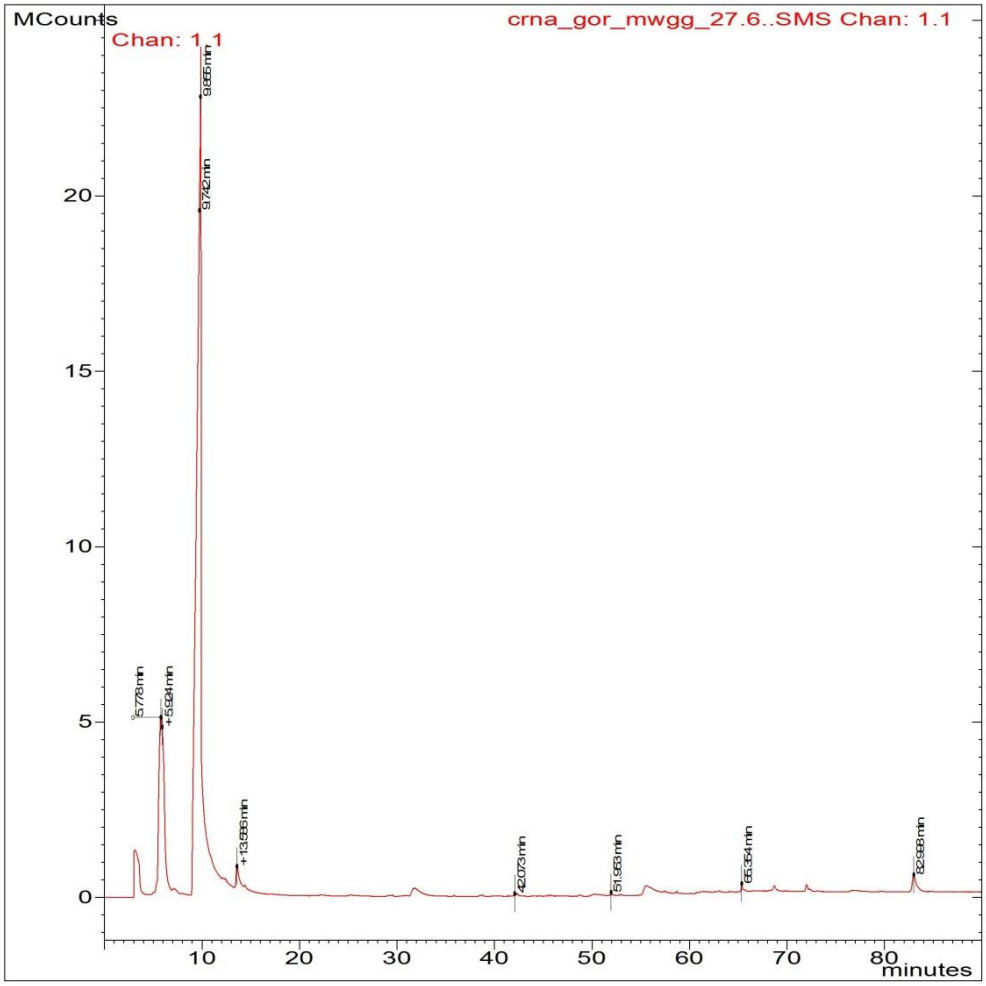
Tablica 3. Postotak prinosa:

Uzorci	Mikrovalna ekstrakcija eteričnog ulja (%)	Mikrovalna ekstrakcija aroma (%)
Crna gorušica	0,001	0,004
Smeđa gorušica	0,001	0,003

GC-MS analizom su dobiveni sljedeći podatci:

Tablica 4. Razgradni produkti glukozinolata u crnoj gorušici nakon mikrovalne destilacije

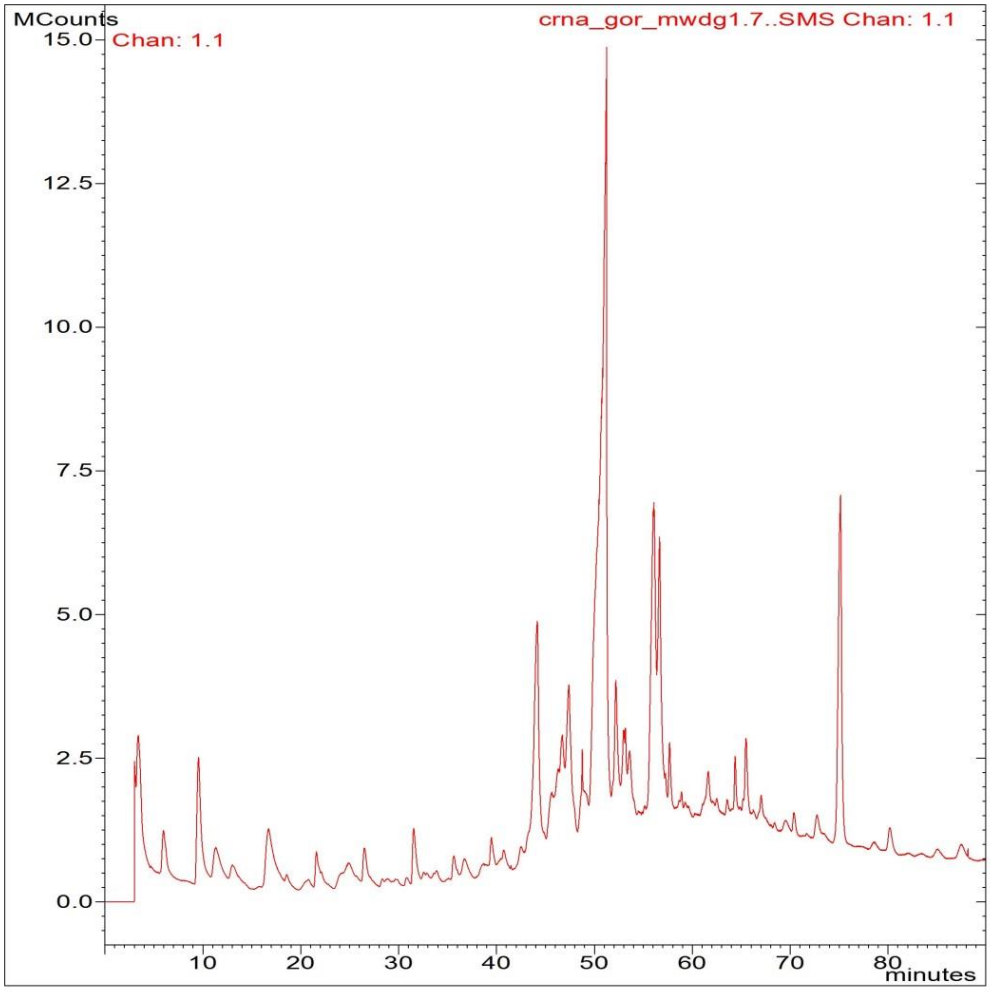
	Vrijeme / min	**Udio (%)**
Alil izotiocijanat	5,764	16,51
But-3-enil izotiocijanat	9,76	71,62
Pent-4-enil izotiocijanat	13,82	2,01
Feniletil izotiocijanat	31,76	1,03



