

# Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost dodataka prehrani kod žena u menopauzi

---

**Perkušić, Ana**

**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:163:965339>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



Ana Perkušić

**Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna  
aktivnost dodataka prehrani kod žena u  
menopauzi**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova 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. farm.

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

*Hvala prof. dr. sc. Biljani Nigović i prof. dr. sc. Ani Mornar Turk, voditeljicama kolegija Analitika lijekova, na pruženoj prilici i iskazanom povjerenju.*

*Beskrajno sam zahvalna mojim roditeljima, bratu i sestri na ljubavi, strpljenju, razumijevanju i pruženoj potpori tijekom studija. Također, veliko hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali studentske dane, a posebno hvala mojoj cimerici Karli koja je studiranje činila lakšim.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. POLIFENOLI.....	2
1.1.1. Kemijska struktura polifenola .....	2
1.1.2. Utjecaj polifenola na zdravlje.....	4
1.2. FITOESTROGENI.....	5
1.2.1. Klasifikacija fitoestrogena.....	5
1.2.2. Utjecaj fitoestrogena na zdravlje .....	5
1.3. METODE ZA ODREĐIVANJE POLIFENOLNIH SASTAVNICA .....	7
1.4. ANTIOKSIDANSI.....	8
1.5. METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI.....	9
1.6. DPPH.....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	11
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. MATERIJALI .....	14
3.1.1. Kemikalije i reagensi.....	14
3.1.2. Uzorci .....	14
3.1.3. Radni instrumenti .....	14
3.1.4. Pribor i posuđe.....	16
3.1.5. Programski paketi.....	16
3.2. METODE .....	16
3.2.1. Priprema uzorka .....	16
3.2.2. Postupak ekstrakcije .....	16
3.2.3. Priprema standardnih i radnih otopina .....	17
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja polifenola .....	17
3.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti .....	17
3.2.6. Statistička obrada podataka .....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	19
4.1. UKUPNI SADRŽAJ POLIFENOLA U DODACIMA PREHRANI.....	20
4.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST DODATAKA PREHRANI.....	23
5. ZAKLJUČAK .....	26
6. LITERATURA.....	28
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	31
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

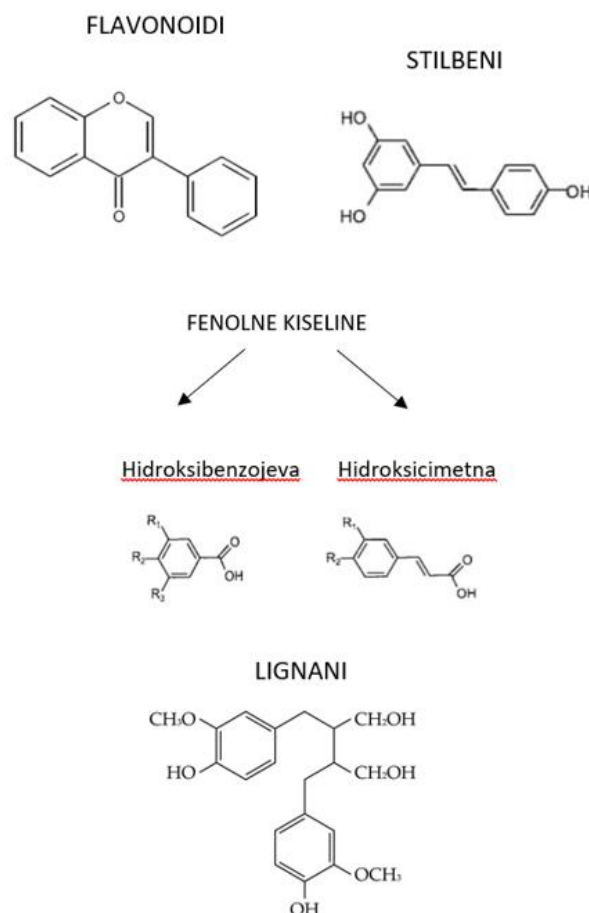
## **1. UVOD**

## 1.1. POLIFENOLI

Polifenoli čine veliku skupinu bioaktivnih sastavnica koje su proizvod sekundarnog metabolizma biljaka. Na temelju kemijske strukture dijele se u više skupina. Glavne skupine polifenola su flavonoidi, fenolne kiseline, stilbeni i lignani (Li i sur., 2013). Voće, povrće, cjelovite žitarice i druge vrste hrane i pića poput čaja, čokolade i vina su bogat izvor polifenola (Tsao, 2010).

### 1.1.1. Kemijska struktura polifenola

Nekoliko tisuća molekula koje imaju polifenolnu strukturu identificirano je u višim biljkama, a nekoliko stotina se nalazi u jestivim biljkama. Ove biološki aktivne tvari koje u strukturi imaju nekoliko hidroksilnih skupina na aromatskom prstenu, biljkama služe u obrani od nepovoljnog utjecaja poput UV zračenja ili napada patogena. Klasificiraju se u različite skupine ovisno o broju fenolnih prstenova koje sadrže i strukturnih elemenata koji povezuju te prstenove što je prikazano na Slici 1 (Manach i sur., 2004).



Slika 1. Klasifikacija polifenola prema njihovoj kemijskoj strukturi (preuzeto i prilagođeno prema Manach i sur., 2004).

Većina polifenola u biljkama zastupljena je u obliku glikozida s različitim šećernim (npr. glukoza) jedinicama i aciliranim šećerima na različitim položajima polifenolnog kostura (Tsao 2010), dok su aglikoni prisutni u niskim koncentracijama.

Flavonoidi su najveća skupina polifenola. Strukturu im čine dva aromatska prstena povezana preko 3 ugljikova atoma koja tvore piranski prsten odnosno oksigenirani heterociklični spoj. Ovisno o stupnju oksidacije piranskog prstena flavonoidi se dijele u 6 glavnih grupa: flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini i flavanoli (katehini i proantocijanidini). Flavonoli su najzastupljeniji flavonoidi u hrani biljnog porijekala, a najpoznatiji predstavnici su kvercetin i kempferol. Treba istaknuti luk, kovrčavi kelj, brokula, borovnica, čaj i crno vino kao bogat izvor ovih sastavnica prisutnih uglavnom u glikozidnom obliku. Za razliku od flavonola, flavoni su manje prisutni u voću i povrću. Flavoni se uglavnom sastoje od glikozida luteolina i apigenina, a peršin i celer su danas poznati hranjivi izvori flavona. Flavanoni se nalaze u rajčicama i određenim aromatičnim biljkama poput metvice, ali u visokim koncentracijama su prisutni jedino u agrumima. Glavni aglikoni su naringenin u grejpu, hesperidin u narančama i eriodictol u limunu. Izoflavoni su flavonoidi koji su strukturno slični estrogenima. Iako nisu steroidi, imaju hidroksilne skupine na položajima 7 i 4' u konfiguraciji analognoj onoj hidroksilnih skupina u molekuli estradiola. Iz tog razloga imaju sposobnost vezanja na estrogenske receptore te se klasificiraju kao fitoestrogeni. Izoflavoni su pronađeni u mahunarkama, a soja i njeni prerađeni proizvodi su glavni izvor izoflavona u ljudskoj prehrani. Tri glavna predstavnika su: genistein, daidzein i glicitein općenito zastupljeni u omjeru koncentracija 1:1:0,2. Flavanoli postoje u obliku monomera (katehini) i polimera (proantocijanidini). Najbogatiji izvor katehina je zeleni čaj i čokolada, a od voća marelice. Za razliku od ostalih grupa flavonoida, flavanoli nisu dominantno u glikoziliranom obliku u hrani. Antocijani su pigmenti otopljeni u vakuolarnom soku epidermalnog tkiva cvjetova i plodova kojima daju ružičastu, crvenu, plavu ili ljubičastu boju. U ljudskoj prehrani antocijani su pronađeni u crnom vinu, određenim žitarica te u lisnatom i korjenastom povrću (patlidžan, kupus, luk, grah), ali su najveće količine prisutne u voću. Glavni predstavnik antocijanidina u hrani je cijanidin (Manach i sur., 2004).

Lignani se sastoje od dvije fenilpropan jedinice. Sekoizolaricirezinol je najzastupljeniji lignan u lanenom sjemenu koje je ujedno i najbogatiji prehrambeni izvor lignana. Lignani se crijevnom mikroflorom metaboliziraju u enterodiol i enterolakton (Manach i sur., 2004).

