

Određivanje ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti dodataka prehrani koji sadrže soju

Brletić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:180165>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

IVA BRLETIĆ

ZAGREB, 2021.

Iva Brletić

**Određivanje ukupnih polifenola i
antioksidativne aktivnosti dodataka prehrani
koji sadrže soju**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Daniele Amidžić Klarić, mag.pharm., spec. klin. farmacije.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Danieli Amidžić Klarić na prenesenom znanju, trudu i utrošenom vremenu tijekom izrade diplomskog rada.

Također zahvaljujem i prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na pruženoj prilici izrade diplomskog rada u okviru kolegija Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda.

Velika hvala svima koji su bili uz mene, pružali mi podršku tijekom studiranja i cijelog života te ga činili ljepšim i sretnijim.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. POLIFENOLI.....	2
1.2. FITOESTRGENI.....	3
1.2.1 Fitoestrogeni u soji	5
1.3. METODE ZA ODREĐIVANJE POLIFENOLNIH SASTAVNICA.....	6
1.4. ANTIOKSIDANSI.....	7
1.4.1. Oksidativni stres	7
1.4.2. Podjela antioksidansa	8
1.5. METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	9
1.5.1. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti <i>in vitro</i>	9
1.5.2. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti <i>in vivo</i>	11
1.6. DPPH.....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Uzorci	17
3.1.2. Kemikalije i reagensi	17
3.1.3. Radni instrumenti	17
3.1.4. Pribor i posuđe.....	19
3.1.5. Programski paketi	19
3.2. METODE	19
3.2.1. Priprema uzoraka.....	19
3.2.2. Postupak ekstrakcije	19
3.2.3. Priprema standardnih i radnih otopina.....	20
3.2.4. Određivanje ukupnog sadržaja polifenola	20
3.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti	20
3.3. STATISTIČKE METODE.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. UKUPNI SADRŽAJ POLIFENOLA U DODACIMA PREHRANI KOJI SADRŽE SOJU	23

4.2. ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE DODATAKA PREHRANI KOJI SADRŽE SOJU	25
5. ZAKLJUČAK.....	29
6. LITERATURA	31
7. SAŽETAK/SUMMARY	36
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. POLIFENOLI

Polifenoli su sekundarni metaboliti koje proizvode mnoge biljke. Ova velika i heterogena skupina spojeva može se podijeliti s obzirom na broj fenolnih prstena koje sadrže i strukturne elemente koji povezuju te prstene na: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (Manach i sur., 2004).

Fenolne kiseline su derivati benzojeve i cimetine kiseline poput kumarinske, kavene, ferulične, salicilne, galne i vanilne kiseline. Flavonoidi se sastoje od dva aromatska prstena povezana mostom od tri ugljikova atoma koja tvore oksigenirani heterocikl, a glavne skupine su: flavoni, izoflavoni, flavanoni, flavani, flavononi i antocijanidini. Lignani su difenoli koji ostvaruju učinak na ljudsko tijelo kada se metaboliziraju pomoću bakterija u crijevima do enterodiola i enterolaktona. Osnovu strukture stilbena čine dvije fenolne skupine povezane etenom. Najpoznatiji stilben je resveratrol (Amarowicz i Pegg, 2019).

Polifenoli su široko zastupljeni u biljnim vrstama, a nalaze se u raznom voću, povrću, žitaricama, kavi, čaju, vinu. Neki od primjera namirnica s visokim sadržajem polifenola su prikazani u Tablici 1. Ove biološki aktivne sastavnice mogu biti u obliku aglikona, ali češće su prisutni kao glikozidi, esteri i polimeri.

Tablica 1. Primjeri zastupljenosti polifenola u hrani (Amarowicz i Pegg, 2019; Manach i sur., 2004)

Polifenoli	Hrana
Fenole kiseline	bobičasto voće, kivi, patlidžan, artičoka, kava, trešnja, šljiva, jabuka, pšenično, rižino i zobeno brašno
Flavonoidi	bobičasto voće, soja, čokolada, luk, peršin, sok od naranče, limuna, grožđa, crni i zeleni čaj, brokula, poriluk, šljiva, rajčica
Lignani	sjemenke lana i sezama
Stilbeni	bobičasto voće, grožđe i crno vino, kikiriki

Na količinu polifenola u biljnim vrstama utječu okolišni čimbenici kao što su vrsta tla, izloženost suncu, količina padalina, zatim uvjeti skladištenja gdje najčešća dolazi do pojave oksidacije polifenola te sama priprema namirnica poput kuhanja, guljenja kore, mljevenja i drugih (Manach i sur., 2004).

Polifenoli postaju sve zanimljiviji za istraživanje kako se otkrivaju razni pozitivni učinci na ljudsko zdravlje. Najistaknutija je njihova antioksidativna aktivnost, ali i brojna druga

djelovanja: protuupalno, antibakterijsko, antivirusno, hepatoprotektivno, zatim indukcija apoptoze tumorskih stanica, smanjenje rizika razvoja hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti te inhibicija enzima acetilkolinesteraze što je važno kod liječenja Parkinsonove i Alzheimerove bolesti (Amarowicz i Pegg, 2019).

1.2. FITOESTRGENI

Fitoestrogeni su nesteroidni polifenolni spojevi biljnog podrijetla. Zastupljeni su u voću (šljive, jabuke, bobičasto voće), povrću (soja, hmelj, grah), žitaricama (lan), vinu, čaju (crni i zeleni), a uključuju izoflavonoide (glicitein, genistein, daidzein), stilbene (resveratrol), kumestane (kumestrol) i lignane (sekoizolaricirezinol i mediorezinol) (Buhač i sur., 2020; Bacciottini i sur., 2007). Ove biološki aktivne tvari oponašaju djelovanje endogenog estrogena jer imaju sposobnost vezanja na estrogenske receptore α i β koji se nalaze ne samo u stanicama reproduktivnog sustava, već i u raznim drugim organskim sustavima. Nakon vezanja supstrata na receptor, dolazi do migracije tog kompleksa iz citoplazme u staničnu jezgru te receptori formiraju dimere. Zatim djeluju na regulatorne regije gena i induciraju ili inhibiraju transkripciju određenih gena. Koliko estrogen ima raznih uloga u organizmu (Slika 1.), vidljivo je nastupom menopauze kada mu se naglo smanjuje proizvodnja (Sirotkin, 2014). Tada dolazi do osteoporoze jer se mijenja brzina resorpcije kosti te se više kalcija otpušta u plazmu. U dostupnoj stručnoj i znanstvenoj literaturi (Sirotkin, 2014; Cornwell i sur. 2004) opisana su istraživanja koja pokazuju kako fitoestrogeni smanjuju gubitak gustoće kosti, ali i ona koja pak smatraju kako fitoestrogeni nemaju značajnijeg utjecaja.

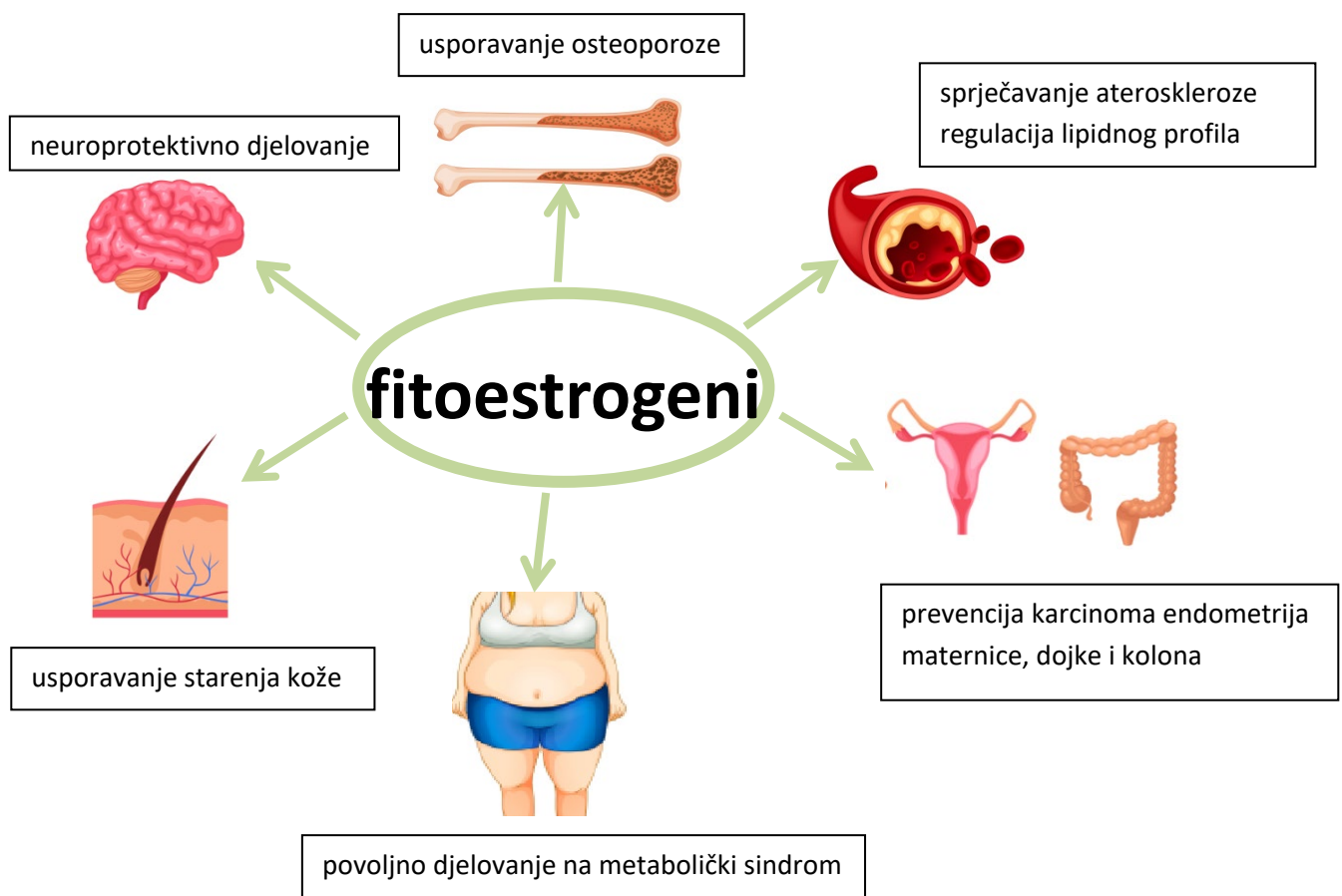
Slično je i kod kardiovaskularnih bolesti koje se također javljaju u menopauzi. U studijama kada je povećana konzumacija fitoestrogena imala učinka, zaključeno je da se temelji na djelovanju na endotelne stanice i stanice glatkih mišića krvnih žila, sprječavanju nastanka ateroskleroze te utjecaju na lipidni profil što uključuje smanjenje koncentracije LDL kolesterola i povećanje koncentracije HDL-a. U literaturi je dobro dokumentiran takozvani „francuski paradoks“ gdje se opisuje kako Francuzi unatoč prehrani bogatoj zasićenim masnim kiselinama rjeđe obolijevaju od kardiovaskularnih bolesti, a vjeruje se da je tome tako zbog veće konzumacije crnog vina (Sirotkin, 2014; Cornwell i sur., 2004).