Slika 12. Kromatogram eteričnog ulja crne gorušice

Tablica 5. . Razgradni produkti glukozinolata u crnoj gorušici nakon mikrovalne ekstrakcije

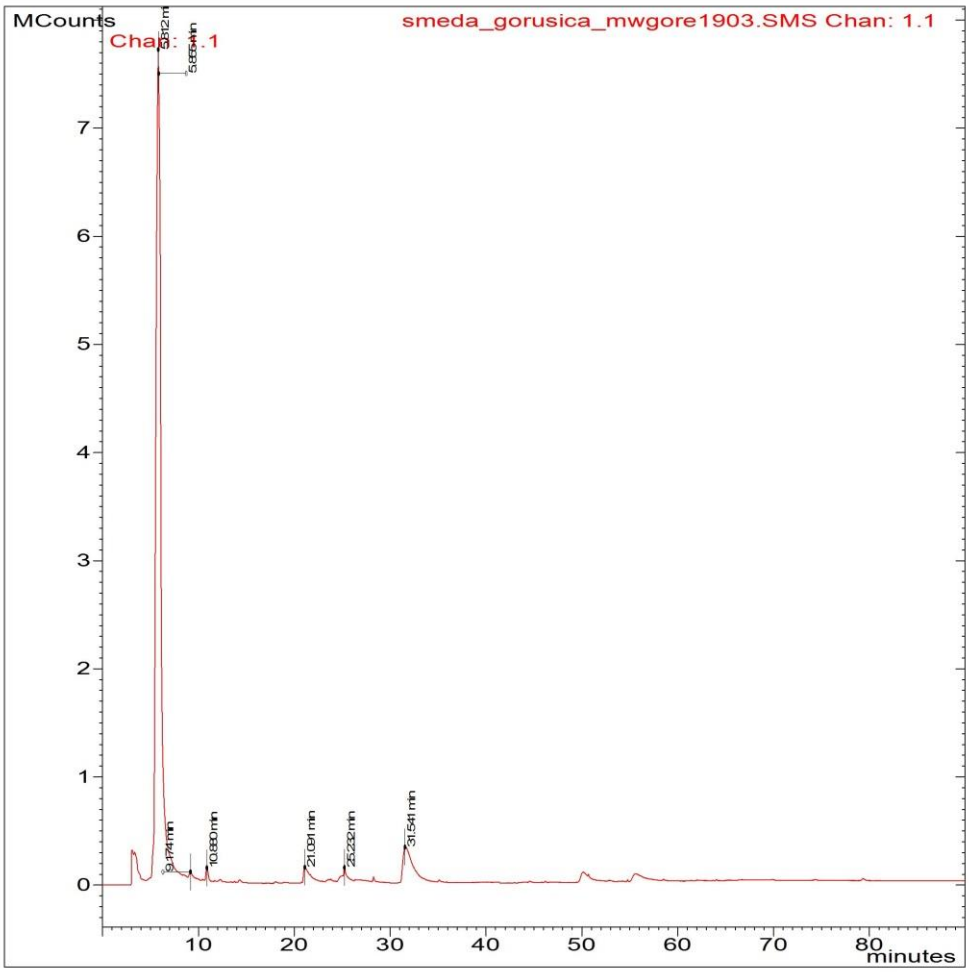
	Vrijeme / min	**Udio (%)**
Alil izotiocijanat	5,764	0,71
But-3-enil izotiocijanat	9,76	2,2
4-5-epitiovaleronitril	16,72	1,9