S druge strane, stilbeni su prisutni u hrani u vrlo malim količinama. Glavni stilben je resveratrol koji se nalazi u crnom vinu (Manach i sur., 2004).

Fenolne kiseline se dijele na dvije klase: derivati hidroksibenzojeve kiseline i derivati hidroksicimetne kiseline. Sadržaj hidroksibenzojeve kiseline, u slobodnom i esterificiranom obliku, u jestivim biljkama je jako nizak, a najpoznatija od njih je galna kiselina. Nadalje, hidroksibenzojeve kiseline čine kompleksne strukture tanina koji se mogu hidrolizirati kao što su galotanini u mangu i elagtanini u jagodama i kupinama. U odnosu na hidroksibenzojevih kiselina, hidroksicimetne kiseline su češće u ljudskoj prehrani, a u njih se ubrajaju: kavena, kumarinska, ferulična i sinapična kiselina. Klorogenska kiselina je ester kavene i kininske kiseline, a u visokim koncentracijama je prisutna u kavi: jedna šalica kave može sadržavati 70-350 mg klorogenske kiseline. Ferulična kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u žitaricama (Manach i sur., 2004).

### **1.1.2. Utjecaj polifenola na zdravlje**

Utjecaj polifenola na zdravlje ovisi o konzumiranoj količini i bioraspoloživosti polifenola. Metaboliti polifenola koji se nalaze u krvi ili u ciljnim organima rezultat su probavne ili jetrene aktivnosti te su različite biološke aktivnosti od izvornih tvari. Većina polifenola u hrani su u obliku estera, glikozida ili polimera koji se prvo moraju hidrolizirati crijevnim enzimima ili mikroflorom debelog crijeva da bi se apsorbirali (Manach i sur., 2004).

Polifenoli smanjuju morbiditet i/ili usporavaju napredovanje karcinoma, kardiovaskularnih, neurodegenerativnih i niza drugih bolesti. Mehanizam djelovanja polifenola povezan je s njihovim antioksidativnim djelovanjem na način da smanjuju razinu reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta u ljudskom tijelu. Osim toga, biljni polifenoli imaju protuupalno, antialergijsko, antiaterogeno, antitrombotsko i antimutageno djelovanje. Nadalje, imaju sposobnost moduliranja ljudskog imunološkog sustava utječući na proliferaciju i aktivnost bijelih krvnih stanica, kao i na proizvodnju citokina ili drugih čimbenika koji sudjeluju u imunološkoj obrani (Gorzynik-Debicka i sur., 2018).

Prema dostupnoj stručnoj i znanstvenoj literaturi epigalokatehin i genistein prisutni su u čaju i soji, te doprinose DNA hipometilaciji, a time i reaktivaciji prethodno potisnutih supresorskih gena kao što su p16, RAR-beta, MGMT što rezultira inhibicijom indukcije ili rasta karcinoma. Antocijani kupine smanjuju aktivnost DNA metiltransferaze te također dovode do aktivacije gena supresora putem mehanizma demetilacije promotora. Na temelju rezultata provedenih istraživanja na humanim tumorskim staničnim linijama resveratrol je djelovao inhibitorno na



staničnu proliferaciju bez indukcije apoptoze. Zanimljivo je istaknuti da hidroksitirozol koji se nalazi u maslinovom ulju inhibira agregaciju trombocita i potiče inhibiciju rasta stanica raka dojke. Polifenoli su zbog svojih terapijskih svojstava područje velikog interesa istraživanja i iznimno su cijenjene biološki aktivne sastavnice (Gorzynik-Debicka i sur., 2018).

## **1.2. FITOESTROGENI**

Fitoestrogeni su nesteroidni sekundarni biljni metaboliti sa svojstvima sličnim estrogenu. Ove sastavnice imaju strukturu sličnu 17- $\beta$ -estradiolu i sposobnost vezanja na estrogenske receptore te ostvaraju različite estrogen ili anti-estrogen učinke (Lasic i sur., 2020). Treba istaknuti da su fitoestrogeni prisutni su u voću, povrću i cjelovitim žitaricama koje ljudi obično konzumiraju, najčešće su zastupljeni u biljkama iz porodice mahunarki (lat. *Leguminosae*) (Sirotkin 2014).

### **1.2.1. Klasifikacija fitoestrogena**

Fitoestrogene dijelimo u dvije osnovne grupe: lignane i izoflavonoide. Izoflavonoidi imaju kemijsku strukturu koja se sastoji od dva benzenska prstena na koje mogu biti vezane dvije ili više hidroksilnih skupina, a oni se dalje dijele na izoflavone i kumestane. Izoflavoni se u biljkama nalaze u obliku glikozida, a u fermentiranoj hrani u obliku aglikona. U probavnom traktu se glikozidni konjugati djelovanjem bakterijskih enzima hidroliziraju u aglikone ili „slobodne izoflavone“. Najbolji izvor izoflavona su mahunarke, a osobito soja, dok su genistein i daidzein dominantni sojini izoflavoni (Gašparević-Ivanek 2003).

Iako postoji velik broj kumestana, samo neki od njih pokazuju estrogensku aktivnost, pretežno kumestrol i 4-mestoksikumestrol. Glavni prehrambeni izvor kumestrola su mahunarke, međutim zabilježene su niske razine u špinatu i prokulicama (Cornwell i sur., 2004).

Lignani su vrlo široka skupina fenilpropanoidnih dimera i oligomera. Sekoizolaricirezinol i matairezol su dimeri lignana kod kojih nije zabilježena estrogenska aktivnost, ali se crijevnom mikroflorom lako metaboliziraju u bioaktivne lignane poput enterodiola i enterolaktone koji ispoljavaju aktivnost sličnu estrogenu. Fitolignani su u velikim količinama zastupljeni u lanenom sjemenu, cjelovitim žitaricama, povrću i čaju (Cornwell i sur., 2004).

### **1.2.2. Utjecaj fitoestrogena na zdravlje**

Interes za biljnim estrogenima ili fitoestrogenima pojačan je nedavnom spoznajom da hormonska nadomjesna terapija nije toliko učinkovita i sigurna kao što se prethodno smatralo (Cornwell i sur., 2004). Sve veći broj dokaza upućuje na to da fitoestrogeni mogu biti aditivno učinkovito sredstvo za prevenciju i liječenje nekoliko disfunkcija i bolesti povezanih sa starenjem, mentalnim sposobnostima, metabolizmom, malignom transformacijom,

kardiovaskularnim bolestima i reprodukcijom, a to su rak dojke i prostate, simptomi menopauze, osteoporoza, ateroskleroza, moždani udar te neurodegenerativne bolesti (Sirotkin 2014). Zbog sličnosti strukture s estrogenom sisavaca odnosno estradiolom, fitoestrogeni se vežu na alfa i beta estrogenske receptore s većim afinitetom za beta estrogenski receptor. Ovi receptori nakon vezanja liganda prelaze iz citoplazme u jezgru te se mogu vezati i utjecati na regije za kontrolu transkripcije DNA ili malih RNA te tako potiču ekspresiju specifičnih gena. Receptori za estrogen nalaze se u različitim tkivima: središnji živčani sustav uključujući os hipotalamus-hipofiza, spolne žlijezde, reproduktivni trakt, posteljica, mliječne žlijezde, kosti, gastrointestinalni trakt i pluća. Na temelju navedenog fitoestrogeni mogu ostvarivati tkivno specifične hormonalne učinke. Fitoestrogeni, osim što se vežu na estrogenske receptore, imaju i druge biološke učinke koji nisu posredovani tim receptorima: aktivacija serotoninergičkih receptora, aktivacija IGF-1 receptora, vezanje slobodnih radikala, indukcija DNA metilacije, utječu na brojne unutarstanične regulatore staničnog ciklusa i apoptoze ( tirozin kinazu, cAMP/protein kinazu A, cGMP/NO, fosfatidilinozitol-3 kinazu/Akt i MAP kinaze, transkripciju faktora NF- $\kappa$ B). Navedeni biološki učinci su odgovorni za antioksidativni, antiproliferacijski, antimutageni i antiangiogeni učinak fitoestrogena i njihovu sposobnost promicanja zdravlja čovjeka i njegove dugovječnosti (Sirotkin 2014).

