

# Nove metode u analitici podataka prehrani za ublažavanje simptoma menopauze

---

**Buhač, Tajana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

*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:163:874523>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-28**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Tajana Buhač

**NOVE METODE U ANALITICI DODATAKA  
PREHRANI ZA UBLAŽAVANJE SIMPTOMA  
MENOPAUZE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Tajana Buhač

**NOVE METODE U ANALITICI DODATAKA  
PREHRANI ZA UBLAŽAVANJE SIMPTOMA  
MENOPAUZE**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof. dr. sc. Ana Mornar Turk

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of pharmacy and biochemistry

Tajana Buhač

**NEW ANALYTICAL METHODS FOR  
DIETARY SUPPLEMENTS USED TO  
TREAT MENOPAUSAL SYMPTOMS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Prof. Ana Mornar Turk, PhD

Zagreb, 2022.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

## ZAHVALA

Riječima je teško izraziti zahvalnost za svu podršku koju sam dobila na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova. Bili ste uz mene kad mi je trebalo i neizmjereno sam vam na tome zahvalna. Hvala vam na strpljivosti i razumijevanju i na svemu što ste za mene učinili.

Posebno se zahvaljujem mojoj mentorici prof.dr.sc. Ani Mornar Turk, koja me je vodila na mom putu u izradi doktorske disertacije, bez čijeg znanja i iskustva to ne bi bilo moguće.

Hvala mojoj majci bez koje ne bih bila ono što danas jesam.

„Uvijek postoji netko tko  
Nas čeka na kraju puta,  
Na kraju dana, na kraju svega...uvijek  
Uvijek postoji netko tko nas  
Voli baš takve kakvi jesmo“

Meša Selimović

## SAŽETAK

Menopauza, odnosno klimakterij, sastavni je dio procesa starenja svake žene. S obzirom na sve učestaliju primjenu dodataka prehrani koji sadržavaju fitoestrogene te sve veći broj prisutnih proizvoda na tržištu, raste i interes znanstvene zajednice za ove proizvode. Rastuću uporabu dodataka prehrani koji sadrže fitoestrogene prati i otkrivanje novih biljnih vrsta koje sadrže spomenute biološki aktivne tvari. S obzirom na navedeno, jasna je potreba za razvojem novih analitičkih metoda za određivanje i aktivnih i štetnih tvari u sirovinama koje se koriste u proizvodnji te u gotovim komercijalno dostupnim proizvodima.

Ovaj je rad obuhvatio ispitivanja uzoraka hrane, biljnog industrijskog materijala te gotovih proizvoda koji sadržavaju soju i crvenu djetelinu, kao predstavnike dobro poznatih biljnih vrsta koje sadržavaju fitoestrogene te hmelja, konopljike i lana, kao predstavnike novije generacije biljnih vrsta koje sadržavaju fitoestrogene.

Glavni je cilj ovog rada razviti nove, pouzdane analitičke metode namijenjene identifikaciji i određivanju sadržaja aktivnih tvari u sirovinama i dodacima prehrani koji se koriste u ublažavanju simptoma menopauze. U radu su korištene napredne analitičke tehnike: masena spektrometrija s neposrednim unosom uzorka u sustav (engl. *Direct Injection Mass Spectrometry*, DI-MS<sup>n</sup>) te vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije (engl. *Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS). Identifikacija deset biološki aktivnih tvari provedena je primjenom DI-MS<sup>n</sup> tehnike, dok je istodobno određivanje jedanaest biološki aktivnih tvari osigurano primjenom LC-MS/MS tehnike. Nadalje, uz navedene tehnike u radu je korištena i UV/VIS spektrofotometrija. Folin–Ciocalteu metoda primijenjena je za određivanje sadržaja ukupnih polifenola dok je antioksidacijski učinak ispitan primjenom DPPH, ABTS i RPA metoda.

Analizom ispitanih uzoraka utvrđene su velike razlike u sadržaju bioloških aktivnih tvari između uzorka te su kod pojedinih uzoraka nađene i razlike u sadržaju bioloških aktivnih tvari između različitih proizvodnih serija.

Ključne riječi: menopauza, analitička metoda, hrana, biljni industrijski materijal, dodatak prehrani, DI-MS<sup>n</sup>, LC-MS/MS, antioksidacijski test

## SUMMARY

**BACKGROUND:** Menopause is a normal and natural part of every woman's aging process. It can be declared only after 12 consecutive months of amenorrhea and marks the end of the menstrual cycle. Most women reach menopause between ages of 45 and 55. Menopause sometimes occurs earlier than expected as result of medical treatment such as hysterectomy, whilst in some women it can be delayed to the late 50s. The changes associated with menopause can affect a woman's quality of life. Principal health concerns of menopausal women include vasomotor, sexual, the musculoskeletal system and psychological symptoms. Hormone replacement therapy is the most efficient treatment of menopause-related symptoms. Estrogen-only therapy is recommended for women with surgically removed uterus while combination therapy with a progestin is recommended for women with an intact uterus. Pharmacotherapy includes selective estrogen receptor modulators and, in some cases, serotonin reuptake inhibitors for managing vasomotor symptoms and related disturbances. In addition to conventional medicine, there are a variety of plant-based therapies used to alleviate the symptoms of menopause. Their use has become more prominent followed by Women's Health Initiative (WHI) research that has greatly changed the view on the use and benefits of hormone replacement therapy. A growing consumption of phytoestrogen-containing dietary supplements is accompanied by interest of the scientific community in these products especially in new plant species that contain these biologically active substances. In the light of the above mentioned, new analytical methods for the determination of both active and toxic substances in raw materials and finished products are essential.