U postmenopauzi se javljaju karcinomi endometrija maternice, dojke i kolona. U dostupnoj literaturi navodi se da je za djelovanja fitoestrogena u prevenciji karcinoma važno njihovo antioksidativno djelovanje, sprječavanje mutacija DNA, proliferacija stanica i vaskularizacija te proapoptički učinak. Također je uočeno smanjeno izlučivanje genotoksičnih metabolita

estrogena u urinu (Sirotkin, 2014; Cornwell i sur., 2004). Osim toga navodi se i povećanje učinkovitosti te sprječavanje nastajanja nuspojava uslijed kemoterapije i terapije zračenjem (Beszterda i Frański, 2020). No s druge strane, i dalje se sumnja u dobrobit fitoestrogena jer pojedina istraživanja pokazuju kako čak mogu potaknuti nastanak karcinoma (Cornwell i sur., 2004).

Padom koncentracije estrogena u tijelu dolazi i do ubrzanog starenja kože, odnosno koža postaje tanja, dolazi do gubitka elastičnosti, pojavljuju se bore, te pigmentacijske promjene i karcinom kože. Fitoestrogeni posjeduju razne mehanizme kojima usporavaju te promjene pa tako djelujući preko estrogenskih receptora, potiču sintezu hijaluronske kiseline i kolagena, potiču vaskularizaciju te štite od oksidativnog stresa (Sirotkin, 2014).

Postoji mogućnost da fitoestrogeni djeluju i na kognitivne sposobnosti pa i na sprječavanje razvoja Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Jedan od mehanizama kojim djeluju je i neizostavljivi antioksidativni učinak kojim se štite neuroni (Sirotkin, 2014; Cornwell i sur., 2004).



Slika 1. Potencijalni povoljni učinci fitoestrogena na organizam (prilagođeno <http://www.freepik.com>)

Također se fitoestrogeni vežu i uz terapiju nekih metaboličkih poremećaja primjerice pretilosti i dijabetesa tipa 2 utječući na upalne procese vezane uz adipocite i inzulinsku rezistenciju te zaštitu β Langerhansovih stanica gušterače od oksidativnog stresa i apoptoze (Sirotkin, 2014).

1.2.1 Fitoestrogeni u soji

Soja (*Glycine max* (L.) Merr, *Fabaceae*) sadrži izoflavone genistein, daidzein i glicitein, najviše u obliku β -glukozida, 6-O-malonil-glukozida i 6-O-acetil-glukozida, ali mogu se naći i sami aglikoni (Bursać i sur., 2017). Također, soja sadrži manje količine lignana sekoizolaricirezinola koji se u ljudskom organizmu pretvara u enterodiol i enterolakton s estrogenim djelovanjem (Cornwell i sur., 2004).

Razni čimbenici utječu na sadržaj izoflavona u soji, poput mjesta uzgoja, količine padalina, temperature te samog varijeteta soje. U dosadašnjim istraživanjima uočeno je da se veće količine izoflavona nalaze u genetski modificiranoj soji. Zatim se nametnulo pitanje utjecaja boje ovojnice sjemenke soje na sastav izoflavona. U provedenim istraživanjima analiziran je sastav uzoraka soje različite boje ovojnice (žuta, zelena, oker, crvenkasta, smeđa i crna) te je utvrđeno da nema značajnije razlike u koncentraciji ukupnih izoflavona te da u svakom uzorku ima najviše daidzeina, zatim genisteina i najmanje gliciteina. Ipak, treba istaknuti kako su dosadašnja istraživanja pokazala da soja sa crnom ovojnicom posjeduje više ukupnih polifenola te veću antioksidativnu aktivnost, ali ona može biti posljedica i nekih drugih sastavnica koje se također nalaze u soji, poput tokoferola, vitamina C, peptida, lecitina, saponina i sterola (Bursać i sur., 2017; Kumar i sur., 2010).

Na sadržaj izoflavona utječe način pripreme soje poput fermentacije, kuhanja, prženja i sušenja. U navedenim procesima dolazi do promjene strukture izoflavona iz jednog oblika u drugi, ali i do smanjenja njihove ukupne koncentracije na povišenim temperaturama i uslijed reakcija oksidacije. Nadalje, uočene su snižene vrijednosti malonil- β -glukozida i acetil- β -glukozida, dok su vrijednosti β -glukozida i aglikona više. Navedena promjena utječe na antioksidativnu aktivnost jer je kod β -glukozida ona veća. Osim toga utječe i na inhibiciju α -glukozidaze korisne kod smanjenja postprandijalne koncentracije glukoze u osoba oboljelih od dijabetesa, koja je učinkovitija uz prisutstvo većeg udjela aglikona (Niamnuy i sur., 2011). U tradicionalnoj azijskoj kuhinji konzumira se puno više soje nego na Zapadu. Epidemiološke studije su uočile kako Azijatkinje imaju niže stope oboljelih od karcinoma koji se javljaju u

postmenopauzi te bolje kognitivne sposobnosti pa se soja sve više primjenjuje u obliku dodatka prehrani kod simptoma menopauze (Sirotkin, 2014; Cornwell i sur., 2004).

1.3. METODE ZA ODREĐIVANJE POLIFENOLNIH SASTAVNICA

Dodaci prehrani su pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom koji imaju svrhu dodatno obogatiti uobičajenu prehranu u cilju održavanja zdravlja (Narodne novine, 76; 2013). Stoga je važno odrediti sadržaj dodataka prehrani te ih pravilno standardizirati kako bi se lakše provodila kontrola kvalitete. Na taj način najvažnije je osigurati sigurnost dodataka prehrani i pozitivan učinak na ljudsko zdravlje (Mornar i sur., 2020).

Pregledom dostupne literature uočeno je kako postoji niz različitih metoda kojima se određuje ukupan sadržaj polifenola te isto tako veliki broj metoda kojima se određuje koncentracija pojedinačnih polifenolnih sastavnica.

Jedna od najčešće primjenjivanih metoda za određivanje ukupnog sadržaj polifenola je spektrofotometrijska metoda uz korištenje Folin-Ciocalteu reagensa. U uzorak se dodaje navedeni reagens te se odvija redoks reakcija. Polifenoli se oksidiraju, a molibden i volfram iz reagensa se reduciraju pri čemu nastaje plavo obojenje. Reakcija se brže odvija u lužnatom mediju, a kao standard se koristi cijeli niz različitih flavonoida i fenolnih kiselina poput galne kiseline te se rezultati izražavaju kao ekvivalent korištenog standarda (Agbor i sur., 2014; Yusnawan i sur., 2014).

Za određivanje koncentracije pojedinačnih polifenolnih sastavnica najčešće se koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Sastavnice iz uzorka se odjeljuju u koloni zbog različitog afiniteta prema stacionarnoj fazi i tekućoj mobilnoj fazi. Također se koristi i tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) koja ima sitnije čestice stacionarne faze. Navedena analiza se odvija pri višem tlaku u kraćem vremenu, a razlučivost time nije ugrožena. Kao detektori se koriste UV, DAD (detektor s nizom dioda, engl. *Diode Array Detector*) i maseni detektor (MS, engl. *mass spectrometer*), pri čemu je pokazano da je maseni detektor selektivniji i osjetljiviji.

Budući da je u današnje vrijeme vrlo bitno koliko je vremena potrebno utrošiti na analizu, a također se vodi računa i na ekološki aspekt, potvrđena je mogućnost primjene tandemске masene spektrometrije izravnim injektiranjem u rutinskim analizama. Ipak, pokazalo se kako se takvim analizama ne mogu identificirati sastavnice u tako niskim koncentracijama kao kad se provodi analiza zajedno s tekućinskom kromatografijom te može doći do problema u

vidljivosti fragmentacije pojedinih iona niskih koncentracija, pogotovo u onim pripravcima s više biljnih vrsta.

Također se kao učinkovite metode u određivanju polifenolnih sastavnica navode plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography*, GC), ali nije uobičajeno njeno provođenje zbog potrebne derivatizacije uzorka prije same kromatografije te voltimetrija zbog svoje jednostavnosti, osjetljivosti i relativno povoljne cijene (Buhač i sur., 2020; Mornar i sur.; 2020).