Estrogen ima važnu ulogu u održavanju gustoće kostiju regulirajući stvaranje i resorpciju kosti. Budući da se tijekom menopauze nalaze niže razine estradiola u cirkulaciji, kalcij se oslobađa iz kosti u krvnu plazmu što vodi do osteoporoze. Na temelju rezultata većine provedenih studija zaključuje se da su fitoestrogeni donekle učinkoviti u održavanju mineralne gustoće kosti kod žena u postmenopauzi. Nadalje, kod žena u postmenopauzi kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti u SAD-u. Estrogen može utjecati na vaskularni sustav direktno preko estrogenskih receptora smještenih u vaskularnom tkivu ili neizravno promjenom lipoproteinskog profila (Cornwell i sur., 2004). Epidemiološke studije ukazuju da prehrambeni unos soje, koja je ujedno i najbogatiji izvor fitoestrogena izoflavona, može doprinijeti smanjenoj učestalosti kardiovaskularnih bolesti i tromboembolijskih događaja te smanjenju stope smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti (Sirotkin 2014).

Izloženost žena fitoestrogenima poput izoflavoni, kumestani, lignani u razdoblju prije i nakon menopauze može smanjiti simptome menopauze koji se pojavljuju zbog smanjene endogene proizvodnje estrogena uključujući valunge, vazomotorne simptome, vaginalnu atrofiju i druge, dok nije uočen negativan učinak fitoestrogena na funkciju dojke i endometrija. Prema radu Bedell i sur. (2012) unos lignana ne povećava rizik od zgrušavanja krvi kod žena u

postmenopauzi za razliku od hormonske terapije, stoga fitoestrogenski dodaci prehrani mogu poslužiti kao opcija liječenja za pacijentice koje imaju kontraindikacije za primjenu hormonske terapije. Nedostatak estrogena nakon menopauze rezultira atrofijom kože i ubrzanim starenjem kože. Također, nedostatak estrogena smanjuje obranu od oksidativnog stresa te koža postaje tanja, a smanjenjem sadržaja kolagena, utječe na elastičnost i vaskularnost, tako da se povećavaju bore i suhoća kože. Fitoestrogeni mogu usporiti učinak starenja kože putem estrogenskih receptora ili povećanjem proizvodnje kolagena, hijaluronske kiseline odnosno poticanjem proliferacije, vaskularizacije, zaštite od oksidativnog stresa i apoptoze (Sirotkin 2014).

Prema dostupnim literaturnim podacima sojin genistein ispoljava supresivni učinak na pretilost i dijabetes tip 2 inhibicijom životnog ciklusa adipocita, tako da dodatno može povećati HDL i smanjiti koncentraciju LDL u ljudskoj plazmi. Stoga je sojin genistein preporučan kao učinkovita sastavnica u poboljšanju metabolizma i liječenje metaboličkih poremećaja (Sirotkin 2014).

Enterodiol i enterolakton koji nastaju iz lignana lanenog sjemena pokazuju antikancerogenu aktivnost. Epidemiološke studije su pokazale opravdanost preporuka za njihovu preventivnu i terapijsku uporabu u hormonski ovisnim tumorima (Sirotkin 2014).

### **1.3. METODE ZA ODREĐIVANJE POLIFENOLNIH SASTAVNICA**

Danas se različite analitičke tehnike koriste za određivanje polifenolnih sastavnica, a najčešće se primjenjuju kromatografske (Mornar i sur., 2019). Prikladne kromatografske tehnike su slijedeće:

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) u kombinaciji s različitim sustavima za detekciju je glavni izbor za određivanje polifenolnih sastavnica. Najčešće korišten sustav za detekciju je detektor s nizom dioda (engl. *Diode-Array Detector*, DAD). Nedostatak ovog detektora je niska specifičnost i osjetljivost što dovodi do dugog vremena analize i mogućnosti interferencija matrice uzorka (Mornar i sur., 2019). U primjeni postojećih i razvoju novih metoda osim DAD detektora koriste se elektrokemijski detektor (engl. *Electrochemical detector*, ECD) te maseni detektor (engl. *Mass Spectrometry Detector*, MS) (Bayram i sur., 2012).

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je dokazano specifična i osjetljiva tehnika za određivanje polifenola u dodacima prehrani, a glavni nedostatak je što zahtijeva naporan i dugotrajan korak derivatizacije prije analize uzorka (Mornar i sur., 2012).

Od ostalih separacijskih tehnika za određivanje polifenolnih sastavnica sve se više koristi kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary electrophoresis*, CE) zbog visoke učinkovitosti razdvajanja, visoke rezolucije, kratkog vremena analize te male potrošnje uzorka i reagensa (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

#### **1.4. ANTIOKSIDANSI**

Antioksidans je tvar koja kada je prisutna čak i u malim koncentracijama, u usporedbi s molekulom koja oksidira, može odgoditi, usporiti ili inhibirati oksidaciju te molekule. Klasifikacija antioksidansa se temelji na njihovom načinu djelovanja odnosno mehanizmu zaštite. Autooksidaciju pokreću neke radikalne vrste  $X\bullet$  reagirajući sa supstratom RH pri čemu nastaje alkilni radikal  $R\bullet$  koji dalje reagira s kisikom stvarajući peroksilni radikal  $ROO\bullet$  (inicijacija). Nakon toga, peroksilni radikal  $ROO\bullet$  napada drugu molekulu supstrata dajući hidroperoksid  $ROOH$  (oksidirani supstrat) i drugi radikal čime se uspostavlja lančana reakcija (propagacija). Lančana reakcija se odvija tijekom mnogih ciklusa (propagacija) prije nego se dva radikala slučajno ugase (terminacija) (Amorati i Valgimigli, 2015).

Spojevi koji mogu narušiti prethodno opisanu lančanu reakciju se nazivaju izravni antioksidansi, a oni se dalje dijele na dvije manje grupe. Preventivni antioksidansi ometaju postupak inicijacije kao takav primjer je enzim katalaza i metalni kelatori kao što je fitinska kiselina. Antioksidansi koji prekidaju lanac (engl. *Chain-breaking antioxidants*), poznati kao i hvatači radikala (engl. *Radical-trapping antioxidants*, RTA), reagiraju s peroksilnim radikalima brže nego što oni napadnu oksidirani supstrat i na taj način usporavaju ili blokiraju autooksidaciju (Amorati i Valgimigli, 2015).

Mnogi antioksidansi porijeklom iz hrane ne pokazuju antioksidativno djelovanje, ali unatoč tome oni povećavaju antioksidativnu obranu u biološkom sustavu na neizravan način izazivanjem ekspresije antioksidativnih enzima poput glutation reduktaze i glutation peroksidaze. Stoga se oni klasificiraju kao neizravni antioksidansi jer djeluju samo povećavanjem endogenih antioksidansa (Amorati i Valgimigli, 2015).

Antioksidativne sastavnice u hrani igraju važnu ulogu kao zaštitni čimbenik zdravlja. Smanjuju rizik od kroničnih bolesti kao što su karcinom i koronarne bolesti. Glavni izvor prirodnih antioksidansa su cjelovite žitarice, voće i povrće. Antioksidansi iz hrane biljnog izvora poput vitamina C, vitamina E, karotenoidi, fenolnih kiseline, fitata i fitoestrogena imaju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala. Ovi slobodni radikali mogu oksidirati nukleinske kiseline, proteine, lipide ili DNA i tako prouzročiti degenerativne bolesti (Plank i sur., 2012).

## 1.5. METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti općenito se mogu podijeliti u 2 glavne skupine: (i) metode temeljene na reakciji prijenosa atoma vodika (engl. *Hydrogen atom transfer*, HAT) i (ii) metode temeljene na reakciji prijenosa elektrona (engl. *Single electron transfer*, SET) (Gulcin 2020).