Slika 13. Kromatogram mikrovalnog ekstrakta crne gorušice

***Tablica 6*. .** Razgradni produkti glukozinolata u smeđoj gorušici nakon mikrovalne destilacije

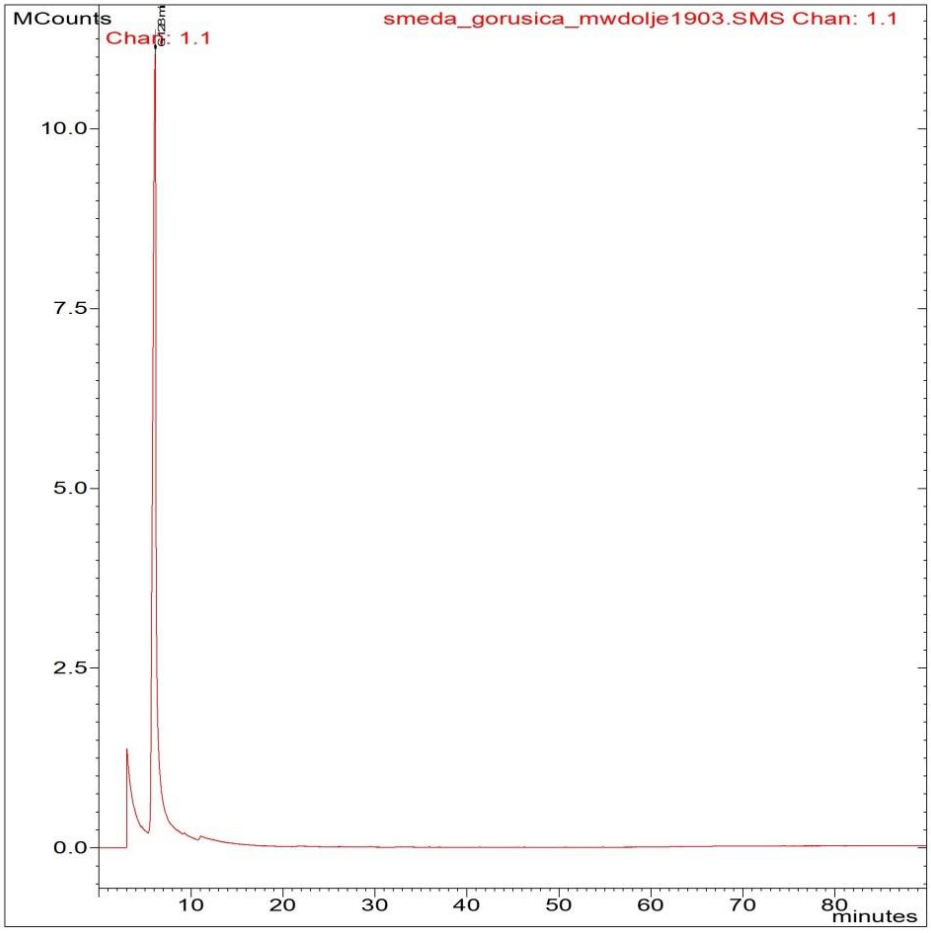
	Vrijeme / min	**Udio (%)**
Alil izotiocijanat	5,93	91,07
But-3-enil izotiocijanat	9,174	0,31
Feniletil izotiocijanat	31,591	6,81



Slika 14. Kromatogram eteričnog ulja smeđe gorušice

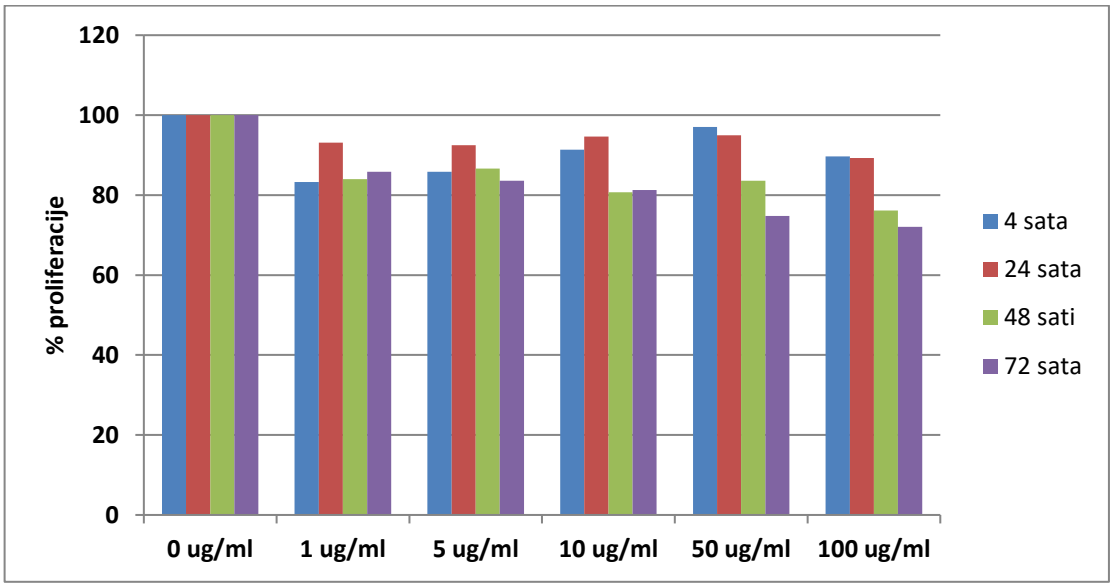
Tablica 7. . Razgradni produkti glukozinolata u smeđoj gorušici nakon mikrovalne ekstrakcije