1.4. ANTIOKSIDANSI

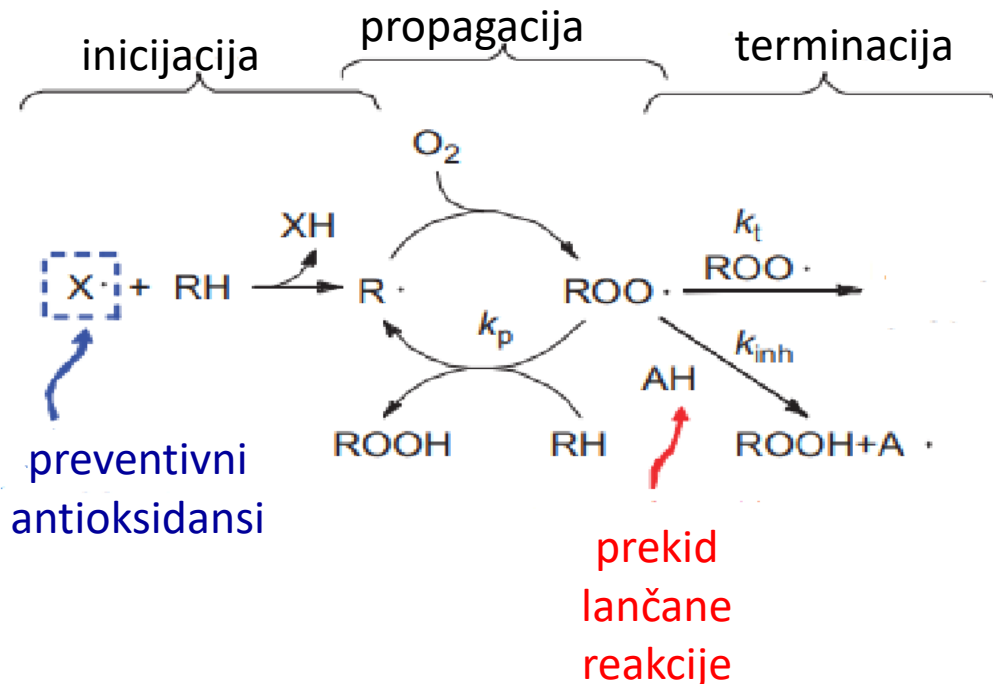
Antioksidansi su tvari koje imaju sposobnost zaštiti molekule na način da odgode, uspore ili inhibiraju njihovu oksidaciju. Uloga antioksidansa u stanici je vrlo važna jer ako je stanica duže vremena izložena oksidativnom stresu, dolazi do razvoja niza bolesti poput karcinoma, kardiovaskularnih, degenerativnih i drugih bolesti. Stanice imaju endogene antioksidativne mehanizme kao što su enzimi superoksid dismutaze, glutathion peroksidaze, katalaze. Treba istaknuti kako je važan i unos antioksidansa iz hrane kao što su vitamin C, vitamin E, karotenoidi i polifenoli (Amorati i Valgimigli, 2015).

1.4.1. Oksidativni stres

Oksidativni stres je neravnoteža između reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i staničnih antioksidativnih mehanizama uslijed njihove preniske koncentracije ili premale aktivnosti (Ruskovska i sur.; 2020). Slobodni radikali su nestabilne molekule koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona, a mogu se pojaviti u stanici iz niza razloga, unutarnjih i vanjskih. Endogeno generirani radikali nastaju tijekom procesa sinteze ATP-a u mitohondrijima, tijekom upala, u fagocitima pomažući u borbi protiv fagocitiranog sadržaja, tijekom vježbanja, dok su izvori egzogenih radikala: dim cigarete, UV zračenje, zagađen zrak, konzumacija polinezasićenih masnih kiselina. Najčešći slobodni radikali su superoksidni radikal, lipidni peroksilni radikal, hidroksilni radikal, radikal dušikovog monoksida (Fürst, 1996).

Brojne molekule u stanicama poput proteina, ugljikohidrata, lipida, nukleinskih kiselina (RH) podliježu autooksidaciji, neizbježnoj pojavi u aerobnim uvjetima. Za pokretanje te lančane reakcije odgovorni su slobodni radikali (X^{\bullet}). Tako nastaju alkil radikali (R^{\bullet}) koji dalje reagiraju s molekulskim kisikom te nastaje peroksil radikal (ROO^{\bullet}). Iduća reakcija, peroksil radikala i još jedne molekule supstrata, rezultira hidroperoksidom ($ROOH^{\bullet}$) i slobodnim

radikalom. Time se zatvara krug i reakcije se ponavljaju dok se slučajno ne susretnu dva radikala te ne nastanu neradikalni produkti ili se antioksidativnim mehanizmima ne vrati ravnoteža u stanicu (Amorati i Valgimigli, 2015). Opisane reakcije autooksidacije su prikazane na Slici 2.



Slika 2. Prikaz autooksidacije (prilagođeno Amorati i Valgimigli, 2015)

1.4.2. Podjela antioksidansa

Antioksidansi se mogu podijeliti s obzirom na način kako štite stanicu na izravne, tj. primarne i neizravne tj. sekundarne antioksidanse.

Izravni (primarni) antioksidansi djeluju na inicijaciju i propagaciju autooksidacije. Preventivni antioksidansi poput superoksid dismutaze, glutation peroksidaze, katalaze i metalnih kelatora sprječavaju nastanak slobodnih radikala. Superoksid dismutaza odstranjuje superoksidne radikale, a pritom nastaje vodikov peroksid kojeg glutation peroksidaza i katalaza razgrađuju i sprječavaju mogućnost nastanka hidroksilnog radikala. Kelatori metala čuvaju ione metala u oksidiranom stanju što je važno jer kada su u reduciranom stanju sudjeluju u reakciji nastanka hidroksilnih radikala. Zatim, antioksidansi prekidaju lančane reakcije autooksidacije natječući se s reaktantima te stvaraju produkte koji više ne mogu sudjelovati u tim štetnim reakcijama. Primjer antioksidansa koji djeluju na ovaj način su

polifenoli, a svaki može reagirati s više peroksilnih radikala (Amorati i Valgimigli, 2015; Fürst, 1996).

Primarni antioksidansi mogu donirati vodikov atom (engl. *hydrogen-atom transfer*, HAT) ili elektron (engl. *single-electron transfer*, SET) radikalima, a ta dva mehanizma se mogu odvijati i istovremeno (engl. *proton-loss electron transfer*, SPLET ili engl. *proton-coupled electron transfer*, PCET) (Amarowicz i Pegg, 2019).

Neizravni (sekundarni) antioksidansi ne djeluju na samu autooksidaciju već na prooksidanse ili poput izotiocijanata potiču ekspresiju antioksidativnih enzima (Amorati i Valgimigli, 2015).

Antioksidansi se također mogu podijeliti i prema tome jesu li topljivi u vodi odnosno mastima, a time se razlikuje i mjesto njihovog djelovanja. Lipofilni antioksidansi su vitamin E, β -karoten i polifenoli. Oni prekidaju lančanu reakciju lipidne peroksidacije, odnosno nestaje lipidni peroksilni radikal i reaktivni aldehidi koji nastaju iz lipidnih peroksilnih radikala. Najpoznatiji antioksidans topljiv u vodi je vitamin C. Osim što reagira s peroksilnim radikalima, regenerira i vitamin E, odnosno α -tokoferol radikal u oblik hidrokinona kako bi dalje mogao obavljati svoju zadaću u zaštiti stanice (Ruskovska i sur., 2020).

1.5. METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

U prethodnom poglavlju je objašnjeno koliko su antioksidansi važni za funkcioniranje ljudskog organizma pa je bitno okarakterizirati i metode određivanja antioksidativne aktivnosti. Na temelju dostupne literature mogu se podijeliti na metode koje se odvijaju u *in vitro* i u *in vivo* uvjetima.

1.5.1. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti *in vitro*

Ove metode koriste se za ispitivanje sposobnosti antioksidansa u sprječavanju spontano inicirane autooksidacije ili autooksidacije potaknute raznim pokretačima poput iona željeza i bakra. Supstrati koji se oksidiraju mogu biti prirodni ili sintetski spojevi, a mjeri se utrošak kisika potreban za oksidaciju ili količina produkata nastalih tom oksidacijom. Na početku je autooksidacija inhibirana antioksidansom te ne nastaju produkti autooksidacije, a nakon određenog vremena se povećava potrošnja kisika i pojavljuju se produkti autooksidacije. Ti produkti se mogu kvantificirati na više načina, peroksil radikali primjenom LC-MS i GC metoda, hidroperoksidi jodometrijom, spektrofotometrijom, HPLC-UV metodom, zatim malonil aldehyd, koji nastaje tijekom lipidne peroksidacije, zajedno s 2-tiobarbiturnom

kiselinom tvori ružičasti kompleks te se mjeri njegova fluorescencija (Amorati i Valgimigli, 2015).

Druga skupina metoda temelji se na principu da antioksidansi sprječavaju peroksil radikale u procesu oksidacije supstrata. Koristi se ORAC metoda (engl. *oxygen-radical antioxidant capacity*) gdje se mjeri intenzitet fluorescencije supstrata jer antioksidans sprječava gašenje fluorescencije reagirajući s peroksil radikalima te onemogućujući im oksidaciju supstrata. Također treba istaknuti iduću metodu koja koristi svojstvo apsorpcije β -karotena narančaste boje gdje antioksidansi opet ne dopuštaju oksidaciju radikalima nastalim lipidnom peroksidacijom linoleinske kiseline te ne dolazi do smanjenja apsorpcije. Nadalje, poznata je i metoda s luminolom koji proizvodi plavu luminiscenciju nakon niza reakcija koje započinju djelovanjem peroksil radikala. U prisutstvu antioksidansa luminiscencija je ugašena.

Iduća skupina su indirektna spektrometrijske metode kod kojih je glavna značajka promjena boje uslijed redukcije radikala iz supstrata u prisustvu antioksidansa. Oksidansi u supstratu mogu biti organski ili anorganski. Koristi se DPPH metoda, odnosno redukcija DPPH radikala, zatim ABTS metoda gdje u prisutstvu antioksidansa nestaje $ABTS^{•+}$ kationski radikal. Od anorganskih oksidansa se koriste željezo i bakar. Metoda koja uključuje redukciju željeza iz Fe^{3+} u Fe^{2+} je FRAP metoda (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), a bakra iz Cu^{2+} u Cu^{+} je CUPRAC metoda (engl. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*). Ove metode se primjenjuju u početnim stadijima istraživanja (Amarowicz i Pegg, 2019; Amorati i Valgimigli, 2015). Pregled navedenih metoda se nalazi u Tablici 2.