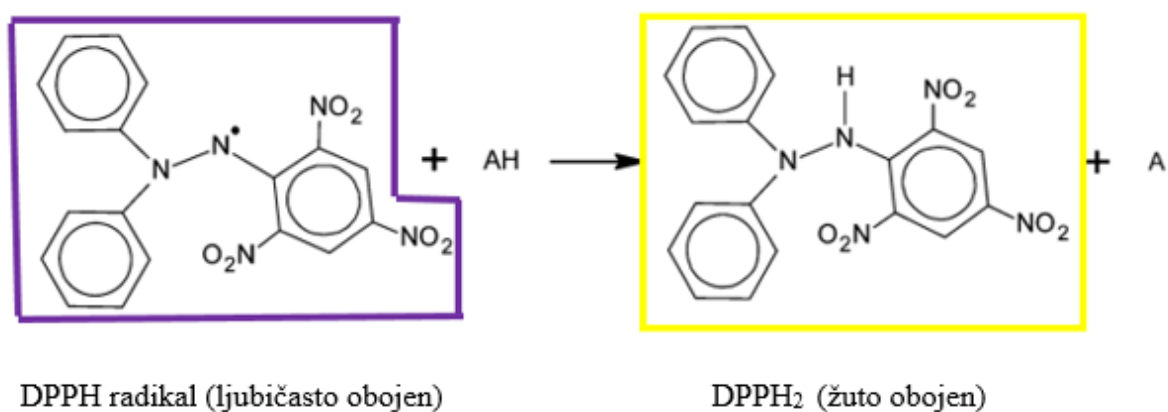
HAT metode mjere mogućnost antioksidansa u uklanjanju radikala doniranjem atoma vodika. HAT reakcije su neovisne o otapalu i pH te jako brze u trajanju od nekoliko sekundi do nekoliko minuta (Gulcin 2020). Primjeri HAT metode su slijedeće: ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TRAP (*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*) i metoda izbjeljivanja krocina (engl. *Crocin Bleaching Assay*). ORAC metoda se često koristi za procjenu antioksidativne aktivnosti u vodi topljivih spojeva. Metoda se temelji na reakciji slobodnih radikala s fikoeritrin fluorescentnom probom što dovodi do smanjenja intenziteta fluorescencije. Slobodni radikali su dobiveni generiranjem *in situ*, a u prisutnosti antioksidativnog spoja inhibira se gašenje fluorescencije. TRAP metoda je jedna od prvih korištenih metoda za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta krvne plazme ili seruma. U ovoj metodi sudjeluju peroksilni radikali dobiveni termolizom AAPH i tvari koje se peroksidiraju, a nalaze se u plazmi ili u drugim biološkim tekućinama. Nakon što se AAPH doda u plazmu, sastavnice plazme se oksidiraju, a to se prati mjerenjem potrošnje kisika na površini elektrode. Metoda izbjeljivanja krocina određuje antioksidativni kapacitet uzorka koristeći krocina kao fluorescentni marker. Krocina je prirodni karotenoid koji otopljen u vodi tvori narančastu otopinu. Dodavanjem AAPH radikala u otopinu krocina dolazi do izbjeljivanja, a u prisutnosti antioksidansa dolazi do smanjenja brzine izbjeljivanja. Antioksidativna učinkovitost se izračunava kao funkcija inhibicije izbjeljivanja (Litescu i sur., 2010).

SET metode se koriste za procjenu sposobnosti antioksidansa da reducira određeni oksidans. Ove reakcije su uglavnom spore i zahtijevaju duže vremena za odvijanje. Metode temeljene na SET koje se koriste za mjerenje antioksidativnog kapaciteta su: FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), TEAC (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda. FRAP metoda se temelji na sposobnosti antioksidansa da pri niskom pH reducira žuti kompleks željeza(III) sa tripiridiltriazinom (TPTZ). Redukcija feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) iona u fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ione rezultira intenzivno plavo obojenim kompleksom Fe(II)-TPTZ što se prati spektrofotometrijski. TEAC metoda određuje antioksidativni kapacitet uzorka proučavajući promjene u specifičnoj apsorpciji ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin- 6-

sulfonat) radikal-kationa. Mjeri se obezbojenje plavo-zelene boje  $ABTS^{*+}$  u prisustvu antioksidansa (Litescu i sur., 2010).

### 1.6. DPPH

DPPH metodu je razvio Blois 1958. godine. Primjenom ove metode određuje se antioksidativna aktivnost različitih spojeva i smjesa sastavnica korištenjem stabilnog slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (Kedare i Singh, 2011). DPPH je ljubičasto obojen dušikov radikal, koji se za razliku od drugih dostupnih radikala ne mora aktivirati prije ispitivanja poput ABTS radikala. Kada je ovaj radikal u prisutnosti antioksidansa (redukcijski spoj) dolazi do promijene ljubičaste boje u žutu boju odgovarajućeg hidrazina (Slika 3.). Redukcija moć antioksidansa se može procijeniti praćenjem smanjenja apsorbancije DPPH radikala na valnim duljinama od 515 do 528 nm zbog nastanka hidrazina  $DPPH_2$  koji daje žuto obojenu otopinu. Također, redukcijska sposobnost antioksidansa se može procijeniti i pomoću elektronske spinske rezonancije. Antioksidativna aktivnost uzorka izražava se kao ekvivalenti standarda poznatog antioksidansa (Trolox, vitamin C) te  $IC_{50\%}$ , odnosno  $EC_{50\%}$  (Pyrzynska i Pećal, 2013).



Slika 3. Reakcija DPPH radikala s antioksidansom (preuzeto i prilagođeno prema Pyrzynska i Pećal, 2013)

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Broj dodataka prehrani koji sadrže fitoestrogenske sastavnice u stalnom je porastu zbog njihovog preventivnog i terapijskog djelovanja na ljudsko zdravlje. Budući da soja, lan, crvena djetelina, hmelj i konopljika predstavljaju bogat izvor ovih biološki aktivnih sastavnica, veliki broj tržišno dostupnih dodataka prehrani sadrži njihove ekstrakte kao glavne aktivne tvari. Nadalje, ekstrakti navedenih biljnih vrsta pored fitoestrogena sadrže značajne količine ostalih skupina polifenola koji imaju izraženu aktivnost u hvatanju slobodnih radikala tako da je cilj ovog rada bio:

- (i) procijeniti kvalitetu ispitivanih dodataka prehrani koji sadrže lan, crvenu djetelinu, hmelj i konopljiku 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.

Treba istaknuti da je ovaj diplomski rad nastavak istraživanja o hrani i formuliranim dodacima prehrani koji sadrže fitoestrogenske sastavnice na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova. U okviru navedenog istraživanja prethodno su analizirani dodaci prehrani koji sadrže soju.



### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. MATERIJALI**

#### **3.1.1. Kemikalije i reagensi**

- Folin-Ciocalteu fenolni reagens (Fluka, Buchs, Švicarska)
- Galna kiselina, certificirani referentni materijal (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Bezvodni natrijev karbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 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)
- Metanol čistoće za tekućinsku kromatografiju (98-100%) (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Ultračista voda dobivena korištenjem sustava za pročišćavanje WaterPro (Labconco, Kansas City, MI, SAD) otpornosti 18,2 MΩ cm (25 °C)

#### **3.1.2. Uzorci**

U ovom radu analizirano je 12 formuliranih dodataka prehrani koji sadrže ekstrakte konopljike (DP1-DP5), crvene djeteline (DP6-DP7), hmelja (DP8-DP10) i lana (DP11). Jedanaest analiziranih dodataka prehrani su monopreparati (DP1-DP11) prethodno navedenih biljnih vrsta, a jedan uzorak je sadržavao ekstrakt više biljnih vrsta, višekomponentni preparat hmelja i crvene djeteline (DP12). Dodaci prehrani analizirani u ovom radu bili su u više dozirnih oblika uključujući tekuće ekstrakte (2 uzorka), tablete (4 uzorka) i kapsule (6 uzorka). Svi prikupljeni dodaci prehrani dostupni su na tržištu Republike Hrvatske, a njihov detaljan popis i opis te nazivi njihovih proizvođača prikazani su u Tablici 1.