	Vrijeme / min	**Udio (%)**
Alil izotiocijanat	5,93	99,01

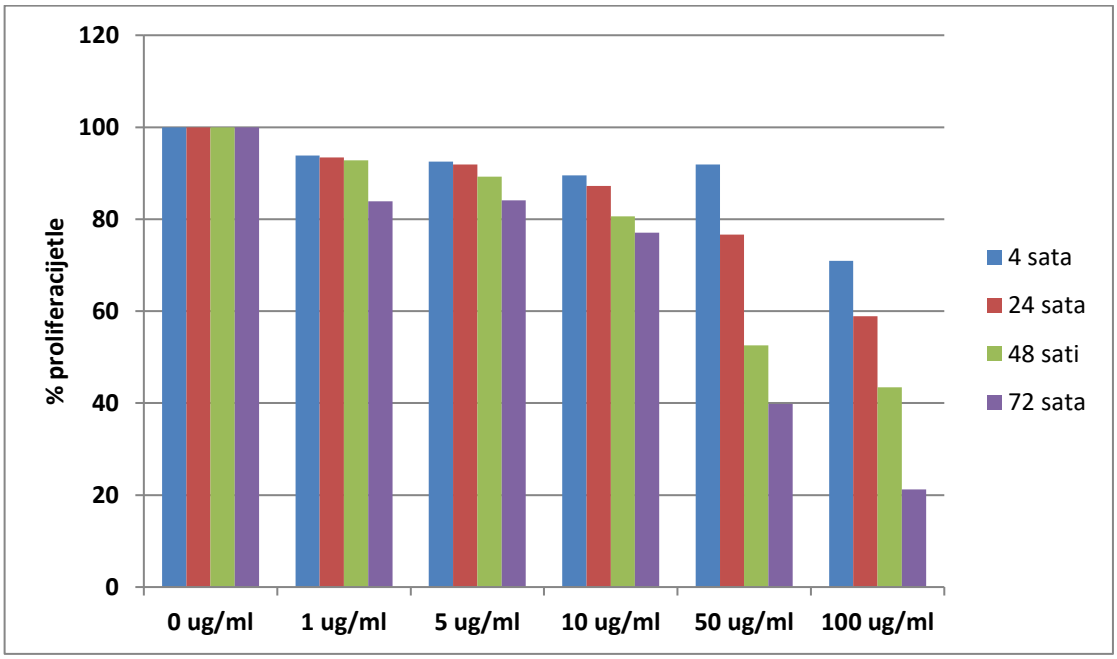


Slika 15. Kromatogram mikrovalnog ekstrakta smeđe gorušice

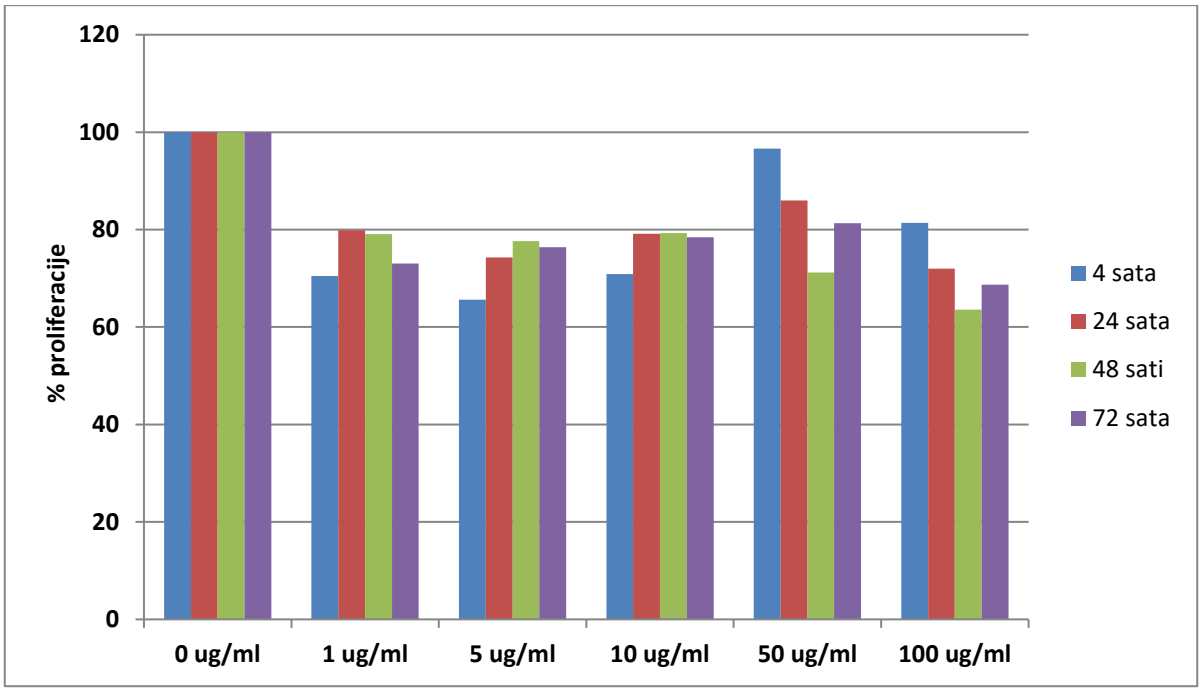
Rezultati testa citotoksične aktivnosti na stanične linije karcinom dojke MDA-MB-231:



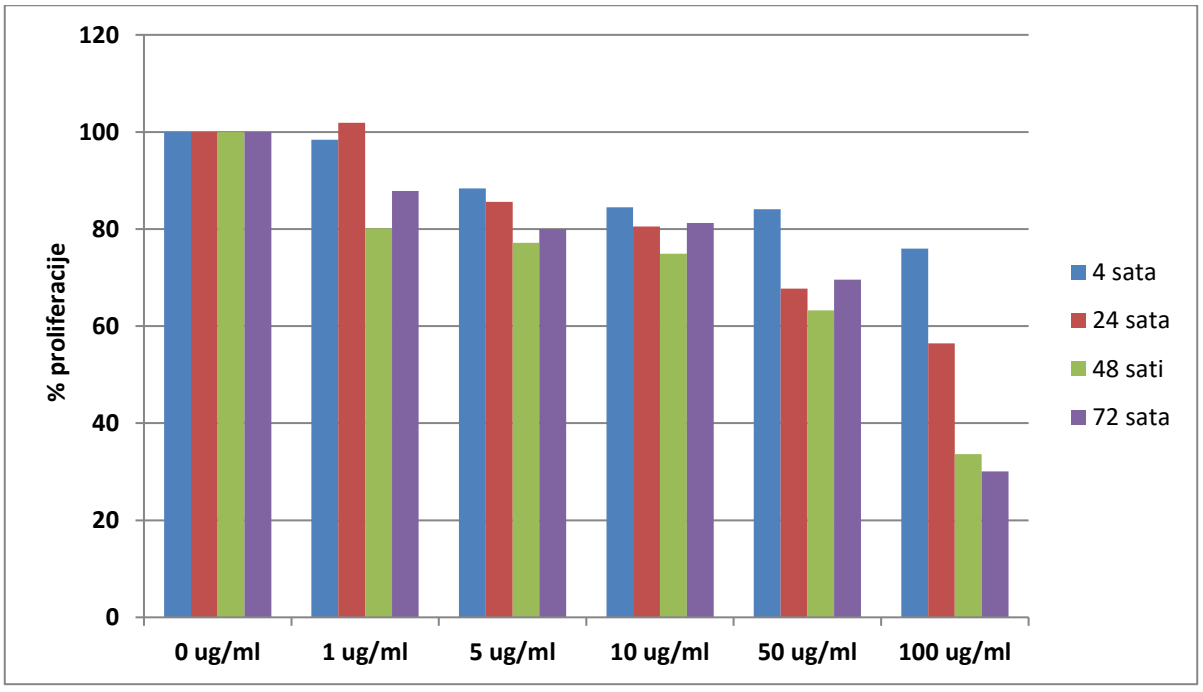
Slika 16. Citotoksični učinak eteričnog ulja crne gorušice



