

Identifikacija fitoestrogena u dodacima prehrani masenom spektrometrijom

Šitum, Magdalena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:863319>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-13**



Repository / Repozitorij:

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



Magdalena Šitum

**Identifikacija fitoestrogena u dodacima prehrani
primjenom masene spektrometrije**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane Mornar Turk.

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ani Mornar Turk, na pruženoj prilici i na stručnom vodstvu, pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Također se zahvaljujem prof. dr. sc. Biljani Nigović na zanimljivim predavanjima kojima me zainteresirala za analitiku lijekova te dr. sc. Danieli Amidžić Klarić i kolegama Edvinu Brusaču i Mariu-Liviu Jeličiću na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Najviše hvala mojoj obitelji na nesebičnoj podršci tijekom cijelog mog obrazovanja.

Hvala mojim prijateljima što su mi uljepšali fakultetske dane.

SADRŽAJ

1.UVOD.....	1
1.1.FITOESTROGENI I MENOPAUZA	1
1.2.DODACI PREHRANI I ZAKONSKA REGULATIVA	3
1.3.MASENA SPEKTROMETRIJA.....	5
2.OBRAZLOŽENJE TEME.....	8
3.MATERIJALI I METODE.....	10
3.1.MATERIJALI.....	10
3.1.1.STANDARDI.....	10
3.1.2.KEMIKALIJE	10
3.1.3.UZORCI	10
3.1.4.RADNI INSTRUMENTI	11
3.1.5.PRIBOR.....	11
3.1.6. PROGRAMSKI PAKETI	11
3.2.METODE	11
3.2.1.PRIPREMA UZORAKA.....	11
3.2.2.MASENA SPEKTROMETRIJA.....	12
4.REZULTATI I RASPRAVA	13
4.1.OPTIMIZACIJA METODE.....	13
4.2.TUMAČENJE MS SPEKTARA	14
4.3.REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	18
5.ZAKLJUČAK.....	26
6.LITERATURA.....	27
7.SAŽETAK/ SUMMARY	30

1.UVOD

1.1.FITOESTROGENI I MENOPAUZA

Prema Svjetskog zdravstvenoj organizaciji menopauza je definirana kao razdoblje nakon 12 uzastopnih mjeseci amenoreje, koje nije uzrokovano patološkim uzrocima. Perimenopauza je razdoblje prije menopauze u kojem se pojavljuju endokrinološke, biološke i kliničke promjene a pojavljuje se između 45. i 60. godine života. Razdoblje nakon menopauze naziva se postmenopauza i dijeli se na ranu (prije 70. godine) i kasnu (poslije 70. godine) (Buhač, 2017.). Menopauza je uzrokovana hormonalnim promjenama, to jest smanjenom produkcijom estrogena što se javlja oko 50. godine života. Kako se životni vijek žena produžava, a dob u kojoj stupaju u menopauzu ostaje ista, većina žena danas provede od prilike 40% svog života u postmenopauzi zbog čega otklanjanje nelagodnih simptoma koji su posljedica hormonalnih promjena postaju sve veći zdravstveni problem. *The Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW+10)* je sustav koji se smatra zlatnim standardom pri određivanju specifičnih promjena koje se događaju prilikom reproduktivnog starenja, a sastoji se od triju faza: reproduktivne, menopauzalne tranzicije i postmenopauze (Harlow i sur,2012) Opisuje karakteristične promjene menstrualnih ciklusa, njihovo trajanje ali i promjene u razini hormona. Naime, opadanjem broja oocita smanjuje se i njihov utjecaj na inhibin B što kao posljedicu ima povećanje koncentracije folikul stimulirajućeg hormona (FSH), a potom i smanjenu koncentraciju estrogena (Hall, 2007). Takve hormonske promjene rezultiraju raznim nelagodnim vazomotornim simptomima za vrijeme menopauzalne tranzicije. Među najučestalijima, uz izostanak menstrualnih ciklusa, su naleti topline i noćno znojenje koje pogađa oko 65% žena. Ove simptome žene opisuju kao spontane osjećaje vrućine ponajviše u predjelima vrata, prsa i lica koji traju nekoliko minuta pa sve do pola sata, a mogu biti praćeni palpitacijama, nesanicom i anksioznim epizodama, te kao najčešće okidače ovih simptoma navode toplije vrijeme, stres i vruću hranu i pića (Nelson, 2008). Postmenopauzu karakteriziraju simptomi poput vaginalne suhoće, vulvovaginalne atrofije, simptoma donjeg urinarnog trakta te dispareunije, ali i poremećaji spavanja, emocionalna labilnost, promjene kose i kože. Smanjena je i protektivna uloga estrogena na krvožilni sustav te je povećana razgradnja kostiju zbog čega žene u postmenopauzi mogu također patiti i od krvožilnih bolesti i osteoporoze. Točan uzrok vazomotornih simptoma nije poznat, ali se smatra da je njihov nastanak povezan s niskom razinom estrogena, a moguće i promjenama u koncentraciji FSH i inhibina B, koji utječu na razinu endorfina u hipotalamusu. Pretpostavlja se da je zbog toga poremećen centar za termoregulaciju te da dolazi do znojenja i vazodilatacije pri nižim

temperaturama od uobičajenih. Meta analiza koja je uključivala dvije longitudinalne studije i nekoliko presječnih istraživanja pokazala je da vazomotorni simptomi najčešće započnu dvije godine prije menopauze, najintenzivniji su jednu godinu nakon ulaska u menopauzu te nestaju tokom idućih 10 godina (Politi i sur., 2008)

Prvi korak u otklanjanju ovih simptoma promjena je životnih navika. Smatra se da pretila žene, s indeksom tjelesne mase većim od 30 kg/m^2 imaju više nego dvostruko veću mogućnost da će doživjeti umjerene do teške nalete topline od žena čiji je indeks tjelesne mase manji od 25 kg/m^2 . Pušenje cigareta također povećava učestalost i intenzitet naleta topline. Zato se od promjena životnih navika savjetuje dijeta s adekvatnim unosom voća i povrća a smanjenim unosom vruće i začinjene hrane, toplih napitaka te kofeina. Također se preporuča prestanak pušenja, redovita tjelovježba, te slojevito odjevanje i niže sobne temperature. Ovakve promjene ne samo da smanjuju simptome menopauze već i rizik od kardiovaskularnih oboljenja, raka dojke i osteoporoze. Estrogenska terapija najučinkovitija je u rješavanju naleta vrućine kao i vaginalne i urogenitalne atrofije. Zbog prevencije hiperplazije endometrija i raka maternice u estrogensku terapiju je dodan i progesterin. Ovakva hormonska terapija za liječenje vazomotornih simptoma menopauze može se primjenjivati oralno, transdermalno i u obliku vaginalnog prstena. Potkraj prošlog stoljeća milijuni su žena koristili ovakvu vrstu terapiju dok veliko istraživanje koje je 2002. godine provela Ženska Zdravstvena Inicijacija (*Women's Health Initiative*, WHI) nije pokazalo da su rizici uzimanja ovakve terapije veći od dobiti. Naime, dokazano je da konjugirani estrogen u kombinaciji s medroksiprogesteronom povećava rizik od infarkta miokarda, venske tromboembolije i raka dojke, a kasnije su dodatne studije dovele u vezu ovakvu terapiju s demencijom i urinarnom inkontinencijom (Santen i sur., 2010). Upravo zbog toga mnoge su žene, ali i zdravstveni djelatnici, odbacili hormonalnu terapiju a alternativu su pronašli u prirodnim ljekovitim proizvodima, najčešće fitoestrogenima, odnosno "biljnim estrogenima". Naime, simptomi menopauze gotovo ne pogađaju žene Dalekog istoka, čija je ishrana bogata fitoestrogenima, a u tim zemljama izuzetno je i niska pojavnost karcinoma dojke, uterusa i prostate.

Fitoestrogeni je naziv za raznoliku skupinu nesteroidnih spojeva koji strukturom i djelovanjem nalikuju endogenom estrogenu. Biljnog su porijekla, što govori već sam njihov naziv (grč. *Phyto* = biljka) te ih u organizam unosimo isključivo prehranom zbog čega još nose naziv i tako zvanih ksenoestrogena. Dijele se u nekoliko podskupina među kojima su najviše proučavani lignani te izoflavoni i ostali flavonoidi. Izoflavonoidi nastali su iz srodnih flavanona premještanjem aromatskog prstena nastalog iz šikiminske kiseline s C-2 na C-3

heterocikličke strukture. Budući da je ovakva vrsta pregradnje rijetka u prirodi, izoflavonodi se pojavljuju isključivo u porodici Fabaceae. Među biljkama koje čine bogat izvor fitoestrogena potrebno je istaknuti soju koja je bogata izoflavonima, zatim lan, s velikim udjelom lignana, te crvenu djetelinu, hmelj ali i mnoge druge cjelovite žitarice te mahunarke. Kemijske strukture lignana, flavonoida i ostalih fitoestrogena, odnosno njihova sličnost strukturi hormona estrogena, omogućava im vezanje na estrogene receptore te time i ispoljavanje učinaka sličnog estrogenu. Među najznačajnijim strukturnim sličnostima valja istaknuti fenolni prsten nužan za vezanje na estrogenu receptor, jednaku udaljenost između dviju hidroksilnih skupina kod izoflavona i estradiola, te nisku molekularnu masu sličnu estradiolu ($M_r = 272 \text{ g/mol}$). Dodatno, fitoestrogeni mogu utjecati na koncentraciju spolnih hormona vezanjem ili inaktivacijom različitih enzima, te mijenjati njihovu bioraspoloživost aktivacijom, odnosno inaktivacijom sinteze globulina koji veže spolne hormone (SHBG). Provedene su i različite *in vivo* i *in vitro* studije kojima je, također, potvrđeno kako ovi spojevi mogu ispoljiti estrogenu i antiestrogenu djelovanje, ovisno o razini cirkulirajućeg endogenog hormona u organizmu; naime, kada je koncentracija 17β -estradiola visoka djeluju antiestrogenu, dok pri nižim koncentracijama navedenog hormona imaju upravo suprotan učinak (Glazier i Bowman, 2001). Takav mehanizam djelovanja omogućava uklanjanje simptoma menopauze, ako se dodaci prehrani na bazi biljaka koje sadržavaju fitoestrogene uzimaju pravovremeno i u dovoljnoj dozi, a prednosti im je daleko baži profil nuspojava od hormonske nadomjesne terapije.