#### **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 1. Popis uzoraka (prilagođeno prema Mornar i sur., 2020)

Redni broj	Naziv dodatka prehrani	Proizvođač	Oblik	Biljka	Sadržaj
1.	Vitex	Solaray, Park City, UT, SAD	želatinska kapsula	Konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	Plod konopljike 400 mg
2.	Natural Max, Premenstrual Solutio	Natural Balance, Englewood, CO, SAD	Fast-caps® kapsula	Konopljika - <i>Vitex-agnus-castus</i> (L.)	Ekstrakt ploda konopljike 100 mg
3.	Evine kapi	Suban d.o.o. Strmec, Hrvatska	kapi	Konopljika - <i>Vitex-agnus-castus</i> (L.)	Vodenoalkoholni ekstrakt ploda konopljike
4.	Vitex Solutio	Specchiasol S.r.l., Bussolengo, Italija	tinktura	Konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	Vodenoalkoholni ekstrakt cvijeta konopljike
5.	Vitality For Women	Kal, Park City, UT, SAD	tableta	Konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	Plod konopljike 50 mg
6.	Feminal	Jadran-Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska	kapsula	Crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> (L.)	100 mg ekstrakta crvene djeteline sa 40% izoflavona
7.	Red Clover Blossoms	Solaray, Park City, UT, SAD	želatinska kapsula	Crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> (L.)	Cvijet crvene djeteline 375 mg
8.	Cirkulin Valerijana	Roha Arzneimittel GmbH, Bremen, Germany	filmom obložena tableta	Hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (L.)	40 mg suhog ekstrakta cvijeta hmelja, ekstrakcijsko otapalo: voda
9.	Bonisan	Dietpharm, Rakitje, Hrvatska	kapsula	Hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (L.)	Suhi ekstrakt cvijeta hmelja 50 mg
10.	Belmiran San	Belupo, Koprivnica, Hrvatska	filmom obložena tableta	Hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (L.)	Suhi ekstrakt cvijeta hmelja 30 mg
11.	Fem Flax	Palmer Natural Products, Star, ID, SAD	kapsula	Lan - <i>Linum usitatissimum</i> (L.)	Lignan sekoizolaricirezinol diglukozid, 30-60 mg/g
12.	Menopause	Helvetia Direct Marketing s.r.o., Prag, Češka Republika	tableta	Hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (L.) i crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> (L.)	Ekstrakt hmelja (50 µg 8-prenilnaringenin) 375 mg, crvena djetelina (20 izoflavona) 50 mg

#### **3.1.4. Pribor i posuđe**

- 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  $\mu\text{m}$  (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 pore 0,45  $\mu\text{m}$  i promjera 25 mm (Macher-Nagel, Duren, Njemačka)
- Injekcijski PTFE filteri *Chromafil® Xtra PTFE-20/13*, veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$  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

#### **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 uzorka**

Za određivanje prosječne mase jedne tablete izvagano je 10 tableta uzorka dodataka prehrani. Nakon toga, tablete su fino usitnjene u tarioniku i uzorak homogeniziran u fini prah koji se koristio u daljnjim ispitivanjima. Zatim je izvagan sadržaj deset kapsula te izračunata prosječna masa jedne kapsule.

#### **3.2.2. Postupak ekstrakcije**

U Falcon epruvete od 15 mL odvagana je odgovarajuća masa uzorka ( $25 \pm 2$  mg) i dodano 10 mL smjese metanol:ultračista voda (80:20, vol/vol). Zatim je sadržaj epruvete promućkan na vorteks mješalici (ZX3, VELP Scientifica, Usmate, Italija) te postavljen u ultrazvučnu kupelj Elmasonic X-tra (Elma, Singen, Njemačka) tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon postupka centrifugiranja (Hermle Z 306, Wehingen, Njemačka) na 3000 g 10 minuta pri 25 °C

dobivena je bistra otopina. Prije analize supernatant je filtriran kroz Chromafil membranski filter veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka).

### **3.2.3. Priprema standardnih i radnih otopina**

U smjesi metanol:ultračista voda (80/20, vol/vol) otopljena je prikladna masa galne kiseline i na taj način pripremljen standardna otopine galne kiseline (2 mg/mL). Standardna otopina TROLOX-a u koncentraciji od 1 mM pripremljena je u metanolu. Sve standardne otopine čuvane su u tamnim odmjernim tikvicama klase A volumena 25 mL u hladnjaku pri 4 °C. Radne otopine su pripremljene nizom razrjeđenja odgovarajućim otapalom neposredno prije mjerenja. Isto tako neposredno prije upotrebe je pripremljena i otopina DPPH radikala tako da je prethodno izvagano 25 mg DPPH te otopljeno u metanolu korištenjem tamne odmjerne tikvice klase A volumena 25 mL.

### **3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja polifenola**

Koncentracija ukupnih polifenola u ispitivanim uzorcima određena je Folin-Ciocalteu metodom (Singleton i sur., 1999). U odmjernu tikvicu klase A volumena 5 mL otpipetirano je 0,20 mL pripremljenog metanolnog ekstrakta te razrijeđeno ultračistom vodom do 2,5 mL. Nakon toga, u istu odmjernu tikvicu dodano je 0,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa te nakon 3 minute 0,5 mL 10% natrijevog karbonata. Tako dobivena otopina snažno je promiješana na vorteks miješalici (ZX3, VELP Scientifica, Usmate, MB, Italija) te nadopunjena ultračistom vodom do oznake. Reakcijska smjesa je ostavljena na tamnom mjestu i nakon inkubacije od 2 sata pri sobnoj temperaturi izmjerena apsorbancija na 740 nm korištenjem UV-VIS spektrofotometra (model Lambda 25, Perkin-Elmer, Waltham, MA, SAD). Slijepa proba je pripremljena prema propisu na način da je umjesto 0,20 mL metanolnog ekstrakta otpipetiran jednak volumen smjese metanola:ultračista voda (80:20, vol/vol). Količina ukupnih polifenola određena je korištenjem kalibracijske krivulje standarda galne kiseline, a za izradu navedene krivulja pripremljene su otopine galne kiseline na 5 koncentracijskih razina (raspon 0,4- 6,0  $\mu\text{g/mL}$ ;  $r = 0,9999$ ). Sadržaj ukupnih polifenola je izražen kao ekvivalent galne kiseline (GAE, engl. *Gallic acid equivalent*) odnosno kao mg GAE/g uzorka.

### **3.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti**

Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određena je primjenom HPLC-DPPH metode. Ukratko objašnjeno, u Eppendorf epruvetu otpipetirano je 400  $\mu\text{L}$  DPPH otopine i 1 mL prethodno pripremljenog ekstrakta uzorka. Dobivena smjesa je snažno promiješana pomoću vorteks miješalice i ostavljena na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi 30 minuta. Zatim je reakcijska otopina filtrirana kroz membranski filter veličine pora 0,20  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel,

Düren, Njemačka) u HPLC vijale od tamnoga stakla. Kromatografska analiza provedena je u Dionex kromatografskom sustavu (Sunnyvale, California, SAD) koji sadrži automatski ASI 100 injektor uzorka, P680 crpku, UVD170S detektor, TCC-100 termostatiranu pećnicu te Chromeleon 6,8 softver (Dionex, Sunnyvale, CA, SAD). Za potrebe ove analize korišteni su kromatografski uvjeti iz istraživanja Chandrasekar i sur. (2006) koji su pri tom prilagođeni. Stacionarna faza je bila XBridge C18 kolona (dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5  $\mu\text{m}$ ), a uz nju je još korištena i pripadna predkolona. Kao mobilna faza korištena je smjesa metanol:ultračista voda (80:20, vol/vol). Tijekom analize provedena je izokratična elucija uz protok od 1 mL/min te je održavana stalna temperatura od 25 °C. Injektirano je 20  $\mu\text{L}$  uzorka u prethodno navedeni sustav te mjerena apsorbancija na 517 nm. Analiza je trajala u vremenu od 5 minuta, a svaki uzorak je pripremljen i analiziran u triplikatu.

Antioksidativna aktivnost uzorka određena je iz razlike površine pika otopine DPPH radikala i otopine DPPH radikala nakon reakcije s ekstraktom uzorka. Za izradu kalibracijske krivulje standarda korištene su otopine sintetskog antioksidans TROLOX pripremljene na 6 koncentracijskih razina u rasponu od 0,05 do 0,3 mM. Rezultati su određeni korištenjem kalibracijske krivulje, a izraženi kao ekvivalent TROLOX-a (engl. *Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity*, TEAC) odnosno kao mM TEAC/g uzorka.