Slika 17. Citotoksični učinak ekstrakta crne gorušice

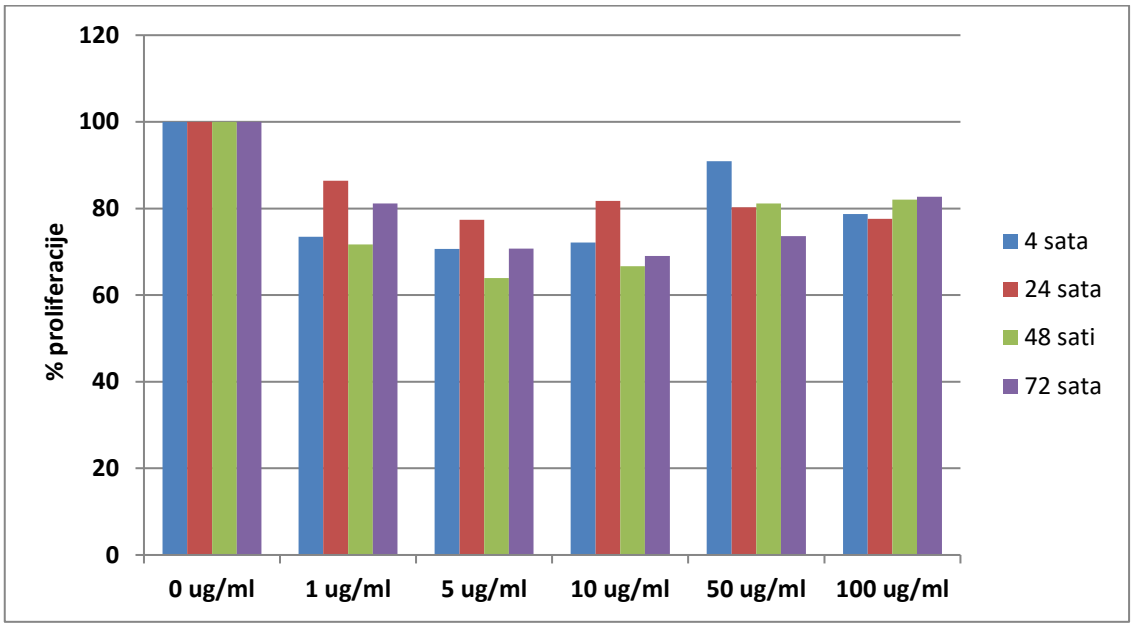


Slika 18. Citotoksičan učinak eteričnog ulja smeđe gorušice

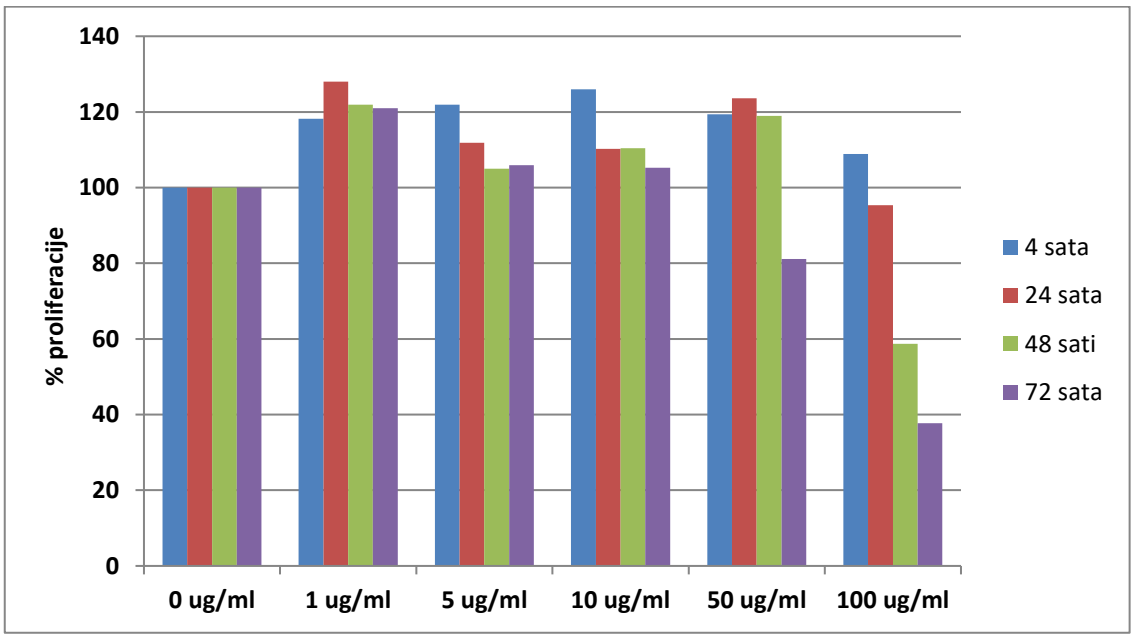


Slika 19. Citotoksičan učinka ekstrakta smeđe gorušice

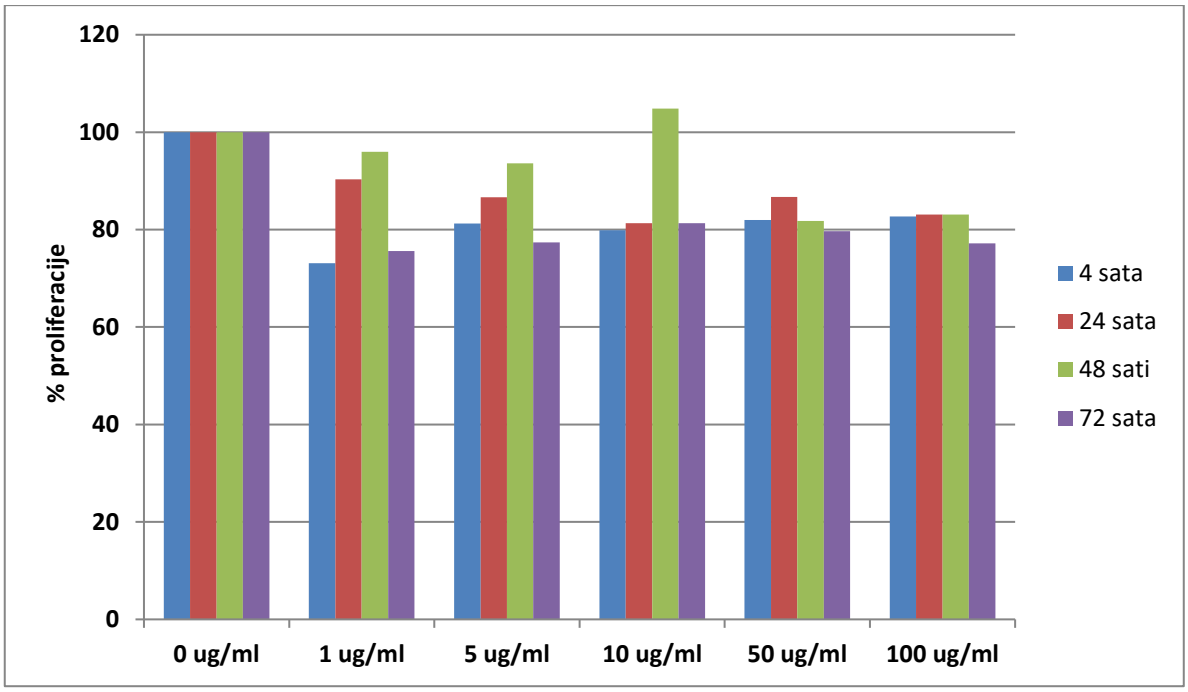
Rezultati testa citotoksične aktivnosti na stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura TCC-SUP:



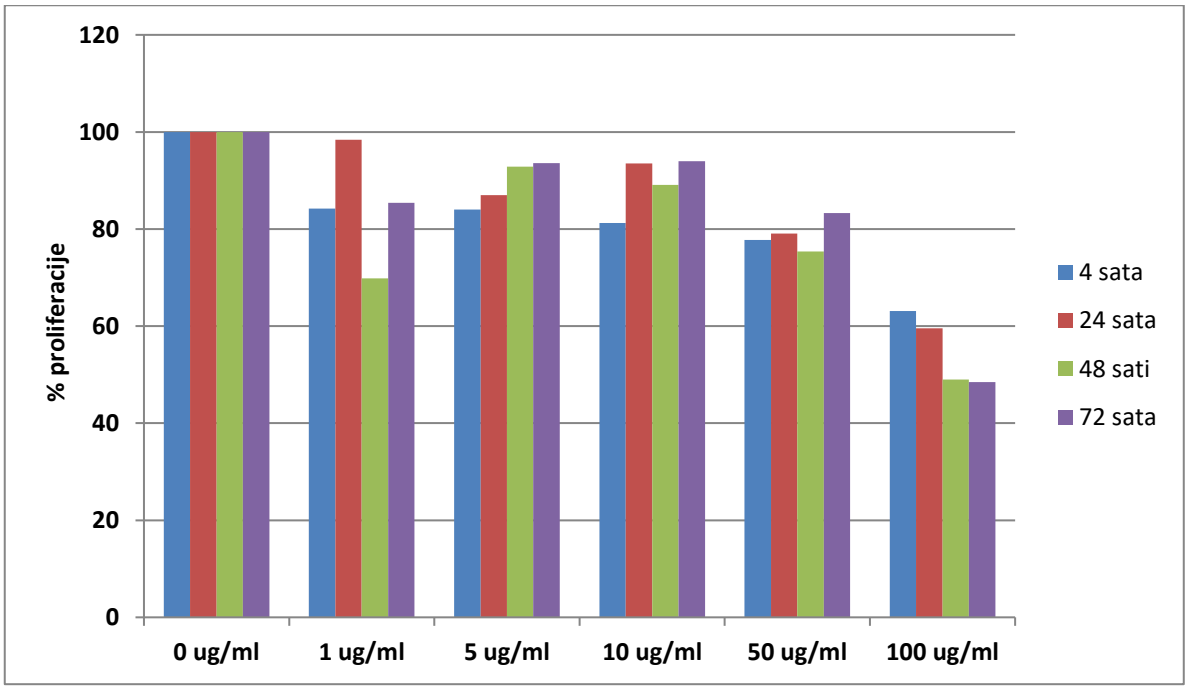
Slika 20. Citotoksičan učinak eteričnog ulja crne gorušice



Slika 21. Citotoksičan učinak ekstrakta crne gorušice



Slika 22. Citotoksičan učinak eteričnog ulja smeđe gorušice



Slika 23. Citotoksičan učinak ekstrakta smeđe gorušice

4. RASPRAVA

U ovom radu je istraživan antiproliferativan utjecaj mikrovalnih ekstrakata sjemena crne i smeđe gorušice na stanice raka dojke i mokraćnog mjehura. Nakon GC-MS analize dokazani su i određeni glavni hlapljivi spojevi u ekstraktima.

Ekstrakt crne gorušice dobiven mikrovalnom ekstrakcijom eteričnog ulja daje male prinose od samo 0,001 % od čega najveći postotak čini but-3-enil izotiocijanata (71,62 %) i nešto manjim udjelom alil izotiocijanat (16,51 %). U manjim količinama prisutni su i pent-4-enil izotiocijanat sa 2,01 % i feniletil izotiocijanat sa 1,03%. Na stanične linije karcinoma dojke destilat crne gorušice ostvaruje slab citotoksičan utjecaj, najveći nakon 72h inkubacije pri koncentraciji od 100 μg/ml 72 % proliferacije. Kod stanične linije karcinom mokraćnog mjehura ostvaruje bolji citotoksični utjecaj a maksimalni je čak pri koncentraciji od 5 μg/ml nakon 48h sa postotkom proliferacije od 63,94 %.

Ekstrakt crne gorušice dobiven mikrovalnom ekstrakcijom aroma daje veći prinos od 0,004 % te sadrži najviše but-3-enil izotiocijanata 2,2 %, nešto manje 4-5-epitiovaleronitrila oko 2,2% i najmanje alil izotiocijanata 1,9 %. Kod staničnih linija karcinoma dojke je dokazan slab citotoksičan utjecaj pri manjem vremenu inkubacije. Nakon dužeg vremena inhibije i pri većim koncentracijama citotoksična aktivnost psotaje bolja pa je tako nakon nakon 72h pri koncentraciji od 100 μg/ml zabilježen je postotak proliferacije od 21,2 %, pri koncentraciji od 50 μg/ml postotak je 39,78% dok je pri koncentraciji 1 μg/ml nakon 48h postotak proliferacije od 92,8 %, a pri 5 μg/ml nakon 48h postotak proliferacije 89 %. Neočekivani rast stanica je primijećen kod stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura, a maksimalni citotoksični utjecaj je ostvaren pri koncentraciji od 100 μg/ml nakon 72h inkubacije čak 37,7 %.

Postupkom mikrovalne ekstrakcije eteričnog ulja iz smeđe gorušice dobiven je mali prinos samo 0,001 % izolata koji sadrži čak 91,07% alil izotiocijanata, zatim slijedi feniletil izotiocijanat sa 6,81% te jako malo but-3-enil izotiocijanata sa 0,31%. Ostvaren je dobar citotoksični učinak kod staničnih linija karcinoma dojke, maksimalan nakon 48h pri koncentraciji od 100 μg/ml sa 63,56% proliferacije. Kod staničnih linija mokraćnog mjehura najbolji učinak je na koncentraciji od 1 μg/ml nakon 4h inkubacije gdje je postotak proliferacije 73,13 %.