1.2.DODACI PREHRANI I ZAKONSKA REGULATIVA

Dodacima prehrani smatra se hrana čija je svrha dopuniti uobičajenu prehranu, a kojima pripadaju različiti vitamini, minerali te druge različite tvari porijeklom iz hrane, te biljnog i životinjskog svijeta. Iako ovakvi pripravci ne služe liječenju, nego isključivo pomažu u održavanju zdravlja, što ih razlikuje od lijekova, rezultati su brojnih istraživanja pokazali kako je dodatno unošenje ovakvih tvari korisno te da mogu spriječiti ili odgoditi pojavljivanje različitih kroničnih bolesti (Lukačević, 2004). S toga ne čudi kako su ovakvi proizvodi sve popularniji i imaju sve više redovitih korisnika, čemu vjerojatno pridonosi i populistički pristup kako je sve "prirodno" uvijek i sigurno. No treba uzeti u obzir kako zbog nedovoljne kontrole ovakvih pripravaka često na tržištu postoje proizvodi upitne kvalitete, znanstvene dokazanosti i sigurnosti, koji su pri tom vrlo dostupni korisnicima. U Republici Hrvatskoj dodaci prehrani regulirani su zakonodavstvom o hrani te se kontrola njihove kvalitete odnosi

isključivo na provjeru zdravstvene, odnosno sanitarne ispravnosti, a ne i na dokazivanje djelotvornosti. Sastav, označavanje i stavljanje na tržište dodataka prehrani u Republici Hrvatskoj regulirano je Zakonom o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama te hrani obogaćenoj nutrijentima (Narodne novine br. 39/13), Pravilnikom o dodacima prehrani (Narodne novine br. 126/13), Pravilnikom o uvjetima za uvrštavanje u program monitoringa i provođenje programa monitoringa dodataka prehrani, hrane kojoj su dodani vitamini, minerali i druge tvari i hrane s prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama (Narodne novine br. 83/13) i Pravilnikom o tvarima koje se mogu dodavati hrani i koristiti u proizvodnji hrane te tvarima čije je korištenje u hrani zabranjeno ili ograničeno ([Narodne novine br. 160/13](#)) (www.zdravlje.gov.hr a). Dodaci prehrani službeno su definirani kao hrana čija je svrha dopuniti uobičajenu prehranu, a koja predstavlja koncentrirane izvore hranjivih tvari ili druge tvari prehrambenog ili fiziološkog učinka, pojedinačne ili u kombinaciji, na tržištu u doziranom obliku, to jest oblicima kao što su kapsule, pastile, tablete, pilule i slično, vrećice praha, ampule tekućine, bočice na kapaljku, te ostali slični oblici tekućine i praha smatraju se pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari (vitamini i minerali) ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom. Na tržište se stavljaju isključivo zapakirani i to pojedinačno ili u kombinaciji (www.zdravlje.gov.hr b). Ministarstvo zdravstva te Hrvatski zavod za javno zdravstvo nadležne su institucije, pri čemu prva daje ili uskraćuje pravo za stavljanje u promet, dok druga obavlja sva potrebna ispitivanja. U Europskoj Uniji dodaci prehrani su regulirani brojnim zakonima, mnogo strožim od onih, primjerice, u SAD-u. Pri tom većina biljnih preparata, dokazanog farmakološkog djelovanja, smatra biljnim lijekom, te se ne mogu stavljati u promet kao dodatak prehrani. Također, EU ima strogo definiran zakonodavstveni okvir koji se odnosi na deklariranje i oglašavanje te navodi isključive tvrdnje koje se smiju koristiti i označavati na navedenim proizvodima, a koja je morala usvojiti i Republika Hrvatska ulaskom u Europsku Uniju. Tako je zakonom o hrani zabranjeno proizvodu pripisivati svojstva prevencije, terapije i liječenja bolesti ljudi ili upućivati na takva svojstva jer se direktno spominjanje bolesti i izlječenja svrsatava u medicinske tvrdnje i pridaje lijekovima i medicinskim proizvodima. Kvaliteta dodataka prehrani i njihovi aktivni sastojci utječu na ukupnu zdravstvenu ispravnost stoga je nužno kontrolirati kvalitetu sastava, posebno aktivne sastojke uz parametre zdravstvene ispravnosti.

1.3.MASENA SPEKTROMETRIJA

Masena spektrometrija instrumentalna je analitička metoda kojom se molekule analiziraju na temelju njihove mase i naboja i jedan je od najznačajnijih analitičkih postupaka u suvremenoj analizi lijekova. Masena se spektrometrija razvila početkom 20. st. (J. J. Thompson), kada je omogućila otkriće stabilnih izotopa kemijskih elemenata (F. W. Aston), a danas se u analitici lijekova ova metoda koristi za određivanje strukture molekula i relativne molekulske mase, ali i za potvrdu identiteta ljekovitih tvari. Također se često koristi u kombinaciji s različitim kromatografskim tehnikama kao što su plinska odnosno tekućinska kromatografija (GC, LC) čime su dobivene spregnute tehnike vrlo visoke osjetljivosti i selektivnosti koje omogućavaju određivanje tragova onečišćenja u farmaceutskim formulacijama kao i lijekova i njihovih metabolita u različitim biološkim tekućinama.

Maseni spektrometar analizira ione u plinovitoj fazi u vakuumu ili pri atmosferskom tlaku. Analit, koji u sustav masenog spektrometra ulazi u obliku otopine, najprije se prevodi u ione u plinovitom stanju što se postiže u ionizacijskoj komori. Zatim maseni analizator razdvaja molekularne ione u plinovitoj fazi pomoću električnog ili magnetskog polja, omogućavajući pritom mjerenje omjera mase i naboja (m/z). Završni korak je detekcija i obrada rezultata. Ionizator je prvi dio masenog spektrometra u koji ulazi analit kroz kapilaru te u njemu nastaju ioni dovođenjem energije molekuli uz istovremeno otklanjanje otapala i prevođenje analita u plinovito stanje (kod HPLC-a). Elektroni bombardiraju matičnu molekulu pri čemu nastaje molekularni ion radikal (*parent* ion) čija vrijednost m/z odgovara molekularnoj masi spoja. U tom procesu može doći i do fragmentacije matične molekule pri čemu se dobiju dva ili više fragmentnih iona (*daughter* ion). Postoji nekoliko različitih ionizacijskih tehnika, a neke od češće korištenih su ionizacija djelovanjem snopa elektrona, kemijska ionizacija, matriksom potpomognuta, te ionizacija elektroraspršenjem koja je korištena i u ovom istraživanju. Ionizacija pomoću snopa elektrona (engl. *Electron Impact*, EI) rezultira nastajanjem visoko aktiviranog molekuskog iona M^{++} čiji je pik slabo izražen, a molekulska masa odgovara masi uzorka. Uz molekulski ioni često nastaju i drugi ioni budući da je za ovakvu vrstu ionizacije svojstvena i fragmentacija, za razliku od kemijske ionizacije gdje je onda i jasno vidljiv molekulski ion. Kemijska ionizacija (engl. *Chemical Ionisation*, CI) koristi molekule inertnog plina (metan, amonijak, izobutan itd.) u suvišku koje se najprije ioniziraju elektronima stvarajući ione koji potom potiču ionizaciju uzorka. Ovakva vrsta ionizacije se najčešće koristi kod termolabilnih uzoraka budući da molekula prima puno manju energiju i stupanj ionizacije je manji. Opisane metode ionizacije nisu bile pogodne za analizu velikih polarnih