### **3.2.6. Statistička obrada podataka**

Podaci dobiveni mjerenjima prema prethodno opisanim metodama analizirani su primjenom deskriptivne statistike. Provedena je analiza normalnosti raspodjele za sve varijable, a varijable s normalne raspodjelom su prikazane aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Za potrebe ispitivanja potencijalne razine povezanosti između pojedinih varijabli određen je Pearsonov koeficijent povezanosti. Tako je p-vrijednost manja od 0.05 smatrana statistički značajnom razlikom, a p-vrijednost manja od 0.01 je uzeta kao statistički vrlo značajna razlika. Za obradu svih eksperimentalnih podataka korišten je računalni program STATISTICA v. 12.1 od StatSoft® (Tulsa, OK, SAD).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. UKUPNI SADRŽAJ POLIFENOLA U DODACIMA PREHRANI

Polifenolne sastavnice kao biološki aktivni spojevi nalaze se u hrani biljnog porijekla u malim količinama, a postupkom ekstrakcije izoliraju se iz biljnog materijala. Nakon toga, dobiveni ekstrakti koriste se u proizvodnji formuliranih dodataka prehrani. Ukupni sadržaj polifenola u dodacima prehrani koji sadrže lan, crvenu djetelinu, hmelj i konopljiku određen je na temelju vrijednosti apsorbancija uzoraka korištenjem kalibracijske krivulje standarda galne kiseline, a rezultati su izraženi kao mg galne kiseline po g uzorka. Prije mjerenja apsorbancije, za ekstrakciju polifenolnih sastavnica iz uzoraka dodataka prehrani korištena je smjesa metanola:ultračista voda (80:20 vol/vol). Prilikom izrade 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 koji je razrijeđen s ultračistom vodom u omjeru 1:10. Funkcionalnost ispitivanih dodataka prehrani koji sadrže ekstrakte prethodno navedenih biljnih vrsta procijenjena je s o obzirom na ukupni sadržaj polifenola. Dobiveni rezultati ukupnog sadržaja polifenola, izraženi kao ekvivalent galne kiseline (GAE), u uzorcima dodataka prehrani bili su u intervalu vrijednosti 2,340 (DP4 – monopreparat konopljike) do 28,064 (DP5 – monopreparat konopljike) mg GAE/g uzorka (Tablica 2). Pregledom literature utvrđen je nedostatak podataka o sadržaju polifenola u dodacima prehrani koji sadrže lan, hmelj i konopljiku primjenom prethodno opisane metode, dok su Romani i sur. (2010) u svom radu istraživali sadržaj polifenola u dodacima prehrani koji sadrže crvenu djetelinu. Na temelju dobivenih rezultat uzorak DP7 (24,256 mg GAE/ g) koji sadrži ekstrakt crvene djeteline bio je u skladu s literaturnih vrijednosti gore navedenih autora (2,96 g/ 100 g). S druge strane, Kroyer i sur. (2004) u svom su radu odredili značajno veći sadržaj ukupnih polifenola u jednom monopreparatu crvene djeteline ( $113,9 \pm 3,3$  mg/g) u usporedbi s dobivenim rezultatima u ovom radu. Ova se razlika može lako razumjeti jer su autori analizirali komercijalno dostupan proizvod označen kao visoko koncentriran proizvod izoflavona, što ukazuje da je proizvod obogaćen.

No gledajući sve dodatke prehrani, uključujući prethodna istraživanja (Brletić, 2021), sadržaj polifenola u dodacima prehrani koji sadrže samo soju (srednja vrijednost: 24,686 mg GAE/ g) (Brletić, 2021) bio je veći nego u ispitivanim monopreparatima u ovom radu (srednja vrijednost: 12,957 mg GAE/ g).

Kada se promatra sadržaj ovih sekundarnih metabolita u monopreparatima treba istaknuti da je dobivena vrijednost bila veća u čvrstim dozirnim oblicima u intervalima od 7,24 mg GAE/g (DP11; monopreparat lan) do 28,064 mg GAE/g (DP5 – monopreparat konopljike). Općenito, najveća



vrijednost postignuta je za dodatke prehrani koji sadrže ekstrakt crvene djeteline (srednja vrijednost:  $18,69 \pm 7,87$  mg GAE/g), zatim konopljike (srednja vrijednost:  $12,82 \pm 11,33$  mg GAE/g) i hmelja (srednja vrijednost:  $11,02 \pm 4,14$  mg GAE/g). Dodaci prehrani u tekućem obliku, kao monopreparati, pokazali su nešto niže vrijednosti (srednja vrijednost: 3,262 mg GAE/g) nego preparati čvrstih dozirnih oblika bez obzira na porijeklo biljnog ekstrakta.

Tablica 2. Ukupni sadržaj polifenola u dodacima prehrani koji sadrže lan, crvenu djetelinu, hmelj i konopljiku određen Folin-Ciocalteuovom metodom

Uzorak	Oblik	Dnevna doza (broj jediničnog oblika)	Ukupni sadržaj polifenola (mg GAE/g uzorka)	Ukupni sadržaj polifenola u jediničnom dozirnom obliku (mg GAE)	Ukupni sadržaj polifenola u preporučenom dnevnom unosu (mg GAE)
DP1	želatinska kapsula	2	8,087	3,284	6,567
DP2	Fast-caps® kapsula	1	21,411	12,076	12,076
DP3	kapi	30	4,184		
DP4	tinktura	-	2,340		
DP5	tableta	2	28,064	51,945	103,889
DP6	kapsula	1	13,123	1,873	1,873
DP7	želatinska kapsula	1	24,256	9,846	9,846
DP8	filmom obložena tableta	1	15,751	8,895	8,895
DP9	kapsula	2	9,237	5,426	10,852
DP10	filmom obložena tableta	1	8,060	3,430	3,430
DP11	kapsula	6	7,240	4,977	29,862
DP12	tableta	1	13,727	13,429	13,429

Također, literaturni podaci o sadržaju ukupnih polifenola u višekomponentnim dodacima prehrani dosta su ograničeni. Višekomponentni dodaci prehrani soje i drugih biljnih vrsta (rasponu od 16,117 mg/g uzorka do 36,416 mg GAE/g uzorka) (Brletić, 2021) imali su veći

sadržaj polifenola u odnosu na ispitivani višekomponentni preparat hmelja i crvene djeteline (DP12).

Prema našim spoznajama, dostupni literaturni podaci o sadržaju ukupnih polifenola u dodacima prehrani usredotočeni su na sadržaj polifenola prema masi uzorka (Kroyer i sur., 2004; Romani i sur., 2010). Ove su informacije korisne za procjenu kvalitete biljnog materijala koji se koristi u proizvodnji dodataka prehrani. Naša prethodna istraživanja su pokazala da sadržaj aktivne tvari po jediničnom obliku ili dnevni unos primjenom preporučene doze može korisno pridonijeti bolesnikovom odabiru odgovarajućeg dodatka prehrani (Mornar i sur., 2013; Mornar i sur., 2020).

Uzimajući u obzir prosječnu masu pojedinačne tablete ili kapsule, unos polifenola nakon uzimanja jediničnog dozirnog oblika bio je u širokom rasponu od 1,873 mg GAE (DP6) do 51,945 mg GAE (DP5), kako je prikazano u Tablici 2. Prema preporukama proizvođača, uočena je velika razlika u preporučenim dozama analiziranih dodataka prehrani (do 6 čvrstih oblika doziranja (DP11) ili 30 kapi za tekući ekstrakt (DP4)). Stoga je dnevni unos polifenola koji bi bolesnici unosili da slijede preporuke proizvođača o preporučenoj dnevnoj dozi varirala u rasponu od 1,873 (DP6) – 103,889 (DP5) mg GAE/ dan za odraslu populaciju. Na temelju dobivenih rezultata za sadržaj ukupnih polifenola u preporučenoj dnevnoj dozi analizirani uzorci se mogu podijeliti u tri kategorije (i) 1 – 10 mg polifenola (5 uzoraka), (ii) 10 – 100 mg polifenola (4 uzorka) i (iii) > 100 mg polifenola (1 uzorak). Treba istaknuti da za dva uzorka u tekućem obliku (kapi i tinktura) nije određen ukupni sadržaj polifenola u jediničnom dozirnem obliku niti ukupni sadržaj polifenola u preporučenom dnevnom unosu.

Dnevni unos samo jednog proizvoda (DP5; dnevna doza od 2 tablete sadrži ukupno 103,9 mg polifenola) u preporučenoj dozi mogao bi pokriti više od 100 mg polifenola. Međutim, navedeni proizvod sadržavao je i druge biološki aktivne tvari (vitamini: A, C, D3, E, B skupina; minerali: Ca, Mg, Se, Fe, Mn, Cu, Zn, Cr, I, K, Mo; CoQ10 i ekstrakt zelenog čaja) koji svakako mogu pridonijeti iznimno visokoj vrijednosti sadržaju ukupnih polifenola uzorka DP5.

Konačno, bolesnici trebaju biti svjesni da visoka preporučena dnevna doza navedena na proizvodu može dovesti u zabludu o visokom sadržaju ukupnih polifenola. Takav je primjer uzorak DP11 s visokom preporučenom dnevnom dozom od 6 kapsula podijeljenih u dvije doze, čijom primjenom je dnevni unos samo umjerenih 29,9 mg/dan. Slični zaključci mogu se izvući za tekuće pripravke koji, unatoč visokim dnevnim dozama (30 kapi), nadopunjuju prehranu bolesnika niskim dnevnim količinama polifenola (nižim od 6,28 mg/dan).