Tablica 2. Pregled *in vitro* metoda određivanja antioksidativne aktivnosti

Metoda	Mjerni parametar
inhibicija autooksidacije	potrošnja kisika, koncentracija peroksil radikala, koncentracija hidroperoksida, koncentracija malonil aldehida
ORAC metoda	intenzitet fluorescencije supstrata
metoda s β -karotenom	apsorbancija β -karotena narančaste boje
metoda s luminolom	plava luminiscencija oksidiranog luminola
DPPH metoda	apsorbancija DPPH radikala ljubičaste boje
ABTS metoda	apsorbancija ABTS ⁺ zelene boje
FRAP metoda	apsorbancija Fe ²⁺ - TPTZ plave boje
CUPRAC metoda	apsorbancija Cu ⁺ - (NC ₂) plave boje

Istraživanja se mogu provoditi i na kulturama primarnih životinjskih ili humanih stanica te staničnih linija jetre, crijeva i eritrocita. Ova vrsta istraživanja je vrlo zahtjevna jer se nakon odabira reprezentativne vrste stanica, mora voditi računa i o uvjetima uzgoja. Stanice se izlažu oksidativnom stresu te se prati njihov odgovor u prisutnosti antioksidansa i bez njega. Rezultati se mogu dobiti na razne načine, provedbom kolorimetrijskog MTT testa, mjerenjem intenziteta fluorescencije 2', 7'-diklorofluoresceina, fluorofora BODIPY-a, koncentracije nitroksida u stanicama te prisutnosti raznih markera oksidativnog oštećenja (izoprostani, aldehidi) i oštećenja DNA (Amorati i Valgimigli, 2015).

1.5.2. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti *in vivo*

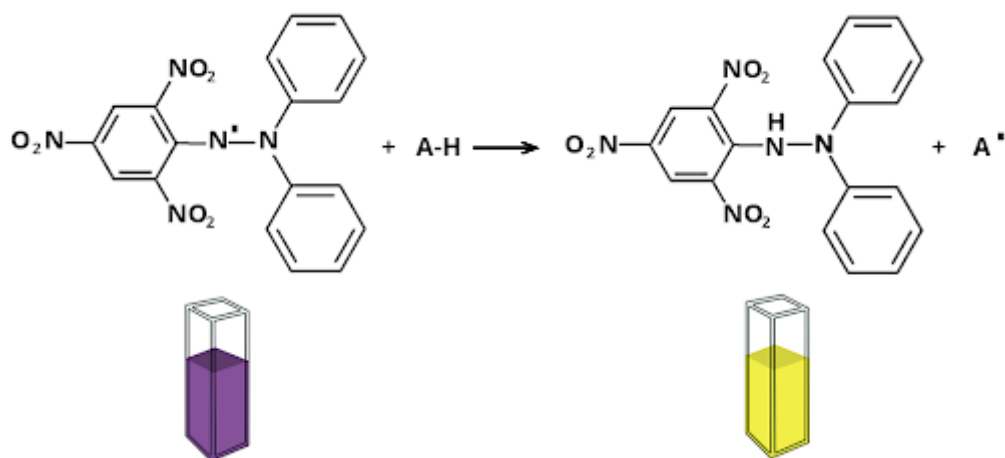
Ako potencijalni antioksidans koji se istražuje ima sposobnost redukcije spojeva u *in vitro* uvjetima, ne znači da će zasigurno obavljati antioksidativnu ulogu i u organizmu, a postoje i slučajevi gdje je antioksidativna aktivnost veća. Stoga su se počele razvijati metode određivanja antioksidativne aktivnosti *in vivo*.

Prva prepreka na koju se nailazi, kao i kod brojnih drugih tvari i spojeva koji se unose u organizam, je mogućnost apsorpcije i bioraspoloživost, zatim slijede distribucija, metaboličke transformacije i međusobne interakcije spojeva.

Kako bi se dobio uvid u antioksidativni status, mjeri se antioksidativni kapacitet plazme (engl. *Plasma Antioxidant Capacity*, PAC) koji obuhvaća sve antioksidativne aktivnosti, kako endogene mehanizme tako i ulogu antioksidansa unesenih hranom, ali i njihovo nadopunjavanje u djelovanju protiv oksidacijskog stresa što nije moguće ispitivati u *in vitro* uvjetima. Istraživanja se provode tako da ispitanici unose određenu vrstu i količinu hrane za koju se smatra da je bogata antioksidansima te se mjeri PAC na samom početku, prije unosa hrane i na kraju ispitivanja nekom od metoda iz prethodnog poglavlja. Na temelju dobivenih podataka se računa povećanje vrijednosti te određuje kolika je apsorpcija unesenih tvari. Također je zanimljivo da se neke molekule velike molekulske mase poput polifenola ne mogu odmah apsorbirati, već ih crijevna mikroflora razgrađuje na manje molekule te onda one djeluju antioksidativno. Osim toga, uočeno je i da endogeni antioksidans glutation obnavlja oksidirani oblik vitamina C, a vitamin C onda može reciklirati oksidirani oblik vitamina E (Fernandez-Pachon, 2008).

1.6. DPPH

DPPH metoda koristi stabilan slobodan radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) koji u reakciji s antioksidansom prelazi u reducirani oblik 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin (DPPH-H). Reakcija je prikazana na Slici 2. Metodu je prvi opisao Marsden Blois 1958. godine. Ova metoda je spektrofotometrijska jer dok je DPPH u obliku radikala, odnosno dok ima nespareni elektron, apsorbira pri valnim duljinama od 515 do 520 nm (ljubičasto), a kako se reducira, tako postaje blijedo žut. Mehanizam reakcije uključuje prijenos elektrona (SET) s antioksidansa na DPPH radikal i prijenos vodikovog atoma (HAT) (Kedare i Singh, 2011).



Slika 3. Reakcija DPPH radikala s antioksidansom (prilagođeno <http://www.chimactiv.agroparistech.fr>)

Ispitivanje se provodi nakon otapanja DPPH u metanolu ili etanolu iako Amorati i Valgimigli (2015) u svom radu navode kako je reakcija brža i ne daje pravu sliku kada se koriste polarna protična otapala te predlažu korištenje aprotičnih otapala. Također treba voditi računa o pH otopine uzorka koji je optimalan između 5 i 6,5. Apsorbancija se najčešće mjeri na početku i nakon određenog vremena te se rezultat izražava kao koncentracija antioksidansa potrebna za smanjenje početne koncentracije DPPH radikala na 50%. Što je ta koncentracija antioksidansa niža, antioksidativna aktivnost je veća. Amorati i Valgimigli (2015) su i ovdje kritični te smatraju kako bi bilo bolje umjesto samo jedne odabrane točke u vremenu, kontinuirano mjeriti apsorbanciju zbog različite brzine odvijanja reakcija za pojedine antioksidanse. Rezultat se često prikazuje i u obliku ekvivalenta nekog antioksidansa koji se koristi kao standard poput Troloxa ili askorbinske kiseline kako bi se dobiveni podaci lakše uspoređivali s podacima iz drugih istraživanja (Pyrzynska i Pękal, 2013).

DPPH metoda se smatra jednostavnom, brzom i jeftinom metodom za određivanje antioksidativne aktivnosti u uzorku. Pritom je ekstrakcija uzorka lakša i učinkovitija s obzirom na to da se i ekstrakcija i reakcija s DPPH radikalom mogu provoditi u istoj metanolnoj ili etanolnoj otopini. Ova metoda prikladna je za sve vrste antioksidansa, kako za hidrofilne, tako i za lipofilne. Problemi se mogu javiti kod uzoraka koji su obojani jer interferiraju kod mjerenja apsorbancije DPPH, a također DPPH može stupati u interakcije s drugim radikalima ili metalima koji se nalaze u uzorku (Pyrzynska i Pękal, 2013; Kedare i Singh, 2011).

Kako bi se pokušali riješiti navedeni nedostaci, razvijene su kromatografske metode (HPLC, UHPLC) koje prije same reakcije s DPPH razlučuju antioksidanse od matrice uzorka, ali i određuju pojedinačnu koncentraciju svakog antioksidansa iz smjese. Naime, utvrđeno je kako antioksidansi s velikom antioksidativnom aktivnosti povećavaju ukupnu antioksidativnu aktivnost smjese s visokim antioksidativnim potencijalom, dok slabiji antioksidansi smanjuju antioksidativnu aktivnost ostalih antioksidansa s većom antioksidativnom aktivnosti (Baranowska i Bajkacz, 2018).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U posljednje vrijeme provode se brojna istraživanja i studije radi procjene antioksidativnog djelovanja polifenolnih spojeva u hrani i dodacima prehrani. Osim toga, broj dodataka prehrani koji sadrže soju na tržištu i njihova uporaba u stalnom su porastu. Ova skupina dodataka prehrani postala je iznimno zanimljiva zbog preventivnog i terapijskog djelovanja na ljudsko zdravlje.

Cilj ovog rada bio je

- (i) procijeniti kvalitetu ispitivanih dodataka prehrani koji sadrže soju obzirom na ukupni sadržaj polifenola,
- (ii) odrediti antioksidativnu aktivnost istih,
- (iii) korelirati ukupni sadržaj polifenola u analiziranim dodacima prehrani i njihovu antioksidativnu aktivnost i utvrditi njihovu moguću povezanost te
- (iv) usporediti ukupni sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost prikupljenih dodataka prehrani s dostupnim literaturnim podacima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Za potrebe ovog rada sakupljeno je 8 dodataka prehrani koji sadrže soju. Svi uzorci dostupni su u ljekarnama Republike Hrvatske. Prema sadržaju biljnih vrsta analizirani dodaci prehrani podijeljeni su u dvije skupine: sojini monopreparati (4 uzorka; DP1 - DP4) i preparati koji sadrže više biljnih vrsta (4 uzorka; DP5 - DP8). Višekomponentni preparati sadržavali su osim soje i druge biljne vrste te dodatne biološki aktivne tvari poput vitamina, minerala i slično. Popis i opis proizvoda zajedno s njihovim proizvođačima prikazani su u Tablici 3. Treba istaknuti kako su uzorci dodataka prehrani bili u dva čvrsta oralna oblika, tablete i kapsule.