Izolat dobiven mikovalnom ekstrakcijom aroma iz smeđe gorušice ima veći prinos u odnosu na ekstrakcije eteričnog ulja čak 0,003 %. Što se tiče hlapljivih biološki

aktivnih spojeva izolat sadrži najveću količinu alil izotiocijanata (99,01%). Kod staničnih linija karcinoma dojke je ostvaren dobar antiproliferativan učinak. Učinak je bolji nakon dužeg vremena inkubacije te pri većim koncentracijama, a maksimalan je nakon 72h na koncentraciji od 100μg/ml gdje je postotak proliferacije 30,078%. Dobar antiproliferativan učinak je zabilježen i kod stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura, maksimalan je također nakon 72h inkubacije na koncentraciji 100 μg/ml sa proliferacije 48,45%.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da crna i smeđa gorušica iz roda *Brassica* imaju povoljan utjecaj na zdravlje čovjeka. Rezultati su pokazali:

- sjeme crne i smeđe gorušice je izrazito bogato glukozinolatima
- mikrovalni ekstrakti sjemena crne i smeđe gorušice imaju dobar antiproliferativni utjecaj na stanične linije karcinoma dojke i mokraćnog mjehura
- izolat dobiven mikrovalnom ekstrakcijom aroma iz smeđe gorušice sadrži najveću količinu alil izotiocijanata te ostvaruje najbolje citotoksične utjecaje na stanične linije karcinoma
- destilat dobiven mikrovalnom ekstrakcijom eteričnog ulja iz smeđe gorušice također sadrži alil izotiocijanat u najvećoj količini i pokazuje dobar antiproliferativan utjecaj
- destilata iz crne gorušice imamo manje količine alil izotiocijanata, te su zabilježeni bolji rezultati kod karcinoma dojke
- izolat aroma iz sjemena crne gorušice sadrži male količine bioloških aktivnih spojeva te kod stanične linije karcinoma mokraćnog mjehura imamo neočekivan rast stanica, a dobar antiproliferativan učinak kod karcinoma dojke nakon dužeg vremena inkubacije i pri većim koncentracijama

6. LITERATURA

1. Šamec D. i Salopek-Sondi B., Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements, Cruciferous (Brassicaceae) Vegetables, 2019., str. 195-202

2. Plants of the World online, Royal Botanic Gardens, Kew (Internet) http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30000087-2 Datum pristupa: 8.9.2019.

3. Linus Pauling Institute. Oregon State University. Cruciferous Vegetables. 2018. (Internet) https://lpi.oregonstate.edu/mic/food-beverages/cruciferous-vegetables#introduction Datum pristupa: 8.9.2019.

4. Zekić M. , Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice *Brassicaceae.* Doktorski rad. Fakultet kemijskog inženjertva i tehnologije Zagreb, Zagreb 2013.

5. Blažević I. , Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice *Brassicaceae*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2009.

6. Thomas J. , Kuruvilla K. M., and Hrideek T. K., Mustard. U:Handbook of Herbs and Species, Peter K. V. Ured., Woodhead Publishing, Philadelphia, 2012., str. 388-398

7. https://www.val-znanje.com/index.php/ljekovite-biljke/986-crna-gorusica-senf-brassica-nigra-l-koch

8. https://farmashop.hr/trgovina/zacini/smeda-gorusica/

9. Vaidya B., Choe E., Effects of Seed Roasting on Tocopherols, Carotenoids and Oxidation in Mustard Seed Oil During Heating, J.Am.Oil Chem. Soc.2010; 88,

10. Abul-Fadl MM, El-Badry N. and Ammarr MS, Nutritional and Chemical Evaluation for Two Different Varieties of Mustard Seeds, WASJ 2011, 15 (9): 1225-1233

11. Inna E. Popova and Matthew J. Morra, Simultaneous Quantification of Sinigrin, Sinalbin and Anioic Glucosinolate Hydrolysis Products in Brassica juncea and Sinapis alba Seed Extracts Using Ion Chromatography, Journal of Agricultural and Food Chemistry, ACS Publications, 2014.

12. Mazumder A.,Dwivedi A., Jeanetta du Plessis, Sinigrin and Its Therapeutic Benefits, Moleculs, 2016.

13. https://www.plantea.com.hr/crna-gorusica/ Datum pristupa.8.9.2019.

14. Aguinagalde I., Flavonoids in Brassica nigra (L.) Koch, B. Oleracea L., B. Campestris L. and their natural amphidiploids, The Botanical Magazine Tokyo, 1988. 101 (1), str. 55-60

15. Muluye, A. B., Melese E., Adinew G. M., Antimalarial activity of 80% methanolic extract of Brassica nigra (L.) Koch (Brassicaceae) seeds against Plasmodium berghei infection in mice. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015. 15 (1)

16. Zhang Y., Tang L., Gonzalez V., Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells, Molecular Cancer Therapeutics, AACR Journals, 2003.

17. Veeranke O. L., Bhattacharya A., Tang L., Marshall J. R., Zhang Y., Cruciferous Vegetables, Isothiocyanates and Prevention of Bladder Cancer, Current Pharmacology Reports, Volume 1, Issuse 4, 2015. str. 277-282

18. Linus Pauling Institute. Oregon State University. Isotyocianates 2018. https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/isothiocyanates Datum pristupa: 24.9.2019.

19. Blekić M., Režek Jambrak A., Chemat F., Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Croatian Journal of Food Science and Technology, 2011; 3(1):32-47

20. Tatke P., Jaiswal Y. An Overview of Microwave Assisted Extraction and its Application in Herbal Drug Research, Research Journal of Medicinal Plants, 2011;5(1):21-31

21. Sedlar A., Izolacija i identifikacija hlapljivih sumporovih spojeva odabranih biljaka porodice Brassicaceae, diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, Hrvatska, 2017.

22. http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm

23. Katičić M., Citotoksično djelovanje Lepidium spp. na različite staniččne linije humanih karcinoma mjereno MTT metodom, diplomski rad Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet, Split, Hrvatska, 2018.