molekula čija je analiza sve više bila od interesa u biologiji ali i medicini i farmaciji. Takve molekule nije bilo moguće prevesti u ione u plinovitom stanju ovakvim konvencionalnim metodama jer bi došlo do prevelike razgradnje molekula. To je dovelo do razvoja velikog broja takozvanih "mekih" ionizacijskih metoda pred kraj prošloga stoljeća. Ideja, koju su prvu predstavili Beuhler i suradnici, je bila da učinkovit i brz dotok energije molekulama analita može rezultirati isparavanjem prije nego što dođe do razgradnje (Fenn i sur., 1989). Jedna od takvih metoda je i matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (engl. *Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation*, MALDI) u kojoj su fotoni sredstvo kojim se postiže brza depozicija velike količine energije. Pogodna je za analizu spojeva visoke molekulske mase kao što su različiti polimeri i proteini. Koristi se matriks poput 2,5-dihidroksibenzojeve ili nikotinske kiseline koji kristalizira zajedno s uzorkom nakon što se otapalo otpari te se na takav kristal djeluje pulsnom laserskom zrakom (najčešće dušikov laser) čijim djelovanjem matriks ionizira i isparava te prenosi dio naboja na analit i dolazi do njegove ionizacije, nastaju protonirane molekule $(M+H)^+$ i nekoliko fragmentiranih iona. Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI), koja je korištena u ovom istraživanju, vrsta je ionizacije koja se najčešće koristi u spregnutim tehnikama jer omogućava da analiti u maseni spektrometar ulaze direktno nakon odvajanja kroz kromatografsku kolonu, a može se povezati i s drugim analitičkim uređajima kao što je elektrokemijska ćelija. Otopina uzorka ulazi u komoru najčešće u protoku od 1 do 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ kroz hipodermičku iglu od nehrđajućeg čelika. Kraj igle se održava na potencijalu višem od okoline ionizacijske komore i cilindričnih elektroda što pomaže u distribuciji potencijala i usmjeravanju protoka plina nosača. Električno polje koje se stvara na vrhu igle prenosi naboj na otopinu koja izlazi iz vrha gle te ju raspršuje Coulombovim silama u fini sprej nabijenih kapljica. Dobivene kapljice, vođene električnim poljem, migriraju prema otvoru kapilare iz kojeg u suprotnom smjer izlazi inertni plin (najčešće dušik) čijim strujanjem dolazi do isparavanja otapala iz svake kapljice te posljedično do povećanja gustoće naboja na svakoj od kapljica. Postizanjem tako zvanog Rayleighovog limita, kada je Coulombovo odbijanje jednako površinskoj napetosti, ovakav sustav postaje suviše nestabilan te dolazi do "Coulombove eksplozije", to jest raspadanja kapljica na još manje kapljice koje nastavljaju isparavati. Ovakav slijed događaja se ponavlja sve dok radijus kapljica ne postane dovoljno mali kako bi pod utjecajem polja, koje je posljedica gustoće naboja na površini, ioni mogli prijeći iz kapljica u okolni plin. Desorbirani ioni ostaju vezani na molekule otapala, koje nisu ioni sami po sebi, čime nastaju tako zvani "kvazi-molekularni" ioni koji su pogodni za analizu masenim spektrometrom (Thomson i Iribarne, 1976). Ovaj model ionske desorpcije kojeg su prvi predstavili Iribarne i Thomson,

iako propitkivan od strane mnogih znanstvenika, poslužio je za kao dobra radna hipoteza u brojnim istraživanjima. Ioni dobiveni u ionizacijskoj komori odlaze u dio masenog spektrometra, nazvan analizator, gdje će se razdvojiti na temelju mase i naboja. Kao i u slučaju ionizatora, postoji nekoliko različitih metoda kojima se ioni razdvajaju u analizatoru. Jedna od najjednostavnijih izvedbi masenog analizatora je magnetski analizator u kojem se ioni otklanjaju prolazom kroz magnetsko polje, a veličina tog otklona obrnuto je proporcionalna njihovoj masi. Također često korišten je i kvadrupolni analizator masa u kojem ioni određenog omjera m/z prolaze kroz električno polje jer rezoniraju s kvadrupolnom frekvencijom i dolaze do detektora. Za ione velike molekulske mase prikladan je analizator vremena leta (engl. *Time of Flight*, TOF) u kojem se ioni ubrzavaju do velikih brzina te zatim puštaju da slobodno lete kroz dugačku cijev pri čemu će ioni manje molekulske mase prije stići do detektora. Analizator korišten u ovom ispitivanju je stupica iona analizator (engl. *Ion-trap*) koji je pogodan je i za MS^n analize. Ion koji uđe u stupicu oscilira u njoj složenim putanjama koje su kontrolirane elektrodama na koje je doveden istosmjerni napon. Ionska stupica se ponaša poput svojevrsne "zamke" za ione, bilo pozitivno ili negativno nabijene, u odsustvu otapala što je postignuto dovođenjem odgovarajućeg potencijala u elektrodama ionske stupice (March, 1997). Postepenim pojačavanjem naboja ioni određene mase izlaze iz stupice, pri čemu isovremeno izlaze samo ioni iste molekulske mase (Adams, 1989).

Posljednji element masenog spektrometra je detektor. On detektira inducirani naboj ili struju koji nastaju kada ion prolazi kroz ili udari u površinu. Signal proizveden u detektoru nakon skeniranja daje maseni spektar, odnosno bilježi ione kao funkciju mase i naboja. Spektar masa prikazuje relativnu zastupljenost različitih ionskih vrsta, molekulski ion i/ili fragmentirane ione, pri čemu se najintenzivniji signal vidljiv na masenom spektru naziva osnovni signal i njegov intenzitet se označava sa 100 te se ostali signali izražavaju u relativnim vrijednostima u odnosu na njega.

2.OBRAZLOŽENJE TEME

Fitoestrogeni su biljni analozi estrogena koji se sve učestalije koriste za ublažavanje simptoma menopauze u obliku dodataka prehrani na bazi biljaka kao što su soja i crvena dijetelina. Zbog svoje široke dostupnosti i blagog profila nuspojava sve su češća alternativa hormonskoj nadomjesnoj terapiji, iako provedene kliničke studije pokazuju različite rezultate o njihovoj djelotvornosti (Glisic i sur., 2018; Messina, 2014) moguće zbog korištenja nestrandardiziranih dodataka prehrani u ispitivanjima. Stoga je neupitna važnost kontrole njihove kvalitete, te potrebe da metode kojima bi se ona vršila budu brze, pouzdane i primjenjive u rutini.

Brojne analitičke metode za određivanje fitoestrogena u dodacima prehrani su opisane. Metoda izbora za odjeljivanje sastavnica u takvim pripravcima najčešće je bila tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) koja se kombinirala s različitim sustavima za detekciju. Među najprimjenjivijima je DAD (engl. *Diode Array Detector*) detektor (Almeida i sur., 2015; Boniglia i sur., 2009; Delmonte i sur., 2006; Fukahori i sur., 2014; Krenn i Pötsch, 2006; Yanaka i sur., 2012) no pokazao se teško primjenjiv u rutinskoj primjeni budući da je zbog niske specifičnosti i selektivnosti vrijeme analize bilo produženo te je bila moguća interferencija matriksa s uzorkom. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-high Performance Liquid Chromatography*, UPLC) bile je metoda koja je uvelike smanjila vrijeme analize budući da se odvajanje sastavnica provodi pod povećanim tlakom (Mageira i sur.,2015), dok neke metode se služe MS detektorom kako bi se postigla bolja osjetljivost i selektivnost (Andres i sur., 2015; Clarke i sur., 2008; Coldham i Sauer, 2001; Delmonte i sur., 2006). Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) pokazala se kao selektivna metoda za određivanje fitoestrogena u dodacima prehrani, no njen nedostatak je bio vremenski iscrpna derivatizacija koju je bilo potrebno provesti pred analizu (Thompson i sur., 2007). Osim navedenih metoda, koje su sve koristile kromatografske tehnike kako bi odvojile sastavnice uzoraka, opisane su i neke nekromatografske metode. Tandemska masena spektrometrija s izravnim injektiranjem skraćuje vrijeme analize budući da se ne provodi odjeljivanje sastavnica te je ekološki prihvatljivija metoda. Opisane su i voltametrijska određivanja kao metoda kvantifikacije fitoestrogena koja je jednostavna, visoko osjetljiva te relativno niskih troškova (Fogliatto i sur., 2010). Nedostatak brojnih metoda kvantifikacije fitoestrogena je što su ograničene na samo određenu podskupinu. Naime, pripravci u kojima se nalaze

fitoestrogeni su gotovo uvijek složenog sastava budući da se za uklanjanje simptoma menopauze koriste kombinacije više različitih biljaka zbog svog sinergističkog djelovanja.

Cilj ovog istraživanja bio je razviti analitičku metodu koja bi mogla identificirati fitoestrogene u višekomponentnim uzorcima bez prethodnog odjeljivanja. Odabrana je masena spektrometrija s direktnim injektiranjem kao metoda koja je jednostavna te ne zahtjeva pripremu uzoraka koja često može biti složena i visoke cijene. Takvom metodom izbjegnuta je separacija uzoraka kromatografskim metodama koja je vremenski iscrpna, skupa i ekološki neprihvaljiva što je i najveća prednost takve metode. Najveći nedostatak je ograničenost na kvalitativnu analizu. Za određivanje koncentracije analita u uzorcima potrebno je korsiti LC/MS/MS metodu (Sertić i sur., 2014).

3.MATERIJALI I METODE

3.1.MATERIJALI

3.1.1.STANDARDI

Fitoestrogeni ekstrakti daidzeina, genisteina, formononetina, biokanina A, 8-prenilaringena, izoksantohumola, matairezinola, sekoizolaricirezinola -Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)

Fitoestrogeni standardi apigenina, kasticina i ksantohumola - Extrasynthese (Genay Cedex, Francuska).

3.1.2.KEMIKALIJE

Metanol - Merck, Dermstad, Njemačka

Etanol - Merck, Dermstad, Njemačka

Acetonitril - Merck, Dermstad, Njemačka

Petroleter (40-70°C) - Kemika, Zagreb, Hrvatska

Tune mix (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Ultra čista voda – dobivena pomoću Mili-Q sustava za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, SAD)

3.1.3.UZORCI

Uzorci dodataka prehrani koji su korišteni za analizu pribavljeni su u ljekarnama, 5 uzoraka sirovina su bili donacija tvrtke Specchiasol (Verona, Italija). Korišteni su različiti oralni oblici dodataka prehrani, ponajviše tablete i kapsule, koji su, uz fitoestrogene, sadržavali i brojne druge sastavnice, uključujući vitamine, minerale te različite ekcipientse. Također su korišteni tekući oralni oblici koji su se sastojali isključivo od etanolnih biljnih ekstrakata.