3.1.2. Kemikalije i reagensi

- Galna kiselina, certificirani referentni materijal (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH, slobodni radikal, 95% (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina, TROLOX (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Folin-Ciocalteu fenolni reagens (Fluka, Buchs, Švicarska)
- Bezvodni natrijev karbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Metanol čistoće za tekućinsku kromatografiju (98-100%) (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Ultračista voda pripremljena korištenjem sustava za pročišćavanje WaterPro (Labconco, Kansas City, MI, SAD) otpornosti 18,2 MΩ cm (25 °C)

3.1.3. Radni instrumenti

- Sustav za tekućinsku kromatografiju (Dionex, Sunnyvale, CA, SAD)
- UV- VIS spektrofotometar Lambda 25 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, SAD)
- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic X-tra (Elma, Singen, Njemačka)
- Vorteks mješalica (ZX3, VELP Scientifica, Usmate, Italija)
- Laboratorijska centrifuga (Hermle Z 306, Wehingen, Njemačka)
- Sustav za pročišćavanje vode (WaterPro, Labconco, Kansas City, MI, SAD)

Tablica 3. Popis uzoraka (prilagođeno prema Mornar i sur., 2020)

Redni broj	Naziv dodatka prehrani	Proizvođač	Oblik	Biljka	Sadržaj
1	Soy Flavon®	Dietpharm, Rakitje, Hrvatska	kapsula	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr	750 mg soje – sadržava 3% izoflavona: daidzin i daidzein 12 mg, glicitin i glicitein 7 mg, genistin i genistein 2,5 mg
2.	Maxi Life Mega Soy	Twinlab, Hauppauge, NY, SAD	kapsula	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr	Ekstrakt zrna soje (Novasoy) 200 mg (sadrži 40% izoflavona - 80 mg izoflavona uključuje 40 mg genisteina, 31 mg diadzeina i 9 mg glicitina)
3.	Soy Isoflavones	Natural Wealth, Milsing d.o.o., Zagreb, Hrvatska	kapsula	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr	750 mg soje (ne sadržava genetski modificirana zrna soje) – sadržava 3% izoflavona: daidzin i daidzein 12 mg, glicitin i glicitein 7 mg, genistin i genistein 2,5 mg
4.	PhytoEstrogen one daily	Solaray, Park City, UT, SAD	kapsula	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr	Koncentrat zrna soje (<i>Glycine max</i>) (garantiranih 60 mg [40%] ukupnih izoflavona s 33 mg genistina i 25,5 daidzina) 150 mg
5.	Herbal Female Complex	Solgar, Leonia, NJ, SAD	kapsula	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr; Prstasta konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	Standardizirani ekstrakt konopljike (plod) (agnuzid 0,375 mg [0.5%]) 75 mg; ekstrakt sojinih klica, genetski ne modificiran (2% izoflavona) 100 mg
6.	Menopause Relief	Natural Wealth, Milsing d.o.o., Zagreb, Hrvatska	tableta	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr; Prstasta konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	Koncentrat soje (garantiranih 21 mg izoflavona) 700 mg; prstasta konopljika (<i>Vitex agnus-castus</i> , plod) 33,3 mg
7.	Pausa	Specchiasol S.r.l., Bussolengo, Italija	kapsula	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr; Crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> (L.)	Sjemenka soje (<i>Soya hispida</i>) titrirana na 40% izoflavona (34,5 mg) 86 mg; Crvena djetelina (<i>Trifolium pratense</i> L.) zelen titrirana na 8% izoflavona (6 mg) 75 mg
8.	Meno-guide	Erba Vita S.p.A., San Marino, Italija	kapsula	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr; Lan - <i>Linum usitatissimum</i> (L.)	Ekstrakt sjemenski lana (<i>Linum usitatissimum</i>) sjemenka (standardizirana na 20% - 10 mg lignana) 49 mg; ekstrakt zrna soje (<i>Glycine max</i>) zrno (standardizirano na 40% - 7 mg izoflavona, genisteina 36% - 6 mg)

3.1.4. Pribor i posude

- Automatske jednokanalne pipete podesivog volumena za pipetiranje uzoraka (Rainin, Švicarska)
- Kolona za tekućinsku kromatografiju XBridge C18, dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 µm (Waters, Milford, SAD)
- Kvarcne kivete volumena 3,5 mL i duljine optičkog puta 10 mm (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- Injekcijski PTFE filteri, *Chromafil® Xtra PTFE-45/25*, veličine pora 0.45 µm i promjera 25 mm (Macher-Nagel, Duren, Njemačka)
- Injekcijski PTFE filteri *Chromafil® Xtra PTFE-20/13*, veličine pora 0.2 µm i promjera 13 mm (Macher-Nagel, Duren, Njemačka)
- Boce za mobilnu fazu sustava za tekućinsku kromatografiju
- Tamne odmjerne tikvice klase A (ISOLAB, Wertheim Njemačka)
- Eppendorf epruvete 2,0 mL (Eppendorf Corporate, Hamburg, Njemačka)

3.1.5. Programski paketi

- Chromeleon 6.8 softver (Dionex, Sunnyvale, CA, SAD)
- AA WinLab Version 3.2 (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD)
- Microsoft Office Excel (Microsoft, Seattle, WA, SAD)
- Statistica 12.1 (StatSoft, Inc., SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema uzoraka

Sadržaj deset kapsula izvagan je te izračunata prosječna masa jedne kapsule. Osim toga, deset tableta uzorka dodataka prehrani izvagano je te utvrđena prosječna masa jedne tablete. Zatim su tablete fino usitnjene u tarioniku i uzorak homogeniziran u fini prah kako bi se koristio u daljnjim ispitivanjima.

3.2.2. Postupak ekstrakcije

Prikladna masa uzorka od 25 ± 2 mg izvagana je u Falcon epruveti od 15 mL. Zatim je u epruvetu dodano 10 mL smjese metanol:ultračista voda (80:20, vol/vol) te uzorci postavljeni u ultrazvučnu kupelj Elmasonic X-tra (Elma, Singen, Njemačka) 15 minuta na sobnoj

temperaturi. Nakon toga, bistra otopina dobivena je centrifugiranjem (Hermle Z 306, Wehingen, Njemačka) na 3000 g 10 minuta pri 25 °C, a supernatant filtriran kroz Chromafil membranski filter veličine pora 0,45 µm (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prije analize.

3.2.3. Priprema standardnih i radnih otopina

Standardna otopina galne kiseline (2 mg/mL) pripravljena je otapanjem prikladne mase galne kiseline u smjesi metanol:ultračista voda (80:20, vol/vol). Standardna otopina TROLOX-a pripravljena je u metanolu u koncentraciji od 1 mM. Sve standardne otopine čuvane su u hladnjaku pri 4 °C u tamnim odmjernim tikvicama klase A (25 mL). Radne otopine pripravljene su svaki dan, neposredno prije mjerenja, serijom razrjeđenja odgovarajućim otapalom. Otopina DPPH radikala je, također, pripravljena neposredno prije upotrebe otapanjem 25 mg DPPH u metanolu u tamnoj odmjernoj tikvici klase A volumena 25 mL.

3.2.4. Određivanje ukupnog sadržaja polifenola

Ukupni sadržaj polifenola u ispitivanim uzorcima određen je Folin-Ciocalteu metodom (Singleton i sur., 1999). U odmjernu tikvicu od 5 mL otpipetirano je 0,20 mL metanolnog ekstrakta te razrijeđeno ultračistom vodom do 2,5 mL. Zatim je dodano 0,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa te nakon 3 minute 0,5 mL 10% natrijevog karbonata. Nakon toga, dobivena otopina snažno je promiješana pomoću vorteks mješalice (ZX3, VELP Scientifica, Usmate, MB, Italija) te dopunjena do oznake ultračistom vodom. Reakcijska smjesa ostavljena je na tamnom mjestu 2 sata pri sobnoj temperaturi prije mjerenja apsorbancije na 740 nm korištenjem UV-VIS spektrofotometra (model Lambda 25, Perkin–Elmer, Waltham, MA, SAD).

Slijepa proba je pripravljena prema navedenom propisu, tako da je umjesto 0,20 mL metanolnog ekstrakta otpipetiran jednak volumen metanola:ultračista voda (80:20, vol/vol).

Kao standard je korištena galna kiselina. Kalibracijska krivulja galne kiseline pripravljena je na 5 koncentracijskih razina u rasponu od 0,4 do 6,0 µg/mL ($r = 0,9999$). Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (GAE, engl. *Gallic acid equivalent*) (mg GAE/ g uzorka).

3.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određena je HPLC-DPPH metodom. Ukratko, u Eppendorf epruvetu dodano je 400 µL DPPH otopine i 1 mL otopine ekstrahiranog uzorka prema gore navedenoj proceduri. Reakcijska otopina je zatim dobro izmiješana pomoću

vorteks miješalice te epruveta ostavljena na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon toga, otopina je filtrirana kroz membranski filter veličine pora 0,20 μm (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) u HPLC vijale od tamnog stakla.

Kromatografska analiza je provedena u Dionex kromatografskom sustavu (Sunnyvale, California, SAD), koji uključuje P680 crpku, automatski ASI 100 injektor uzorka, TCC-100 termostatiranu pećnicu, UVD170S detektor i Chromeleon 6,8 softver (Dionex, Sunnyvale, CA, SAD). Kromatografski uvjeti korišteni za ovu analizu modificirani su iz istraživanja Chandrasekar i sur. (2006). Kao stacionarna faza korištena je XBridge C18 kolona (dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličine čestica 3,5 μm) i pripadna predkolona, a kao mobilna faza smjesa metanol:ultračista voda (80:20, vol/vol). Provedena je izokratična elucija uz protok od 1 mL/min te je održavana stalna temperatura od 25 °C. U HPLC sustav je injektirano 20 μL uzorka te mjerena apsorbancija na 517 nm. Ukupno vrijeme analize bilo je 5 minuta. Svi uzorci su pripremljeni i analizirani u triplikatu.

Sposobnost uzorka da uhvati „stabilni“ slobodni DPPH radikal određena je iz razlike površine pika otopine radikala i otopine radikala nakon reakcije s uzorkom. Kao standard korišten je sintetski antioksidans TROLOX, a kalibracijski postupak proveden je na seriji otopina standarda pripremljenih u 6 koncentracijskih razina u rasponu između 0,05 i 0,3 mM. Rezultati su izraženi kao ekvivalent TROLOX-a (engl. *Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity*, TEAC), a dobiveni su pomoću kalibracijske krivulje koja prikazuje ovisnost razlike površine pikova i koncentracije otopine standarda.