#### 4.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST DODATAKA PREHRANI

Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određena je gore opisanom HPLC-DPPH metodom. Ukratko, primjenjivana metoda se temelji na redukciji stabilnog slobodnog radikala DPPH u interakciji s antioksidansom tako da kromogeni radikal prihvaća atom vodika pri čemu nastaje neradikalni oblik DPPH<sub>2</sub>. DPPH radikal ima apsorpcijski maksimum na 517 nm, stoga se antioksidativno djelovanje može procijeniti praćenjem smanjenja vrijednosti apsorbancije pri navedenoj valnoj duljini. Prije određivanja antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka kromatografskom metodom bilo je potrebno utvrditi valjanost metode postupkom validacije. Linearnost metode je ispitana analizom reakcijske smjese DPPH radikala i TROLOX standarda u rasponu koncentracija od 0,05 do 0,3 mM. Koeficijent korelacije ( $r = -0,9995$ ) i koeficijent determinacije ( $R^2 = 0,9991$ ) linearne regresije standardne krivulje veći su od 0,999 što upućuje na zadovoljavajuću linearnost metode. Točnost metode ispitana je računanjem analitičkog prinosa na tri različite koncentracijske razine TROLOX-a u triplikatu. Dobiveni rezultati analitičkog prinosa iznosili su  $97,5\% \pm 2,1\%$  za 0,05 mM,  $103,9\% \pm 0,15\%$  mM i  $99,1\% \pm 1,4\%$  za 0,30 mM standardne otopine TROLOX. Ponovljivost metode ispitana je nizom ponovljenih mjerenja ( $n=3$ ) injektiranjem reakcijske smjese DPPH i standardnih otopina tijekom tri uzastopna dana. Preciznost, izražena kao 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%. Navedeni rezultati pokazuju da je kromatografska metoda valjana i prikladna za određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka.

Oksidativni stres u stanica, koji nastaje kao posljedica nakupljanja slobodnih radikala u stanica, ima za posljedicu nastanak kroničnih bolesti poput karcinoma i koronarnih bolesti te niza drugih bolesti. Antioksidansi biljnog podrijetla uspješno uklanjaju slobodne radikale te imaju preventivno i terapijsko djelovanje na ljudsko zdravlje smanjujući rizik od razvoja bolesti. Iz tog razloga je važno odrediti antioksidativnu aktivnost dodataka prehrani koji sadrže jednu ili više biljnih vrsta. U Tablici 3. prikazane su antioksidativne aktivnosti uzoraka dodataka prehrani koji sadrže lan, crvenu djetelinu, hmelj i konopljiku određene HPLC-DPPH.

Dobiveni rezultati antioksidativne aktivnosti, izraženi kao ekvivalenti TROLOX-a (TEAC), u uzorcima dodataka prehrani bili su u intervalu vrijednosti od 21,299 (DP4) do 163,225 (DP5) mM TEAC/g uzorka. Dobiveni rezultati mogu se usporediti s rezultatima iz rada Brletić (2021) gdje je antioksidativna aktivnosti u dodacima prehrani koji sadrže soju bila u intervalu vrijednosti od 61,288 mM TEAC/ g uzorka do 208,495 Mm TEAC/ g uzorka. Iz navedenih vrijednosti je vidljivo da dodaci prehrani koji sadrže soju imaju veću antioksidativnu aktivnost.

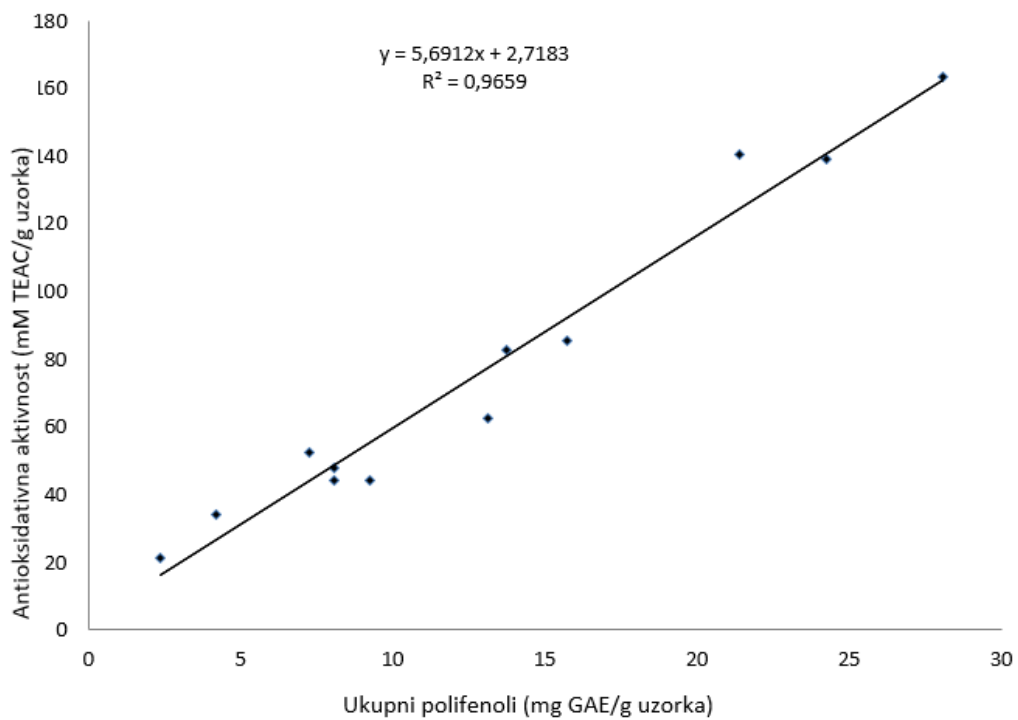
Usporedbu rezultata ovog rada s onim dobivenim od drugih autora je dosta teško provesti zbog razlike u pripremi uzorka i načinu izražavanja rezultata. Tako su Kroyer i sur. (2004) izražavali rezultat kao EC<sub>50%</sub> vrijednost, a Romani i sur. (2010) kao IC<sub>50%</sub> vrijednost koje se mogu definirati kao količina antioksidansa potrebna za smanjenje početne koncentracije DPPH za 50%.

Tablica 3. Antioksidativna aktivnost dodataka prehrani koji sadrže lan, crvenu djetelinu, hmelj i konopljiku određena HPLC-DPPH metodom

Uzorak	Odvaga uzorka (mg)	Antioksidativna aktivnost (mM TEAC)	Antioksidativna aktivnost (mM TEAC/g uzorka)
DP1	25,74	0,124	48,045
DP2	25,55	0,359	140,378
DP3	25,51	0,087	34,104
DP4	25,51	0,054	21,299
DP5	25,18	0,411	163,225
DP6	25,42	0,159	62,549
DP7	25,65	0,356	138,921
DP8	25,77	0,220	85,500
DP9	25,47	0,113	44,235
DP10	24,83	0,110	44,167
DP11	25,20	0,132	52,381
DP12	25,56	0,211	82,681

Treba naglasiti da je provedena statistička analiza pokazala statistički značajnu korelaciju između ukupnog sadržaja polifenola i procijenjene antioksidativne aktivnosti ( $r = 0,9828$ ;  $p < 0,01$ ) analiziranih dodataka prehrani (Slika 4).

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu dodaci prehrani koji se primjenjuju kod žena u menopauzi bogat su izvor polifenola, dok je njihovo antioksidativno djelovanje proporcionalno sadržaju ovih sekundarnih metabolita.



Slika 3. Graf korelacije između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti u dodacima prehrani koji sadrže lan, crvenu djetelinu, hmelj i konopljiku

## **5. ZAKLJUČAK**

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

- 1) Ispitivani dodaci prehrani koji sadrže ekstrakt lana, crvene djeteline, hmelja i konopljike dobar su izvor polifenolnih sastavnica.
- 2) Antioksidativna aktivnost analiziranih dodataka prehrani u skladu je s koncentracijama ovih biološki aktivnih sastavnica.
- 3) Predložena HPLC-DPPH metoda je brza i učinkovita te prikladna za rutinsku analizu uzoraka dodataka prehrani.
- 4) Rezultati ovog rada doprinose boljem razumijevanju sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti fitoestrogenskih dodataka prehrani koji sadrže lan, crvenu djetelinu, hmelj i konopljiku.
- 5) Potrebna su daljnja istraživanja antioksidativne aktivnosti i pojedinih sastavnica polifenola primjenom drugih metoda.
- 6) Isto tako je u istraživanje potrebno uključiti dodatke prehrani koji sadrže druge biljne vrste.