3.1.4.RADNI INSTRUMENTI

Analitička vaga AG245 (Mettler, Toledo, Greifense, Švicarska)

Uređaj za centrifugiranje (model Z 326 K, Hermle, Njemačka)

LC/MSD maseni spektrometar s ionskom stupicom (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Ultrazvučna kupelj (Elma, Njemačka)

Mini-Vortex mješalica (IKA-Werke, Njemačka)

Sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, USA)

3.1.5.PRIBOR

Chromafil membranski filteri, veličina pora 0.45 μm (Macherey-Nagel, Düren, Germany)

Epruvete za centrifugiranje od 15 ml

3.1.6. PROGRAMSKI PAKETI

LC/MSD Trap programska podrška (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

3.2.METODE

3.2.1.PRIPREMA UZORAKA

Uzorci su najprije smljeveni u tarioniku kako bi se dobio fini prašak. Odvagan je po 1 g svakog uzorka, te otopljen u 10 ml etanola u epruveti za centrifugiranje volumena 15 ml. Tako pripremljene suspenzije su ekstrahirane na Elmasonic xtra TT ultrazvučnoj kupelji (Elma, Njemačka) 15 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je otopina centrifugirana (1000 rpm, 5 min, 25°C) kako bi se dobio bistri supernatant koji je na kraju profiltriran kroz 0,45 μm Chromafil membranski filter.

3.2.2.MASENA SPEKTROMetriJA

Uzorci su analizirani injektiranjem u 80% metanol pri niskom protoku od 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ i pri tom je korišten vanjski sustav za injektiranje (KD Scientific Inc., Holliston, SAD) koji je direktno spojen na maseni spektrometar. Provedena je pozitivna ionaizacija raspršivanjem, pri čemu je u stupici zadržano 10 000 iona s vremenom zadržavanja iona u stupici od 200 ms. Za fragmentaciju iona primijenjen je plin helij. Uređaj je opremljen stupica iona analizatorom koji je kontroliran pomoću LC/MSD Trap programske podrške. Kalibracija je izvršena pomoću otopine Tune mix.

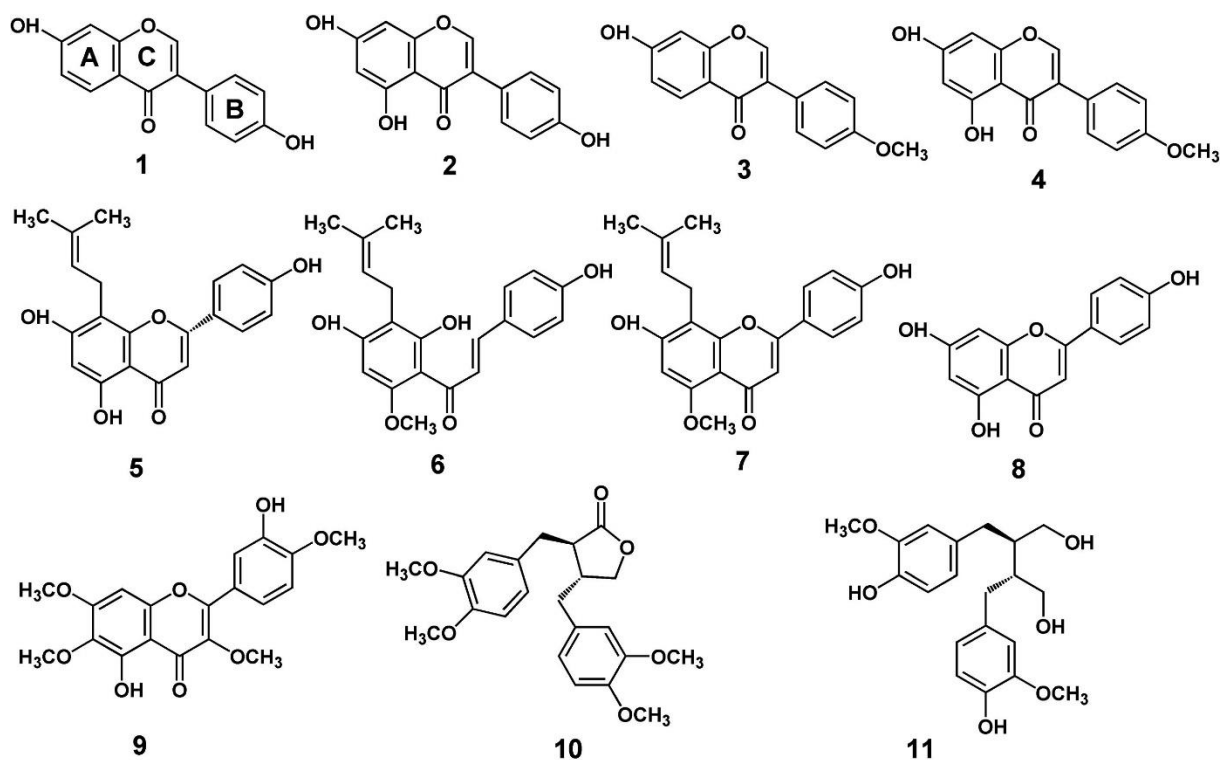
Osnovni parametri sustava za masenu spektrometriju su sljedeći:

- Temperatura izvora: 325°C
- Napon ionskog raspršivača: 3,5 kV
- Plin raspršivač: Dušik
- Brzina protoka dušika: 10 L/min
- Tlak dušika: 20 psi
- Opseg skeniranja: 100 – 1000 m/z

4.REZULTATI I RASPRAVA

4.1.OPTIMIZACIJA METODE

Masena spektrometrija analitička je metoda koja se često koristi za identifikaciju i određivanje sastavnica složenih uzoraka zbog svoje osjetljivosti i selektivnosti. No kako bi se razvila takva metoda potrebno je optimizirati različite parametre, kao što su napon kapilare, tlak plina raspršivača, brzina protoka i temperatura. Pri optimizaciji uvijeta korištene su standardne otopine fitoestrogena (Slika 1) te su različiti parametri posebno prilagođavani kako bi se dobila odgovarajuća osjetljivost i selektivnost. Postupci pripreme uzoraka koji su prethodili analizi na masenom spektrometru odabrani su prema prethodno objavljenim metodama (Mornar i sur., 2013; Nigović i sur., 2013.).



Slika 1. Strukturne formule ispitanih fitoestrogena: daidzein (1), genistein (2), formononetin (3) and biochanin A (4), 8-prenilnaringenin (5), xanthohumol (6) and isoxanthohumol (7), apigenin (8) kasticin (9) matairesinol (10) and sekoisolariciresinol (11)

Optimalni napon kapilare dobiven je postepenim povećanjem napona za 0,5 kV u intervalu od 2,5 do 4,0 kV pri čemu je uočeno kako signal najvećeg intenziteta svi analiti pokazuju pri

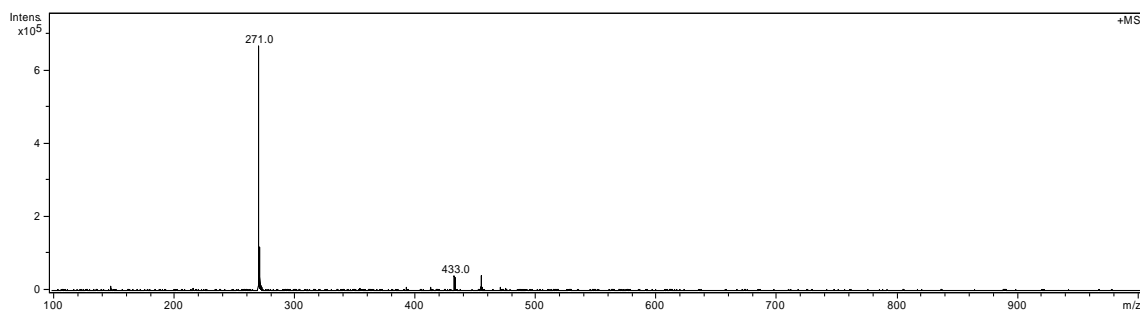
naponu od 3,5 kV. Optimizirani su i brzina protoka te temperatura plina dušika. Temperaturni interval bio je u rasponu od 250 do 350 °C tako što se temperatura povećavala za 25 °C te je pri tome uočeno kako najintenzivniji signal analiti pokazuju na temperaturama od 325 °C i 350 °C. Odabrana je niža vrijednost između dvije navedene temperature kako bi se izbjegla moguća razgradnja analita na višim temperaturama. Na odabranoj temperaturi je zatim ispitivan protok plina dušika pri čemu je odabrana vrijednost od 10 L/min kao ona na kojoj analiti pokazuju signal najvećeg intenziteta. Također je ispitivan i tlak plina raspršivača u rasponu od 10 do 60 psi i odabran je onaj od 20 psi. Za kraj su optimizirani i uvjeti na stupici iona: vrijeme zadržavanja iona u ionskoj stupici te broj iona zadržanih u stupici. Najintenzivniji signal je uočen pri vremenu zadržavanja od 200 ms, a ispitivan je interval od 10 ms do 1 s. Budući da se povećanjem broja iona zadržanih u stupici smanjivala preciznost metode odabrana je vrijednost od 10 000 zadržanih iona.

4.2. TUMAČENJE MS SPEKTARA

Pseudomolekularni ioni $[M+H]^+$ su bili glavni signali u masenim spektrima svih analita osim za sekoizolaricirezinola na čijem je spektru glavni signal koji se pripisuje fragmentom ionu $[M+H-H_2O]^+$ dobivenom gubitkom molekule vode.