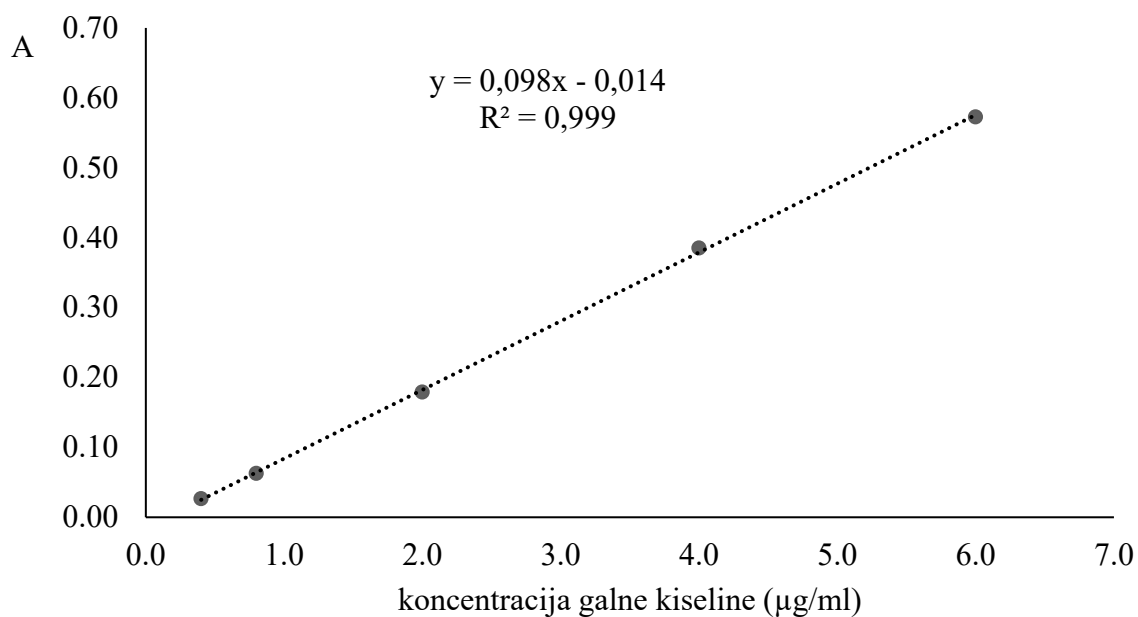
3.3. STATISTIČKE METODE

Varijable s normalnom raspodjelom prikazane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Određen je Pearsonov koeficijent korelacije kako bi se ispitala potencijalna ovisnost između ispitivanih varijabli u uzorcima. $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom razlikom, a $p < 0,01$ vrlo značajnom. Za obradu podataka korišten je statistički paket STATISTICA v. 12.1 od StatSoft® (Tulsa, OK, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UKUPNI SADRŽAJ POLIFENOLA U DODACIMA PREHRANI KOJI SADRŽE SOJU

Za postupak ekstrakcije polifenolih sastavnica iz uzoraka dodataka prehrani koji sadrže soju korištena je smjesa metanola: ultračista voda (80:20 vol/vol). Nakon toga ukupni sadržaj polifenola određen je na temelju vrijednosti apsorbanacija uzoraka upotrebom kalibracijske krivulje standarda galne kiseline, te su vrijednosti izražene kao mg galne kiseline po g uzorka. Za izradu kalibracijske krivulje korištene su sljedeće otopine: galna kiselina (2 mg/mL) u 80%-tnom metanolu, 10%-tna vodena otopina natrijevog karbonata i Folin-Ciocalteu reagens (razrijeđen s ultračistom vodom u omjeru 1:10). Slika 4. prikazuje kalibracijsku krivulja standarda galne kiseline za određivanje ukupnog sadržaja polifenola u analiziranim dodacima prehrani Folin-Ciocalteuovom metodom.



Slika 4. Kalibracijska krivulja standarda galne kiseline za određivanje ukupnog sadržaja polifenola u analiziranim dodacima prehrani Folin-Ciocalteuovom metodom

Funkcionalnost ispitivanih dodataka prehrani koji sadrže soju procijenjena je s obzirom na ukupan sadržaj polifenola. Ovi biološki aktivni spojevi se u malim količinama nalaze u hrani biljnog porijekla, a njihovom izolacijom iz biljnog materijala dobivaju se ekstrakti koji se koriste u proizvodnji dodataka prehrani. Dobiveni rezultati ukupnog sadržaja polifenola, izraženi kao ekvivalent galne kiseline (GAE), u uzorcima dodataka prehrani bili su u intervalu

vrijednosti od 11,14 (DP3 - monopreparat) do 38,21 (DP2 - monopreparat) mg GAE/g uzorka (Tablica 4).

Tablica 4. Ukupni sadržaj polifenola u dodacima prehrani koji sadrže soju određen Folin-Ciocalteuovom metodom

Uzorak	Oblik	Dnevna doza (broj jediničnog oblika)	Ukupni sadržaj polifenola (mg GAE/g uzorka) \pm SD	Ukupni sadržaj polifenola u jediničnom dozirnom obliku (mg GAE)	Ukupni sadržaj polifenola u preporučenom dnevnom unosu (mg GAE)
DP1	kapsula	2	18,037 \pm 0,100	7,666	15,331
DP2	kapsula	1	38,210 \pm 0,093	17,472	17,472
DP3	kapsula	1	11,136 \pm 0,026	8,677	8,667
DP4	kapsula	1	25,341 \pm 0,020	18,284	18,284
DP5	kapsula	1	36,416 \pm 0,042	23,593	23,593
DP6	tableta	1	16,117 \pm 0,012	9,870	9,870
DP7	kapsula	3	25,663 \pm 0,072	7,370	22,111
DP8	kapsula	1	26,565 \pm 0,041	11,689	11,689

Zanimljivo je bilo primijetiti da su analizirani dodaci prehrani pokazali značajan sadržaj polifenola. Tako su, uzorci dodataka prehrani koji sadrže više biljnih vrsta (prosjek: 26,19 \pm 8,30 mg GAE/g) imali veći sadržaj polifenola od monopreparata (prosjek: 23,18 \pm 11,58 mg GAE/g), međutim, ta razlika nije bila statistički značajna.

O sadržaju polifenola u dodacima prehrani koji sadrže soju dostupni su ograničeni podaci. Rezultati dobiveni u ovom radu mogu se usporediti s rezultatima Romani i sur. (2010) koji su u svom istraživanju također određivali ukupni sadržaju polifenola u dodacima prehrani koji sadrže soju. Tako su rezultati dobiveni za uzorke sojinih monopreparata bili su u skladu s publiciranim rezultatima gore navedenih autora (1,25 i 1,51 GAE g / 100 g), osim uzorka DP2 (38,21 mg GAE/g uzorka).

Osim toga, u ovom radu rezultati dobiveni za preparate koji sadrže soju i druge biljne vrste (od 16,117 (DP6) do 36,416 (DP5) mg GAE/ g uzorka) u skladu su s onima (3,71 i 3,34 g GAE / 100 g uzorka) koje su prethodno dobili Romani i suradnici (2010).

Uzimajući u obzir prosječnu masu pojedine tablete ili kapsule, unos polifenola nakon uzimanja jediničnog dozirnog oblika, bio je u širokom rasponu od 7,370 mg GAE (DP7) do 23,593 mg GAE (DP5). Stoga je svakodnevnim uzimanje dnevne doze analiziranih dodataka prehrani, prema preporuci proizvođača, unos polifenola variralo u rasponu od 8,67 (DP3) - 23,59 (DP5) mg GAE/ dan za odraslu populaciju.

Na temelju dobivenih rezultata za sadržaj polifenola u preporučenoj dnevnoj dozi analizirani uzorci mogu se podijeliti u dvije kategorije (i) 1 - 10 mg polifenola (2 uzorka) i (ii) 10 - 100 mg polifenola (6 uzoraka).

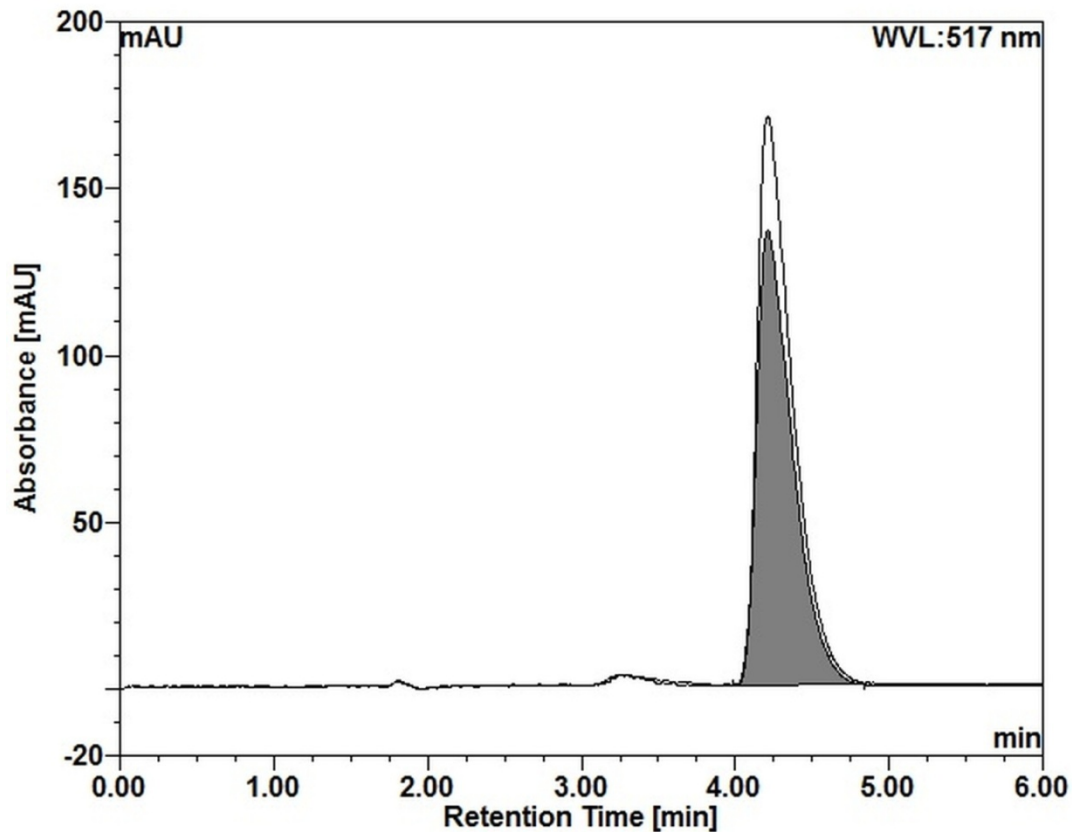
4.2. ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE DODATAKA PREHRANI KOJI SADRŽE SOJU