## **6. LITERATURA**



- Amorati R, Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radic Res*, 2015, 49, 633-649.
- Bayram B, Esatbeyoglu T, Schulze N, Ozelik B, Frank J, Rimbach G. Comprehensive Analysis of Polyphenols in 55 Extra Virgin Olive Oils by HPLC-ECD and Their Correlation with Antioxidant Activities. *Plant Foods Hum Nutr*, 2012, 326-336.
- Bedell S, Nachtigall M, Naftolin F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 139, 225-236.
- Brletić I. Određivanje ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti dodataka prehrani koji sadrže soju. Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2021.
- Cornwell T, Cohick W, Raskin I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*, 2004, 65, 995–1016.
- Gašparević-Ivanek, V. Fitoestrogeni. *Medix*, 2003, 9 (50), 90-94.
- Gorzynik-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, Kuban-Jankowska A, Marino Gammazza A, Knap N, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (3), 686.
- Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol*, 2020, 94 (3), 651-715.
- Gupta D. Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *IJPSR*, 2015, 6 (62), 546-566.
- Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 2011, 48 (4), 412-422.
- Kroyer GT. Red clover extract as antioxidant active and functional food ingredient. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 2004, 5, 101-105.
- Lasić K, Mornar A, Nigović B. Quality by Design (QbD) approach for the development of a rapid UHPLC method for simultaneous determination of aglycone and glycoside forms of isoflavones in dietary supplements. *Anal Methods*, 2020, 12, 2082.

- Li G, Zhu Y, Zhang Y, Lang J, Chen Y, Ling W. Estimated daily flavonoid and stilbene intake from fruits, vegetables, and nuts and associations with lipid profiles in Chinese adults. *J Acad Nutr Diet*, 2013, 113 (6), 786-794.
- Litescu SC, Eremia S, Radu GL. Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials. *Bio-Farms for Nutraceutical*, 2010, 18, 241-249.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79 (5), 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.
- Plank DW, Szpylka J, Sapirstein H, Woollard D, Zapf CM, Lee V, Chen CY, Liu RH, Tsao R, Düsterloh A, Baugh S. Determination of antioxidant activity in foods and beverages by reaction with 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH): collaborative study First Action 2012.04. *JAOC Int*, 2012, 95(6), 1562-1569.
- 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.
- Rastija, V. i Medić-Šarić, M. Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kemija u industriji*, 2009, 58 (3), 121-128.
- 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
- 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, Harrath AH. Phytoestrogens and their effects. *Eur J Pharmacol*, 2014, 741, 230-236.
- Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2010, 2 (12), 1231-1246.

## **7. SAŽETAK/SUMMARY**

U posljednje vrijeme provode se mnoga istraživanja radi procjene antioksidativnog djelovanja polifenolnih sastavnica u hrani i dodacima prehrani. Ove biološki aktivne tvari su iznimno cijenjene zbog preventivnog i terapijskog djelovanja na ljudsko zdravlje. Cilj ovog rada bio je procijeniti kvalitetu dodataka prehrani koji sadrže lan, crvenu djetelinu, hmelj i konopljiku obzirom na ukupni sadržaj polifenola te odrediti antioksidativnu aktivnost istih. Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim dodacima prehrani određen je Folin-Ciocalteu metodom, dok je antioksidativna aktivnost istih procijenjena HPLC-DPPH metodom. Ova kromatografska metoda se pokazala brza i ponovljiva te prikladna za rutinsku analizu uzoraka. Ispitivani dodaci prehrani koji sadrže ekstrakte navedenih biljaka dobar su izvor polifenolnih spojeva. Antioksidativna aktivnost analiziranih dodataka prehrani u skladu je sa sadržajem ovih sekundarnih metabolita. Korelacija između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti je statistički značajna, iz čega je vidljivo da je antioksidativno djelovanje proporcionalno koncentraciji ovih bioaktivnih sastavnica. Rezultati ovog istraživanja doprinose boljem razumijevanju sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti dodataka prehrani koji sadrže lan, crvenu djetelinu, hmelj i konopljiku.

Recently, many studies have been conducted to evaluate the antioxidant activity of polyphenolic components in foods and dietary supplements. These biologically active substances are highly valued phytochemicals due to their preventive and therapeutic effects on human health. This study aimed to evaluate the quality of the flax-based, red clover-based, hop-based and chasteberry-based dietary supplements concerning the total polyphenol content and their antioxidant activity. The total polyphenol content in the analyzed dietary supplements was determined by Folin-Ciocalteu method, while the antioxidant activity was estimated by HPLC-DPPH method. This chromatography method has been shown to be fast and reproducible, and suitable for use in routine analysis. The tested dietary supplements containing extracts of these plants are a good source of polyphenolic compounds. The antioxidant activity of the analyzed dietary supplements is in accordance with the content of these secondary metabolites. The correlation between the total polyphenol content and antioxidant activity is statistically significant, and the antioxidant activity is proportional to the concentration of these bioactive compounds. The results of this study contribute to a better understanding of the content of total polyphenols and the antioxidant activity of flax-based, red clover-based, hop-based and chasteberry-based dietary supplements.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost dodataka prehrani kod žena u menopauzi

Ana Perkušić

#### SAŽETAK

U posljednje vrijeme provode se mnoga istraživanja radi procjene antioksidativnog djelovanja polifenolnih sastavnica u hrani i dodacima prehrani. Ove biološki aktivne tvari su iznimno cijenjene zbog preventivnog i terapijskog djelovanja na ljudsko zdravlje. Cilj ovog rada bio je procijeniti kvalitetu dodataka prehrani koji sadrže lan, crvenu djetelinu, hmelj i konopljiku obzirom na ukupni sadržaj polifenola te odrediti antioksidativnu aktivnost istih. Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim dodacima prehrani određen je Folin-Ciocalteu metodom, dok je antioksidativna aktivnost istih procijenjena HPLC-DPPH metodom. Ova kromatografska metoda se pokazala brza i ponovljiva te prikladna za rutinsku analizu uzoraka. Ispitivani dodaci prehrani koji sadrže ekstrakte navedenih biljaka dobar su izvor polifenolnih spojeva. Antioksidativna aktivnost analiziranih dodataka prehrani u skladu je sa sadržajem ovih sekundarnih metabolita. Korelacija između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti je statistički značajna, iz čega je vidljivo da je antioksidativno djelovanje proporcionalno koncentraciji ovih bioaktivnih sastavnica. Rezultati ovog istraživanja doprinose boljem razumijevanju sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativne aktivnosti dodataka prehrani koji sadrže lan, crvenu djetelinu, hmelj i konopljiku.

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

Rad sadrži: 33 stranica, 3 grafičkih prikaza, 3 tablice i 23 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: fitoestrogeni, dodaci prehrani, konopljika, crvena djetelina, hmelj, lan, sadržaj ukupnih polifenola, antioksidativna aktivnost

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

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

**Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Kristina Pavić**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2021.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### **Total polyphenol content and antioxidant activity of dietary supplements used by women in menopause**

**Ana Perkušić**

#### **SUMMARY**

Recently, many studies have been conducted to evaluate the antioxidant activity of polyphenolic components in foods and dietary supplements. These biologically active substances are highly valued phytochemicals due to their preventive and therapeutic effects on human health. This study aimed to evaluate the quality of the flax-based, red clover-based, hop-based and chasteberry-based dietary supplements concerning the total polyphenol content and their antioxidant activity. The total polyphenol content in the analyzed dietary supplements was determined by Folin-Ciocalteu method, while the antioxidant activity was estimated by HPLC-DPPH method. This chromatography method has been shown to be fast and reproducible, and suitable for use in routine analysis. The tested dietary supplements containing extracts of these plants are a good source of polyphenolic compounds. The antioxidant activity of the analyzed dietary supplements is in accordance with the content of these secondary metabolites. The correlation between the total polyphenol content and antioxidant activity is statistically significant, and the antioxidant activity is proportional to the concentration of these bioactive compounds. The results of this study contribute to a better understanding of the content of total polyphenols and the antioxidant activity of flax-based, red clover-based, hop-based and chasteberry-based dietary supplements.

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

Thesis includes: 33 pages, 3 figures, 3 tables and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: phytoestrogens, dietary supplements, chasteberry, red clover, hop, flax, total polyphenol content, antioxidant activity

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  
**Ana Mornar Turk, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Kristina Pavić, Ph.D.** Senior assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: september 2021.