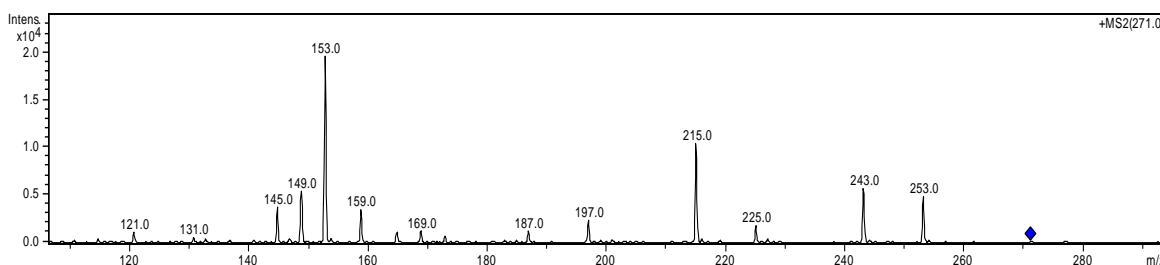
Fragmentacijski putovi svih analita istraženi su daljnjim MS^n ispitivanjima.

Gubitak molekule vode primijećen je kod flavonoida, daidzeina i genisteina, čija hidroksilna skupina na prstenovima A i B omogućuje stvaranje karakterističnih fragmentarnih iona $[M+H-H_2O]^+$ pri m/z 237 i 253 za daidzein, odnosno genistein (Slike 2 i 3).



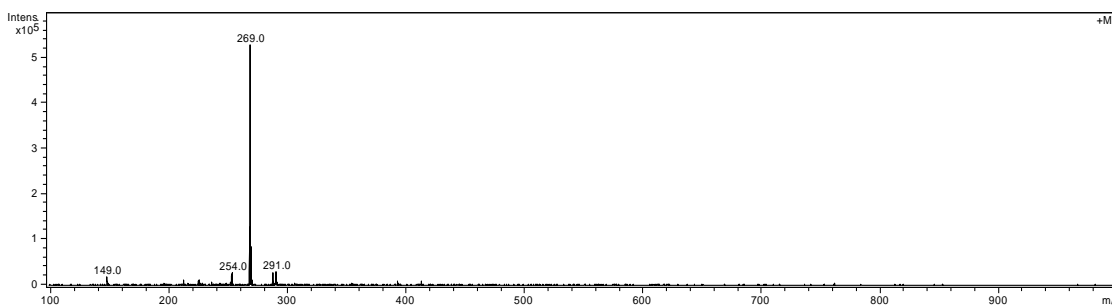
Slika 2. MS spektar genisteina.

Također pseudomolekularni ioni oba izoflavonoida mogu izgubiti CO skupinu prisutnu na C prstenu što rezultira fragmentnim ionima na m/z 227 za daidzein te m/z 243 za genistein, te fragmentima pri m/z 199 i m/z 215 za genistein gubitkom još jedne CO skupine istog prstena. Primijećen je i daljnji gubitak molekule vode kod oba izoflavonoida pri čemu su dobiveni ioni $[M+H-2CO-H_2O]^+$ na m/z 181 kod daidzeina te m/z 197 kod genisteina. Jedan od glavnih puteva fragmentacije aglikona flavonoida je retro Diels-Alder –ova reakcija (RDA). Primijećeni su RDA ioni na m/z 137 za daidzein te m/z 153 za genistein nastali simultanom pregradnjom veza u šesteročlanom prstenu koji sadrži dvostruku vezu pri čemu nastaju dien i dienofil (Demarque i sur., 2016.).



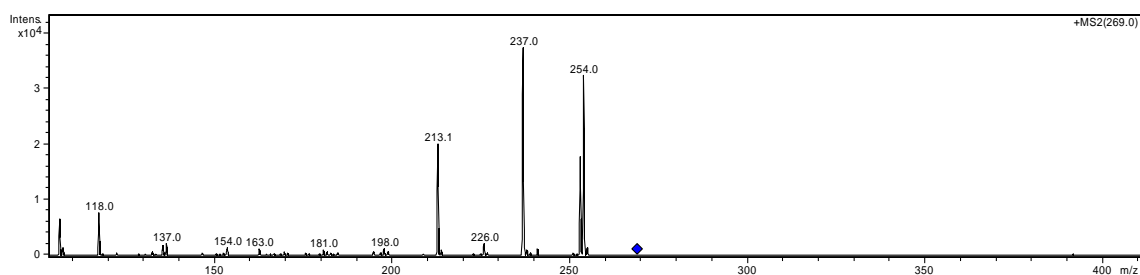
Slika 3. MS² spektar genisteina.

Spektralni podaci MSⁿ analize *O*-metil izoflavona pokazali su najistaknutije pikove pri m/z 254 u slučaju formononetina te m/z 270 kod biokanina A (Slike 4 i 5). Navedeni ioni su pridruženi radikalnom ionu $[M+H-CH_3]^+$. Opaženi su i drugi značajni ioni, pri m/z 237 za formononetin i m/z 253 za biokanin A nastali nakon gubitka CH₃OH skupine. Iz navedenog je moguće pretpostaviti kako je kod *O*-metiliranih izoflavona učestala fragmentacija na B prstenu.



Slika 4. MS spektar formononetina.

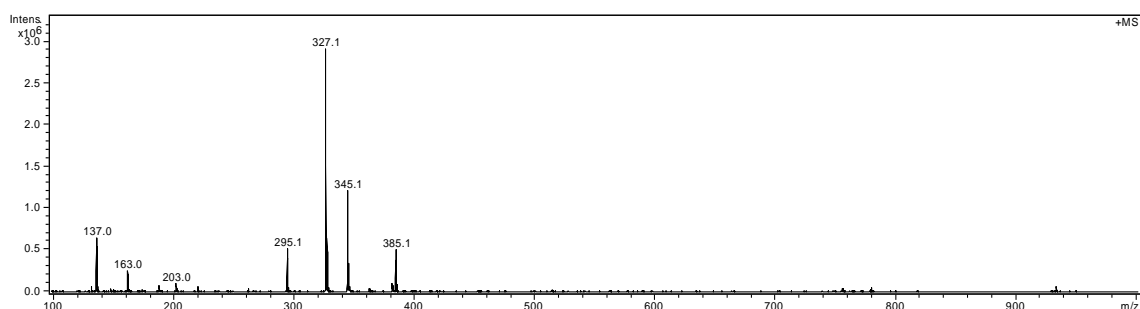
Također su, slično kao kod izoflavonoida, dobiveni su fragmenti nastali odvajanjem dviju CO skupina i to pri m/z 213 za formononetin, odnosno m/z 229 za biokanin A. Opažena je i gore spomenuta RDA fragmentacija pri čemu su dobiveni ioni slabog intenziteta na m/z 137 (formononetin) te m/z 153 (biokanin A).



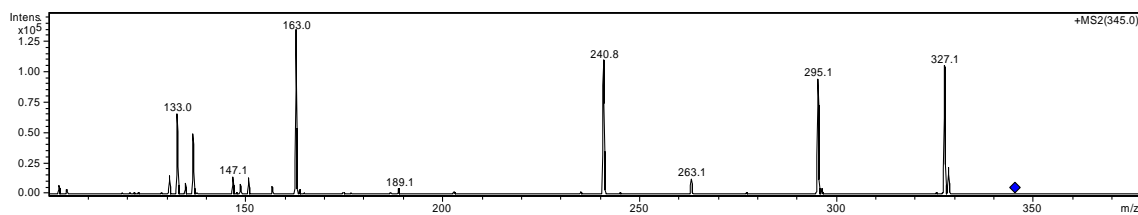
Slika 5. MSⁿ spektr formononetina.

Apigenin, za razliku od srodnog izoflavona, genisteina, daje manje produkata MSⁿ fragmentacijom. Bazni pik odgovara ionu dobivenom gubitkom molekule vode te CO skupine; $[M+H-CO-H_2O]^+$. Ponovno je opažen i ion dobiven retro Diels-Alderovom reakcijom pri m/z 153 kao i fragmentni ion nastao gubitkom CO skupine pri m/z 243 ali slabog intenziteta (manjeg od 4.0 %). Sličnost u putevima fragmentacije između flavona i izoflavona opisao je Madeira i njegovi suradnici (Madeira i sur., 2010.). Metilirani flavonoid kasticin, s druge strane, pokazao niz gubitaka metilne skupine s istaknutim ionima pri m/z 360, 345, 315 te 300.

MS² spektr dobiven analizom lignana, sekoizolaricirezinola i matairezina, pokazuje niz produkata nastalih gubitkom molekula vode iz pozitivnih pseudomolekularnih iona. Također je prisutan fragment pri m/z 137 kako u sekoizolaricirezorcinol tako i u matairezinu, a nastao kidanjem centralnog mosta u objema molekulama (Slike 6 i 7).

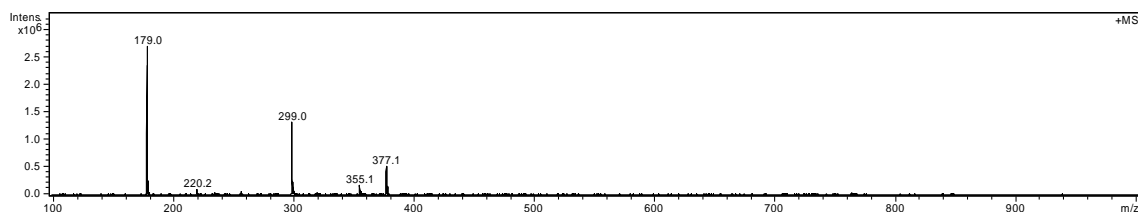


Slika 6. MS spektr sekoizolaricirezinola.