Antioksidativno djelovanje ispitivanih uzoraka procijenjeno je prema gore opisanoj HPLC-DPPH metodi. DPPH radikal je organski stabilan slobodni radikal s apsorpcijskim maksimumom na 517 nm. Ovaj kromogeni radikal, u interakciji s antioksidansima, prihvaća atom vodika pri čemu nastaje DPPHH neradikalna stabilna molekula. Pri tome dolazi do gubitka apsorpcije pri navedenoj valnoj duljini, što rezultira vizualno uočljivom promjenom boje od intenzivno ljubičaste do blijedo žute otopine. Reprezentativni kromatogram DPPH otopine prije i nakon reakcije uzorka predstavljen je na Slici 5. Pik DPPH (prosječno vrijeme zadržavanja bilo je 4,2 min, RSD <0,14%) dobro je odvojen bez smetnji (čistoće pika veća od 999).

Linearnost je ispitana analizom reakcijske smjese DPPH radikala i TROLOX standarda u rasponu koncentracija od 0,05 do 0,3 mM ($y = -129,89 * x + 49,367$). Koeficijent korelacije i koeficijent determinacije linearne regresije standardne krivulje veći su od 0,999 ($R^2 = 0,9991$; $r = -0,9995$).

Točnost metode ispitana je višestrukim injektiranjem ($n = 3$) DPPH otopine nakon reakcije s tri različite standardne otopine TROLOX. Dobiveni rezultati analitičkog prinosa iznosili su $97,5\% \pm 2,1\%$ za 0,05 mM, $103,9\% \pm 2,7\%$ za 0,15 mM i $99,1\% \pm 1,4\%$ za 0,30 mM standardne otopine. Ponovljivost metode ispitana je ponovljenim injektiranjem smjese DPPH i standardnih otopina ($n = 3$) tijekom tri uzastopna dana. Relativna standardna devijacija (RSD) bila je u rasponu od 3,6% do 4,8% unutar jednog dana dok je srednja preciznost

iznosila od 4,1% do 5,7%. Ovi rezultati jasno pokazuju da je kromatografska metoda prikladna za određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka.



Slika 5. Kromatogram DPPH otopine prije (bijeli) i nakon reakcije uzorka (sivi) snimljen na 517 nm

Općenito je poznato da slobodni radikali koji nastaju u organizmu dijelom su povezani s etiologijom kroničnih bolesti poput karcinoma i niza drugih bolesti. Antioksidansi porijeklom iz biljnih vrsta, sposobni su za uklanjanje slobodnih radikala te smanjiti rizik od razvoja bolesti. Stoga je važno utvrditi antioksidativnu aktivnost dodataka prehrani koji sadrže jednu ili više biljnih vrsta. Tablica 5. pokazuje antioksidativnu aktivnost uzoraka dodataka prehrani koji sadrže soju, a dobiveni rezultati primjenom predložene HPLC-DPPH metode izraženi su kao ekvivalenti TROLOX-a (TEAC). Vrijedno je primijetiti da su vrijednosti antioksidativne aktivnosti dobivene za formulirane uzorke dodataka prehrani u uskom rasponu (61,29 (DP3) - 208,50 (DP2) mM TEAC/g uzorka). Osim toga, dobivene vrijednosti bile su više u dodacima prehrani koji sadrže više biljnih vrsta (0,403 mM TEAC/ml; $158,69 \pm 35,15$ mM TEAC/g

uzorka) nego u monopreparatima (0,327 mM TEAC/ml; $126,99 \pm 67,95$ mM TEAC/g uzorka), ali nije bilo statistički značajne razlike između dvije skupine uzoraka.

Tablica 5. Antioksidativna aktivnost dodataka prehrani koji sadrže soju određena HPLC-DPPH metodom

Uzorak	Odvaga uzorka (mg)	Antioksidativna aktivnost (mM TEAC) \pm SD	Antioksidativna aktivnost (mM TEAC/g uzorka)
DP1	25,64	$0,210 \pm 0,007$	81,903
DP2	25,74	$0,537 \pm 0,009$	208,495
DP3	25,78	$0,158 \pm 0,006$	61,288
DP4	25,81	$0,403 \pm 0,018$	156,270
DP5	25,80	$0,517 \pm 0,013$	200,517
DP6	25,82	$0,298 \pm 0,012$	115,582
DP7	24,88	$0,379 \pm 0,015$	152,331
DP8	25,15	$0,418 \pm 0,004$	166,335

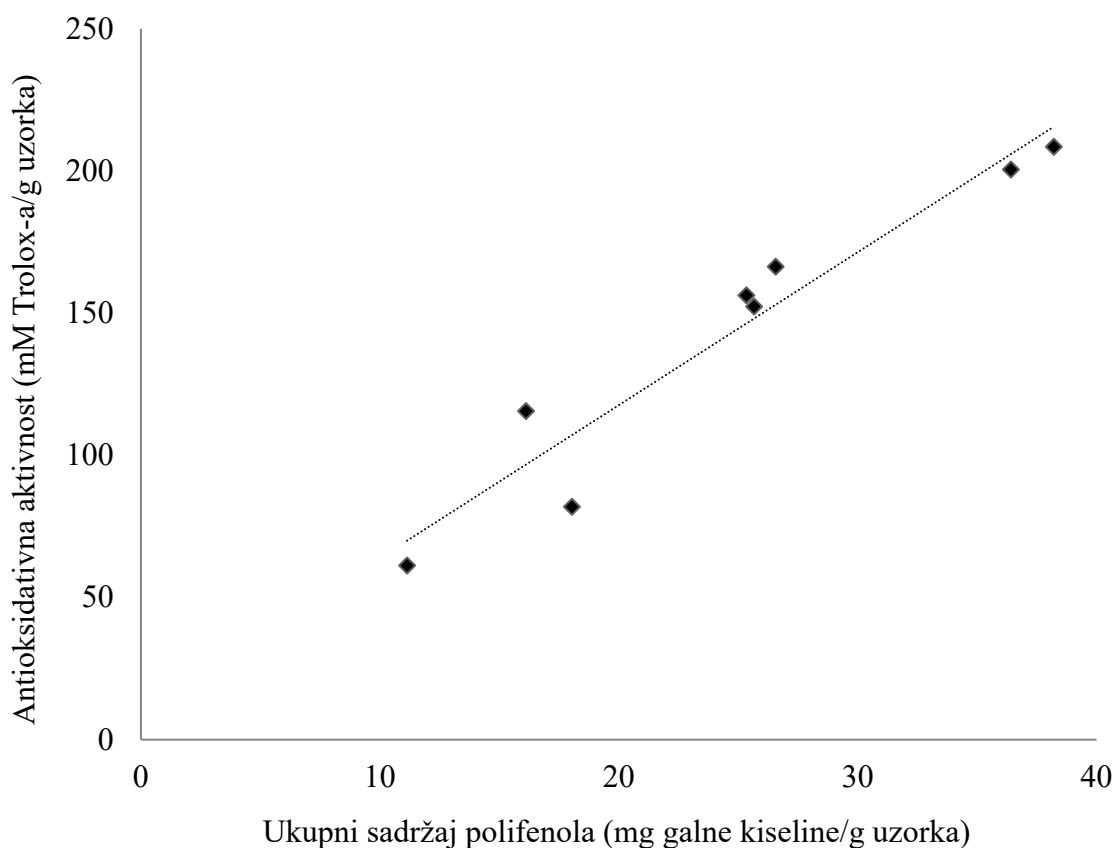
Usporedba dobivenih rezultata s rezultatima drugih autora u procjeni antioksidativne aktivnosti bila je prilično teška zbog razlika u pripremi uzorka (primjena različitih ekstrakcijskih otapala i/ili smjesa) i izražavanju rezultata (npr. EC50% vrijednost (Kroyer i sur. 2004), korištenje različitih standarda antioksidansa poput askorbinske kiseline, TROLOX-a, butiliranog hidroksianizola i drugih).

Osim toga, prema dostupnoj stručnoj i znanstvenoj literaturi općenito nedostaje istraživanja o procjeni antioksidativne aktivnosti dodataka prehrani koji sadrže fitoestrogene (jedan dodatak prehrani koji sadrži crvenu djetelinu i pet uzoraka koji sadrže soju (Kroyer i sur. 2004; Romani i sur. 2010)). Osim toga, u navedenim istraživanjima analizirani su tržišno dostupni preparati formulirani iz jedne biljne vrste.

Značajno je istaknuti da je statistička analiza pokazala značajnu korelaciju između ukupnog sadržaja polifenola i procijenjene antioksidativne aktivnosti ($r = 0,9625$; $p < 0,01$) analiziranih dodataka prehrani (Slika 6). Zbog malog broja dodataka prehrani u prethodno navedenim

istraživanjima (Kroyer et al 2004; Romani i sur. 2010), nema podataka o korelaciji između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti procijenjene DPPH metodom.

Osim toga, u dostupnoj literaturi antioksidativna aktivnost različitih biljnih vrsta procijenjena je spektrofotometrijskim metodama. Procjena antioksidativne aktivnosti korištenjem DPPH radikala pri spektrofotometrijskim mjerenjima nije specifična jer i druge sastavnice (npr. pomoćne tvari dodataka prehrani) mogu apsorbirati istu valnu duljinu kao i DPPH radikal i utjecati na procjenu antioksidativne aktivnosti. Visoka vrijednost korelacije u ovom radu može se objasniti činjenicom da je HPLC separacijska tehnika, a HPLC-DPPH metoda selektivnija od često primjenjivane spektrofotometrijske metode.



Slika 6. Graf korelacije između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti u dodacima prehrani koji sadrže soju

Na temelju dobivenih rezultata u ovom radu formulirani dodaci prehrani su značajan izvor polifenolnih sastavnica. Također, opseg antioksidativnog djelovanja ovih uzoraka u skladu je sa sadržajem ovih biološki aktivnih tvari.

5. ZAKLJUČAK

Ciljevi ovog rada obrazloženi su u poglavlju 2. Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

1. Analizirani dodaci prehrani koji sadrže soju mogu se smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica.
2. Antioksidativna aktivnost ispitivanih dodataka prehrani u skladu je sa sadržajem ovih biološki aktivnih sastavnica. Korelacija između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativnog učinka je statistički značajna, pa se može zaključiti da je antioksidativno djelovanje proporcionalno sadržaju ovih sekundarnih metabolita.
3. Predložena HPLC-DPPH metoda je brza i ponovljiva te prikladna za rutinsku analizu uzoraka.
4. Rezultati ovog rada doprinose boljem razumijevanju sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti dodataka prehrani koji sadrže soju.
5. Potrebna su daljnja istraživanja antioksidativne aktivnosti i pojedinih sastavnica polifenola primjenom drugih metoda.
6. Također je u istraživanje potrebno uključiti dodatke prehrani koji sadrže druge biljne vrste.

6. LITERATURA

Agbor GA, Vinson JA, Donnelly PE. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int J Food Sci Nutr Diet.* 2014, 3, 147-156.

Amarowicz R, Pegg RB. Natural antioxidants of plant origin. *Adv. Food Nutr. Res.*, 2019, 90, 1-81.

Amorati R, Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radic. Res.* 2015, 49, 633-649.

Bacciottini L, Falchetti A, Pampaloni B, Bartolini E, Carossino AM, Brandi ML. Phytoestrogens: food or drug?. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2007, 4, 123-130.

Baranowska I, Bajkacz S. A new UHPLC-MS/MS method for the determination of flavonoids in supplements and DPPH • -UHPLC-UV method for the evaluation of the radical scavenging activity of flavonoids. *Food Chem.* 2018, 256, 333-341.

Beszterda M, Frański R. Identification of isoflavones in the extract of supplements for menopause symptoms by direct infusion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Sci Adv.* 2020, 1, 143-151.

Buhač T, Amidžić Klarić D, Klarić I, Nigović B, Brusač E, Jeličić M-L, Mornar A. Assessment of active ingredients and metal impurities in phytoestrogen-containing food and dietary supplements. *J. Food Nutr. Res.* 2020, 59, 87-97.

Bursać M, Atanacković Krstonošić M, Miladinović J, Malenčić Đ, Gvozdrenović Lj, Hogervorst Cvejić J. Isoflavone Composition, Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Soybeans with Colored Seed Coat. *Nat. Prod. Commun.* 2017, 12, 527-532.

Chandrasekar D, Madhusudhana K, Ramakrishna S, Diwan PV. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 40, 460-464.

Cornwell T, Cohick W, Raskin I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry.* 2004, 65, 995–1016

Determination of the activity of an antioxidant by the DPPH* assay, Test principles. <http://www.chimactiv.agroparistech.fr>, pristupljeno 19.5.2021.

Fernandez-Panchon MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From In Vitro Results to In Vivo Evidence. *Food Sci. Nutr.* 2008, 48, 649–671.

Fürst P. The role of antioxidants in nutritional support. *Proc Nutr Soc.* 1996, 55, 945-961.

<http://www.freepik.com>, pristupljeno 16.5.2021.

Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 2011, 48, 412-422.

Kroyer GT. Red clover extract as antioxidant active and functional food ingredient. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2004, 5, 101-105.

Kumar V, Rani A, Kumar Dixit A, Pratap D, Bhatnagar D. A comparative assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in soybean with varying seed coat colour. *Food Res. Int.* 2010, 43, 323-328.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004, 79, 727–747.

Mornar A, Buhač T, Amidžić Klarić D, Klarić I, Sertić M, Nigović B. Multi-targeted Screening of Phytoestrogens in Food, Raw Material, and Dietary Supplements by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods.* 2020, 13, 482-495.

Niamnuy C, Nachaisin M, Laohavanich J, Devahastin S. Evaluation of bioactive compounds and bioactivities of soybean dried by different methods and conditions. *Food Chem.* 2011, 129, 899-906.

Pravilnik o dodacima prehrani, 2013, Zagreb, Narodne novine, broj 76 (NN/76/2013).

Pyrzynska K, Pękal A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Anal. Methods.* 2013, 5(17), 4288–4295.

Romani A, Vignolini P, Tanini A, Pampaloni B, Heimler D. HPLC/DAD/MS and Antioxidant Activity of Isoflavone-Based Food Supplements. *Nat. Prod. Commun.* 2010, 5, 1775-1780.

Ruskovska T, Maksimova V, Milenkovic D. Polyphenols in human nutrition: from the in vitro antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability – an overview and perspective. *Br. J. Nutr.* 2020, 123, 241–254.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999, 299, 152-178.

Sirotkin AV. Phytoestrogens and their effects. *Eur J Pharmacol.* 2014, 741, 230-236.

Yusnawan E, Inayati A, Kuswantoro H. Total phenolic contents and antioxidant activities of ten soybean promising lines tolerant to acid soil. *International Congress on Challenges of Biotechnological Research in Food and Health, Surakarta, 2014.*

7. SAŽETAK/SUMMARY

Broj dodataka prehrani koji sadrže soju na tržištu i njihova uporaba u stalnom su porastu. Ova skupina dodataka prehrani postala je iznimno zanimljiva zbog preventivnog i terapijskog djelovanja na ljudsko zdravlje. Cilj ovog rada bio je procijeniti kvalitetu ispitivanih dodataka prehrani koji sadrže soju obzirom na ukupni sadržaj polifenola te odrediti antioksidativnu aktivnost istih. Analizirani dodaci prehrani koji sadrže soju mogu se smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica. Antioksidativna aktivnost ispitivanih dodataka prehrani u skladu je sa sadržajem ovih biološki aktivnih sastavnica. Korelacija između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativnog učinka snažno je statistički značajna, pa se može zaključiti da je antioksidativno djelovanje proporcionalno sadržaju ovih sekundarnih metabolita. HPLC-DPPH korištena metoda je brza i ponovljiva te prikladna za rutinsku analizu uzoraka. Rezultati ove studije doprinose boljem razumijevanju sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti dodataka prehrani koji sadrže soju.

The number of soy-based dietary supplements and their use is constantly increasing. This group of dietary supplements has become extremely interesting due to its preventive and therapeutic effects on human health. This study aimed to evaluate the quality of the tested soy-based dietary supplements concerning the total polyphenol content and their antioxidant activity. The analyzed soy-based dietary supplements could be considered a good source of polyphenolic constituents. The antioxidant activity of the tested dietary supplements is in accordance with the content of these biologically active compositions. The correlation between total polyphenol content and antioxidant activity is strongly statistically significant, so it could be concluded that antioxidant activity is proportionally contained in these secondary metabolisms. This HPLC-DPPH method is fast and reproducible, and suitable for use in routine analysis. The results of this study contribute to a better understanding of the content of total polyphenols and the antioxidant activities of soy-based dietary supplements.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Određivanje ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti dodataka prehrani koji sadrže soju

Iva Brletić

SAŽETAK

Broj dodataka prehrani koji sadrže soju na tržištu i njihova uporaba u stalnom su porastu. Ova skupina dodataka prehrani postala je iznimno zanimljiva zbog preventivnog i terapijskog djelovanja na ljudsko zdravlje. Cilj ovog rada bio je procijeniti kvalitetu ispitivanih dodataka prehrani koji sadrže soju obzirom na ukupni sadržaj polifenola te odrediti antioksidativnu aktivnost istih. Analizirani dodaci prehrani koji sadrže soju mogu se smatrati dobrim izvorom polifenolnih sastavnica. Antioksidativna aktivnost ispitivanih dodataka prehrani u skladu je sa sadržajem ovih biološki aktivnih sastavnica. Korelacija između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativnog učinka snažno je statistički značajna, pa se može zaključiti da je antioksidativno djelovanje proporcionalno sadržaju ovih sekundarnih metabolita. HPLC-DPPH korištena metoda je brza i ponovljiva te prikladna za rutinsku analizu uzoraka. Rezultati ove studije doprinose boljem razumijevanju sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti dodataka prehrani koji sadrže soju.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 6 grafička prikaza, 5 tablica i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: sadržaj ukupnih polifenola, antioksidativna aktivnost, dodaci prehrani koji sadrže soju

Mentor: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Maja Friščić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Hrvoje Rimac, *poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: srpanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Determination of total polyphenol content and antioxidant activity of soy-based dietary supplements

Iva Brletić

SUMMARY

The number of soy-based dietary supplements and their use is constantly increasing. This group of dietary supplements has become extremely interesting due to its preventive and therapeutic effects on human health. This study aimed to evaluate the quality of the tested soy-based dietary supplements concerning the total polyphenol content and their antioxidant activity. The analyzed soy-based dietary supplements could be considered a good source of polyphenolic constituents. The antioxidant activity of the tested dietary supplements is in accordance with the content of these biologically active compositions. The correlation between total polyphenol content and antioxidant activity is strongly statistically significant, so it could be concluded that antioxidant activity is proportionally contained in these secondary metabolisms. This HPLC-DPPH method is fast and reproducible, and suitable for use in routine analysis. The results of this study contribute to a better understanding of the content of total polyphenols and the antioxidant activities of soy-based dietary supplements.

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

Thesis includes: 38 pages, 6 figures, 5 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: polyphenol content, antioxidant activity, soy-based dietary supplements

Mentor: **Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Friščić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Hrvoje Rimac, Ph.D. *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.