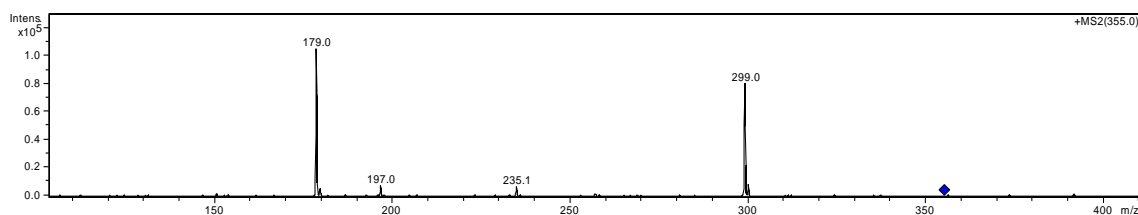


Slika 7. MS spektar sekoizolaricirezinola.

MS² spektar ksantohumola prikazuje tri produkta fragmentacije koja također nastaju i pri fragmentaciji drugih analiziranih pseudomolekularnih iona koji sadrže hidrofobnu prenilnu skupinu vezanu na osnovni dio molekule, izoksanthumola i 8-prenilaringenina. Pri navedenoj fragmentaciji najistaknutiji, stabilni produkt nastaje upravo gubitkom prenilne skupine $[M+H-C_4H_8]^+$ pri m/z 299 u slučaju ksantohumola i izoksanthumola, te 285 kod 8-prenilaringenina. Ioni nastali su RDA reakcijom na prstenu A u navedenim strukturama vidljivi su pri m/z 235 te 221, gdje prvi navedeni pripada ksantohumolu i izoksanthumolu, a drugi 8-prenilaringeninu. Treći fragmentirani ion, onaj pri m/z 179 (ksantohumol i izoksanthumol) te 165 (8-prenilaringenin) rezultat je odvajanja prinilnog supstituenta od fragmentiranog iona nastalog RDA reakcijom na prstenu A (Prokudina i sur., 2012.; Yilmazer i sur., 2001.).



Slika 8. MS spektar ksantohumola.



Slika 9. MSⁿ spektar ksantohumola.

4.3.REZULTATI ISTRAŽIVANJA

DI-MS metoda predložena i opisana u ovom radu ispitana je na uzorcima hrane (lan i soja), sirovinama koje se koriste u pripravi dodataka prehrani te formuliranim dodacima prehrani komercijalno dostupnim u ljekarnama u RH (Tablica 1).

Tablica 1. Popis ispitanih uzoraka.

Naziv proizvoda	Proizvođač	Vrsta uzorka	Biljka	Specifične sastavnice	Opis/ deklaracija
Uzorci hrane					
Sjemenka lana	Bio&bio, Zagreb, Hrvatska	sjemenka	Lan - <i>Linum usitatissimum</i> (L.)	matairezinol, sekoizolaricirezinol	Organski uzgojen lan
Sjemenka lana	Garden, Zagreb, Hrvatska	sjemenka	Lan - <i>Linum usitatissimum</i> (L.)	matairezinol, sekoizolaricirezinol	Organski uzgojen lan
Sojino zrno	Bio&bio, Zagreb, Hrvatska	zrno	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr	daidzein, genistein	Organski uzgojena soja
Sojino zrno	Podravka, Koprivnica, Hrvatska	zrno	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr	daidzein, genistein	Organski uzgojena soja
Neobrađeni uzorci dodataka prehrani					
Ekstrakt konopljike	Specchiaso I S.r.l., Bussolengo, Italija	Prašasti biljni uzorak	Prstasta konopljika- <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	apigenin, kasticin	Suhi ekstrakt prstaste konopljike s 0.5% agnuzida
Ekstrakt sjemenke lana	Specchiaso I S.r.l., Bussolengo, Italija	Prašasti biljni uzorak	Lan - <i>Linum usitatissimum</i> (L.)	matairezinol, sekoizolaricirezinol	Suhi ekstrakt lana koji sadržava više od 40% lignana
Ekstrakt	Specchiaso	Prašasti	Hmelj -	8-	Suhi ekstrakt

hmelja	I S.r.l., Bussolengo, Italija	biljni uzorak	<i>Humulus lupulus</i> (L.)	prenilnaringenin, ksantohumol, izoksantohumol	hmelja koji sadrži više od 0.1% flavonoida
Ekstrakt crvene djeteline	Specchiaso I S.r.l., Bussolengo, Italija	Prašasti biljni uzorak	Crveni djetelina - <i>Trifolium pretense</i> (L.)	daidzein, genistein, formononetin, biokanin A	Fini praškasti ekstrakt crvene djeteline koji sadrži više od 8% isoflavona
Ekstrakt soje	Specchiaso I S.r.l., Bussolengo, Italija	Prašasti biljni uzorak	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr	daidzein, genistein	Fini praškasti ekstrakt soje koji sadrži više od 40% isoflavona
Gotovi oblici dodataka prehrani					
Belmiran San	Belupo, Koprivnica, Hrvatska	Obložene tablete	Hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (L.)	8- prenilnaringenin, ksantohumol, izoksantohumol	Suhi ekstrakt hmelja, flos (<i>Humulus lupulus</i> L.) 30 mg
Bonisan	Dietpharm , Rakitje, Hrvatska	Kapsule	Hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (L.)	8- prenilnaringenin, ksantohumol, isoksantohumol	<i>Ekstrakt hmelja (Humulus lupulus) osušeni cvjetovi 50 mg</i>
Cirkulin valerijana	Roha Arzneimittel GmbH, Bremen, Njemačka	Obložene tablete	Hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (L.)	8- prenilnaringenin, ksantohumol, isoksantohumol	40 mg suhog ekstrakta <i>Humulus lupulus</i> L., flos (3-6:1), ekstrakcijsko otapalo: voda
Evine Kapi	Suban, d.o.o. Strmec, Hrvatska	Etanolni ekstrakt	Prstasta konopljika- <i>Vitex agnus- castus</i> (L.)	apigenin, kasticin	Vodenoetanolni ekstrakt prstaste konopljike (<i>Vitex agnus - castus</i> L.) plod
Fem Flax	Palmer Natural Products, Star, ID, SAD	kapsule	Lan - <i>Linum usitatissimum</i> (L.)	matairezinol, sekoizolaricirezino l	Sekoizolaricirezino ol diglukozide lignin, 30-60 mg per gram
Feminal	Jadran - Galenski Laboratorij	kapsule	Crvena djetelina - <i>Trifolium</i>	daidzein, genistein, formononetin,	100 mg of ekstrakta crvene djeteline s 40%

	, Rijeka, Hrvatska		<i>pretense</i> (L.)	biokanin A	izoflavona
Herbal Female Complex	Solgar, Leonia, NJ, SAD	Biljne kapsule	Prstasta konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.); Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr	apigenin, kasticin, daidzein, genistein	Standardizirani ekstrakt konopljike (plod) (agnuzid 0.375 mg [0.5%]) 75 mg; ekstrakt sojinih klica, genetski ne modificiran (2% izoflavona) 100 mg
Maxi Life Mega Soy	Twinlab, Hauppauge, NY, SAD	kapsule	Soy - <i>Glycine max</i> (L.) Merr	daidzein, genistein	Ekstrakt zrna soje (Novasoy) 200 mg (sadrži 40% izoflavona - 80 mg of izoflavona uključuje 40 mg genisteina, 31 mg diadzeina i 9 mg glicitina)
Meno-guide	Erba Vita S.p.A. , San Marino, Italija	Biljne VCAPS [®]	Lan - <i>Linum usitatissimum</i> (L.); Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr	matairezinol, sekoizolaricirezinol, daidzein, genistein	Ekstrakt sjemenski lana (<i>Linum usitatissimum</i>) sjemenka (standardizirana na 20% - 10 mg lignana) 49 mg; ekstrakt zrna soje (Glycine max) zrno (standardizirano na 40% - 7 mg izoflavona, genisteina =>36% - 6 mg)
Menopause	Helvetia Direct Marketing s.r.o., Prag,	tablete	Hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (L.)	8-prenilnaringenin, ksantohumol, izoksantomol, daidzein,	Ekstrakt hmelja (50 µg 8-prenilnaringenina) 375 mg, crvena djetelina

	Češka			genistein, formononetin, biokanin A	(20 izoflavona) 50 mg
Menopause Relief	Natural Wealth, Milsing d.o.o., Zagreb, Hrvatska	tablete	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr; Prstasta konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	daidzein, genistein, apigenin, kasticin	Koncentrat soje (garantiranih 21 mg izoflavona) 700 mg; prstasta konopljika (<i>Vitex agnus-castus</i> , plos) 33,3 mg
Natural Max, Premenstrual Solution	Natural Balance, Englewood, CO, SAD	Fast-caps® kapsule	Prstasta konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	apigenin, kasticin	Prstasta konopljika (<i>Vitex agnus-castus</i>) ekstrakt ploda 100 mg
Pausa	Specchiaso I S.r.l., Bussolengo, Italija	kapsule	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr; Crvena djetelina - <i>Trifolium pretense</i> (L.)	daidzein, genistein, formononetin, biokanin A	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
PhytoEstrogen one daily	Solaray, Park City, UT, SAD	Želatinske kapsule	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr	daidzein, genistein	Koncentrat zrna soje (<i>Glycine max</i>) (garantiranih 60 mg [40%] ukupnih izoflavona s 33 mg genistina i 25.5 daidzina) 150 mg
Red Clover Blossoms	Solaray, Park City, UT, SAD	Želatinske kapsule	Crvena djetelina - <i>Trifolium pretense</i> (L.)	daidzein, genistein, formononetin, biokanin A	Crvena djetelina (<i>Trifolium pretense</i>) cvijet u cvatu 375 mg
Soy Flavon®	Dietpharm, Rakitje,	Kapsule	Soja - <i>Glycine max</i>	daidzein,	750 mg soje – sadržava 3% of

	Hrvatska		(L.) Merr	genistein	izoflavones: daidzin i daidzein 12 mg, glicitin i glicitein 7 mg, genistin I genistein 2.5 mg
Soy Isoflavones	Natural Wealth, Milsing d.o.o., Zagreb, Hrvatska	kapsule	Soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr	daidzein, genistein	750 mg soje (ne sadržava genetski modificirana zrna soje) – sadržava 3% of izoflavona: daidzin i daidzein 12 mg, glicitin i glicitein 7 mg, genistin i genistein 2.5 mg
Vitality For Women	Kal, Park City, UT, SAD	tablete	Prstasta konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	apigenin, kasticin	Prstasta konopljika (<i>Vitex angus castus</i>) plod 50 mg
Vitex	Solaray, Park City, UT, SAD	Želatinske kapsule	Prstasta konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	apigenin, kasticin	Prstasta konopljika (<i>Vitex agnus-castus</i>) bobice 400 mg
Vitex Solutio	Specchiaso I S.r.l., Bussolengo, Italija	Etanolni ekstrakt	Prstasta konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	apigenin, kasticin	Vodeno-etanolni ekstrakt prstaste konopljike chasteberry (<i>Vitex agnus - castus</i> L.) plod

Rezultati provedenih istraživanja prikazani su u Tablicama 2-4.

Tablica 2. Popis fitoestrogena identificiranih u ispitanim uzorcima hrane.

Uzorak	Sadržaj	Identificirani fitoestrogeni
H1	Soja	-
H2	Soja	-
H3	Lan	-
H4	Lan	-

Tablica 3. Popis fitoestrogena identificiranih u sirovinama za pripremu dodataka prehrani.

Uzorak	Sadržaj	Identificirani fitoestrogeni
S1	Soja	daizdein, genistein
S2	Konopljika	apigenin
S3	Crvena Djetelina	daizdein, genistein, formononetin, biokanin A
S4	Hmelj	-
S5	Lan	sekoisolariciresinol

Tablica 4. Popis fitoestrogena identificiranih u dodacima prehrani.

Uzorak	Sadržaj	Identificirani fitoestrogeni
DP1	Soja	daizdein, genistein
DP2	Soja	daizdein, genistein
DP3	Soja	daizdein, genistein
DP4	Soja	daizdein, genistein
DP5	Konopljika	-

DP6	Konopljika	apigenin
DP7	Konopljika	kasticin
DP8	Konopljika	-
DP9	Konopljika	-
DP10	Crvena djetelina	formononetin, biochanin A
DP11	Crvena djetelina	formononetin, biochanin A
DP12	Hmelj	-
DP13	Hmelj	-
DP14	Hmelj	-
DP15	Lan	-
DP16	Soja, Konopljika	apigenin
DP17	Soja, Konopljika	daizdein, genistein
DP18	Soja, Crvena djeteljina	daizdein, genistein, formononetin, biochanin A
DP19	Soja, Lan	-
DP20	Crvena djeteljina, Hmelj	formononetin, biochanin A, xanthohumol

Iz Tablice 2 vidljivo je da u uzorcima hrane (H1-H4) nisu nađene koncentracije fitoestrogena koje bi se mogle detektirati ovom metodom.

Fitoestrogeni su s druge strane nađeni u biljnim sirovinama koje se koriste u pripremi formuliranih oblika dodataka prehrani. Čeiri od pet sirovina sadržavale su mjerljive razine fitoestrogena (Tablica 3).

Analizirani uzorci dodaka prehrani sadržavali su jednu ili više biljnih vrsta. U 8 uzoraka od ukupno 20 fitoestrogeni nisu identificirani, dok je u ostalim pripravcima identificirano od 1 do

3 različita fitoestrogena po pripravku. Također, 8-prenilaringenin, izoksantohumol, matairezinol te sekoizolaricirezinol nisu pronađeni ni u jednom od 20 dodataka prehrani korištenih u istraživanju.

U istraživanje su bila uključena ukupno 4 pripravka koja od biljnih droga s fitoestrogenima sadrže isključivo soju i u svima su identificirani daidzein i genistein (DP1 – DP4).

Prstasta konopljika bila je jedini biljni sastojak 5 preparata. U jednom od njih je identificiran apigenin (DP6), u jednom kasticin (DP7), dok u 3 preparata nije identificiran ni jedan fitoestrogen (DP5, DP8, DP9).

Dvije su formulacije bile bazirane isključivo na crvenoj djetelini i u obje su identificirani formononetin te biokanin A (DP10, DP11).

U dodacima prehrani u kojim se, kao monodroga, nalazi hmelj (3 pripravka: DP12-DP14), kao i u onima u kojima je bio isključivo lan (1 pripravak: DP15), nije identificiran nijedan fitoestrogen.

Preostalih 5 dodataka prehrani uključenih u istraživanje u sastavu su imali po dvije biljne droge. Tako su 2 dodataka prehrani sadržavali soju i prstastu konopljiku, pri čemu je u jednom od njih identificiran isključivo apigenin (DP16), dok je u drugom potvrđena prisutnost daidzeina i genisteina (DP17). U pripravku s kombinacijom soje i crvene djeteline pronađena su čak 4 različita fitoestrogena: daidzein, genistein, formononetin te biokanin A (DP18). Nasuprot tome, u formulaciji s kombinacijom soje i lana nije potvrđena prisutnost ni jednog fitoestrogena (DP19). Posljednji dodatak prehrani, analiziran u ovom istraživanju, sadržava crvenu djetelinu i hmelj i u njemu su identificirani formononetin, biokanin A i ksantohumol (DP20) (Tablica 4).

5.ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu razvijena je metoda identifikacije fitoestrogena u dodacima prehrani pomoću masenog spektrometra s direktnim injektiranjem. Iako je analiza provedena na složenim, višekomponentnim uzorcima, priprava uzoraka, koja je prethodila samoj analizi, bila je nadasve jednostavna i troškovno prihvatljiva. Prednost ove metode, naspram drugih, do sad objavljenih metoda, jest ponajviše skraćeno vrijeme analize. Direktnim injektiranjem izbjegnuta je separacija kromatografskim metodama koja, osim što je dugotrajna, iziskuje visoke troškove te je ekološki nepodobna. Najveći nedostatak ovakve metode jest njena limitiranost na kvalitativnu analizu, te je za određivanje koncentracije analita u uzorku potrebno primjeniti LC/MS/MS metodu.

Ovo istraživanje je pokazalo da u čak 8 od ukupno 20 analiziranih dodataka prehrani nije identificirana ni jedna aktivna tvar, odnosno fitoestrogena sastavnica. Takvi rezultati upućuju na zaključak kako su dodaci prehrani često nedovoljno standardizirani što dovodi do nedosljednosti u sastavu, a time i u farmakološkoj aktivnosti.

Dodaci prehrani koji pomažu u otklanjanju simptoma menopauze sve su češći izbor mnogih žena koje u današnje vrijeme provode i do 40% životnog vijeka u menopauzi. Zbog sve veće traženosti i sve lakše dostupnosti neupitna je važnost kontrole dodataka prehrani koji su registrirani na tržištu. Predložena metoda bi, zbog toga, mogla biti od velike koristi proizvođačima kako bi mogli kontrolirati, ne samo gotove proizvode, već i sirovine prije samog formuliranja i tabletiranja ili inkapsuliranja. Također, ovakva metoda korisna je i za regulatorne agencije jer omogućava brzu, jednostavnu i pouzdanu metodu kontrole nekih od najčešće korištenih fitoestrogena koja je lako primjenjiva u rutini.

6.LITERATURA

Adams RP. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. *Academic Press* New York, 1989.

Almeida I. M, Rodrigues F, Sarmiento B, Alves R C i Oliveira M B. Isoflavones in food supplements: chemical profile, label accordance and permeability study in Caco-2 cells. *Food & Function*, 2015, 6, 938-946.

Andres S, Hansen U, Niemann B, Palavinskas R i Lampen A. Determination of the isoflavone composition and estrogenic activity of commercial dietary supplements based on soy or red clover. *Food and; Function*, 2015, 6, 2017-2025.

Boniglia C, Carratù B, Gargiulo R, Giammarioli S, Mosca M, i Sanzini E. Content of phytoestrogens in soy-based dietary supplements. *Food Chemistry*, 2019, 115, 1389-1392.

Clarke DB, Bailey V i Lloyd AS. Determination of phytoestrogens in dietary supplements by LC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 2008, 25, 534-547.

Coldham NG, Sauer MJ. Identification, quantitation and biological activity of phytoestrogens in a dietary supplement for breast enhancement. *Food and Chemical Toxicology*, 2001, 39, 1211-1224.

Delmonte P, Perry J, i Rader JJ. Determination of isoflavones in dietary supplements containing soy, Red Clover and kudzu: extraction followed by basic or acid hydrolysis. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1107, 59-69.

Demarque DP, Crotti AEM, Vessecchi R, Lopes JLC. i Lopes NP. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural Product Reports*, 2016, 33, 432-455

Dodaci prehrani, 2019., <https://zdravlje.gov.hr/>, pristupljeno 1. 8. 2019.

Fenn J, Mann M, Meng C, Wong S. and Whitehouse, C. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989, 246, 64-71.

Fogliatto DK, Barbosa AM i Ferreira VS. Voltammetric determination of the phytoestrogen genistein in soy flours and soy based supplements using cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 78, 243-249.

Fukahori M, Kobayashi S, Naraki Y, Sasaki T, Oka H, Seki M, Masada-Atsumi S, Hakamatsuka T i Goda Y. Quality evaluation of medicinal products and health foods containing chaste berry (*Vitex agnus-castus*) in Japanese, European and American markets. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2014, 62, 379-385.

Glazier M i Bowman M. A Review of the Evidence for the Use of Phytoestrogens as a Replacement for Traditional Estrogen Replacement Therapy. *Archives of Internal Medicine*, 2001, 161, 1161.

Glisic M, Kastrati N, Musa J, Milic J, Asllanaj E, Portilla Fernandez E, Nano J, Ochoa Rosales C, Amiri M, Kraja B, Bano A, Bramer WM, Roks AJM, Danser AHJ, Franco OH, Muka T. Phytoestrogen supplementation and body composition in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Maturitas*, 2018, 115, 74-83.

Hall J. Neuroendocrine Changes with Reproductive Aging in Women. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2007, 25, 344-351.

Harlow S, Gass M, Hall J, Lobo R, Maki P, Rebar R, Sherman S, Sluss P i de Villiers T. Executive Summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: Addressing the Unfinished Agenda of Staging Reproductive Aging. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2012, 97, 1159-1168.

Ines Buhač. Klimakterijski poremećaji. U: CASI/ Priručnik za samoliječenje. Martina Bonevski, Katarina Kujundžić, Luce Mandić, Mirna Radošević, urednici. Zagreb, 2017, 268-273.

Krenn L i Pötsch V. An efficient HPLC method for the quantification of isoflavones in soy extracts and soy dietary supplements in routine quality control. *Pharmazie*, 2006, 61, 582-585.

Lukačević K. Interakcije i nuspojave dodataka prehrani. *Farmaceutski glasnik*, 2004, 9, 393-413

Magiera S, Baranowska I i Lautenszleger A. UHPLC-UV method for the determination of flavonoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 102, 468-475.

March R. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 1997, 32, 351-369.

Messina M. Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2014, 100, 423S-430S.

Mornar A, Sertić M. I Nigović B. Development of a rapid LC/DAD/FLD/MSⁿ method for the simultaneous determination of monacolins and citrinin in red fermented rice products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61, 1072-1080

Nelson H. Menopause. *The Lancet*, 2008, 371, 760-770.

Politi M, Schleinitz M i Col N. Revisiting the Duration of Vasomotor Symptoms of Menopause: A Meta-Analysis. *Journal of General Internal Medicine*, 2008, 23, 1507-1513.

Santen R, Allred D, Ardoin S, Archer D, Boyd N, Braunstein G, Burger H, Colditz G, Davis S, Gambacciani M, Gower B, Henderson V, Jarjour W, Karas R, Kleerekoper M, Lobo R, Manson J, Marsden J, Martin K, Martin L, Pinkerton J, Rubinow D, Teede H, Thiboutot D i Utian W Postmenopausal Hormone Therapy: An Endocrine Society Scientific Statement. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2010, 95, 1-66.

Sertić M, Mornar A i Nigović B. A rapid profiling of hypolipidemic agents in dietary supplements by direct injection tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2014, 34, 68-74.

Thompson LU, Boucher BA, Cotterchio M, Kreiger N i Liu Z. Dietary phytoestrogens, including isoflavones, lignans, and coumestrol, in nonvitamin, nonmineral supplements commonly consumed by women in Canada, *Nutrition and Cancer*, 2007, 59, 176-184.

Thomson B i Iribarne J. Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *The Journal of Chemical Physics*, 1979, 71, 4451-4463.

Yanaka K, Takebayashi J, Matsumoto T i Ishimi Y. Determination of 15 isoflavone isomers in soy foods and supplements by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2012, 60, 4012-4016.

7.SAŽETAK/ SUMMARY

Fitoestrogeni su nesteroidni polifenolni spojevi koji se zbog svog djelovanja sličnog estrogenu sve češće koriste za otklanjanje nelagodnih simptoma menopauze kao sigurnija alternativa hormonskoj nadomjesnoj terapiji. Prirodni su im izvor različite biljke, poput soje, crvene djeteline, prstaste konopljike, lana i hmelja te su njihovi ekstrakti glavni sastojci brojnih dodataka prehrani prisutnih na tržištu. Upravo zbog široke dostupnosti i sve češće primjene dodataka prehrani, a upitne djelotvornosti i nedovoljne kontrole sastava potrebna je analitička metoda koja bi bila dovoljno brza, financijski isplativa, te primjenjiva u rutini kako bi se postigla poželjna sigurnost i kvaliteta ovakvih pripravaka.

Cilj ovog istraživanja bio je razviti metodu identifikacije fitoestrogena direktnom injektiranjem na masenom spektrometru s ionizacijom elektroraspršenjem, koja bi omogućila identifikaciju svih fitoestrogena u takvim, višekomponentnim, pripravcima bez prethodnog odjeljivanja sastavnica kromatografskim metodama. Metoda je uspješno primjenjena na analiziranim uzorcima, te bi kao takva mogla biti korisna kako proizvođačima, tako i regulatornim agencijama. Najveći nedostatak ove metode njena je ograničenost na kvalitativnu analizu.

Phytoestrogens are non-steroidal polyphenolic chemical entities that are often use for treatment of menopausal symptoms due to their estrogen-like activity as a safer alterative to hormone therapy. Their natural source are plants like soy, red clover, chaste tree, hop and flax and their extracts are main ingredients of large number of dietary supplements found on market. Because they are easily accessible and more often use than ever, even though their efficiency hasn't been confirmed and their composition is insufficiently controlled, it is important to develop analytical method fast enough, profitable and also applicable on every day basis in order to achieve appropriate control of ingredients and quality.

The aim of this research was to develop method of identification od phytoestrogens using direct injection electrospray ionization – mass spectrometry. The given method would allow identification of phytoestrogens in multicomponent formulations without previous separation with chromatographic methods. This method showed applicable for samples of dietary supplements and it can be of a significant meaning to both manufacturers and

regulatory agencies. The biggest disadvantage of this method is its limitation to qualitative analysis.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Zavod za analitiku i kontrolu lijekova

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Identifikacija fitoestrogena u dodacima prehrani primjenom masene spektrometrije

Magdalena Šitum

SAŽETAK

Fitoestrogeni su nesteroidni polifenolni spojevi koji se zbog svog djelovanja sličnog estrogenu sve češće koriste za otklanjanje nelagodnih simptoma menopauze kao sigurnija alternativa hormonskoj nadomjesnoj terapiji. Prirodni su im izvor različite biljke, poput soje, crvene djeteline, prstaste konopljike, lana i hmeljate su njihovi ekstrakti glavni sastojci brojnih dodataka prehrani prisutnih na tržištu. Upravo zbog široke dostupnosti i sve češće primjene dodataka prehrani, a upitne djelotvornosti i nedovoljne kontrole sastava potrebna je analitička metoda koja bi bila dovoljno brza, financijski isplativa, te primjenjiva u rutini kako bi se postigla poželjna sigurnost i kvaliteta ovakvih pripravaka.

Cilj ovog istraživanja bio je razviti metodu identifikacije fitoestrogena direktnom injektiranjem na masenom spektrometru s ionizacijom elektroraspršenjem, koja bi omogućila identifikaciju svih fitoestrogena u takvim, višekomponentnim, pripravcima bez prethodnog odjeljivanja sastavnica kromatografskim metodama. Metoda je uspješno primjenjena na analiziranim uzorcima, te bi kao takva mogla biti korisna kako proizvođačima, tako i regulatornim agencijama. Najveći nedostatak ove metode njena je ograničenost na kvalitativnu analizu.

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

Rad sadrži: 31 stranica, 9 grafičkih prikaza, 4 tablice i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: fitoestrogeni, dodaci prehrani, masena spektrometrija

Mentor: **dr. sc. Ana Mornar Turk**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **dr. sc. Ana Mornar Turk**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

dr. sc. Biljana Nigović, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

dr. sc. Živka Juričić, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: rujan 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb

Diploma thesis

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Department of Pharmaceutical Analysis

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Identification of phytoestrogens in dietary supplements by mass spectrometry

Magdalena Šitum

SUMMARY

Phytoestrogens are non-steroidal polyphenolic chemical entities that are often used for treatment of menopausal symptoms due to their estrogen-like activity as a safer alternative to hormone therapy. Their natural sources are plants like soy, red clover, chaste tree, hop and flax and their extracts are main ingredients of a large number of dietary supplements found on the market. Because they are easily accessible and more often used than ever, even though their efficiency hasn't been confirmed and their composition is insufficiently controlled, it is important to develop an analytical method fast enough, profitable and also applicable on every day basis in order to achieve appropriate control of ingredients and quality.

The aim of this research was to develop a method of identification of phytoestrogens using direct injection electrospray ionization – mass spectrometry. The given method would allow identification of phytoestrogens in multicomponent formulations without previous separation with chromatographic methods. This method showed to be applicable for samples of dietary supplements and it can be of a significant meaning to both manufacturers and regulatory agencies. The biggest disadvantage of this method is its limitation to qualitative analysis.

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

Thesis includes: 31 pages, 9 figures, 4 tables and 30 references. Original is in Croatian language.

Keywords: phytoestrogens, dietary supplements, mass spectroscopy

Mentor: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Biljana Nigović, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Živka Juričić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019