**AIM:** The aim of this study was to develop new, reliable analytical methods for the identification and determination of active substances in food, raw material and commercially available dietary supplement products used in the alleviation of menopausal symptoms. Furthermore, Folin Ciocalteu method was applied for determination of total polyphenol content in these samples, while their antioxidant efficacy was evaluated using DPPH, ABTS and RPA methods.

**METHODS:** The following samples were included in the study: 4 food samples, 5 dietary supplement raw materials and 20 dietary supplement products containing soybean, red clover, hops, chaste tree and flax. The dietary supplements analyzed in this work were in multiple dosage forms: tablets, capsules and tinctures.

Eleven phytoestrogens, including four isoflavones (daidzein, genistein, formononetin and biochanin A), three prenylflavonoids (8-prenylnaringenin, xanthohumol and isoxanthohumol),



two other flavonoids (flavonapigenin and flavanol casticin) and two lignans (matairesinol, secoisolariciresinol) were analysed.

Sophisticated analytical techniques were used: Direct Injection Mass Spectrometry (DI-MSn) and Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). Identification of ten biologically active substances was performed using the DI-MSn technique, while the simultaneous determination with gradient elution on reversed-phase chromatographic column of eleven biologically active substances was achieved using the LC-MS/MS technique. Furthermore, UV/VIS spectrometry was used for Folin Ciocalteu, DDPH, ABTS and RPA methods. All methods were validated according to ICH Q2 (R1) guidelines.

**RESULTS:** The DI-MS technique was used for optimization of a multi-target method for identification of marker compounds in phytoestrogen rich food, raw materials and dietary supplements. Preliminary research has shown that prenylflavonoids isoxanthohumol and xanthohumol have identical pseudomolecular ion and fragmentation pattern. Therefore, this prenylflavonoids cannot be unambiguously identified in the selected samples. The external pump flow and the operating MS parameters of the ion source and trap were optimized to obtain the best performance of mass spectrometer for the identification of all active ingredients. Parameters such as ionization mode, capillary voltage, nebulizer gas pressure, drying gas flow and temperature, ion accumulation time and number of ions trapped in the analyzer were systematically evaluated until the highest signal intensity of all phytoestrogens was achieved. To select the most abundant parent and fragment ions as candidates for identification by MRM analysis of samples, the fragmentation pattern of each analyte was investigated. All selected ions for MRM analysis had a signal intensity greater than  $6 \cdot 10^3$  ions. In addition, other less abundant fragment ions were also monitored to aid in proper identification of the selected phytoestrogens. None of the analysed phytoestrogens was identified in the food samples, and only two, out of five dietary supplement raw material contained detectable levels of phytoestrogens. The soy isoflavonoids were found in all soy-based monopreparations and only one multibotanical dietary supplement. Five monobotanical chasteberry-based products were investigated and none of marker compounds, apigenin and casticin, was detected in those samples. Detectable levels of isoflavones formononetin and biochanin A were found in one red clover monobotanical and one multibotanical dietary supplement. Detectable levels of prenylflavonoids were not found in any hop based dietary supplements. The detectable level of secoisolariciresinol was found in only one flax based dietary supplement indicating that this lignan is the most abundant phytoestrogen in flax-based products.

A new multi-target method for determination of eleven phytoestrogens as marker compounds in one single LC/MS/MS analysis has been developed, validated and applied for analysis of food, raw materials and formulated dietary supplement samples. To obtain separation of 11 analytes in a reasonable total analysis time gradient analysis was applied. The separation of polar compounds was achieved using a less steep gradient elution as well as isocratic hold at first 15 min of run time. Afterwards, the gradient steepness was subsequently increased to elute more hydrophobic compounds. This selective MS detection allowed reliable quantitation of all analytes in a single chromatographic run in a reasonable time (31 min). The final data acquisition of MS measurements was performed by working in MRM mode. To enhance the sensitivity of the method the MS/MS acquisition time was divided in 10 separate time groups based on the retention times of the analytes. According to the obtained results the most concentrate source of phytoestrogens was sample containing the total amount of 12.3 mg red clover isoflavonoids per gram of pooled supplement. Furthermore, the highest total phytoestrogen content per dosage was found in red clover and hop based dietary supplement (6.61 mg/tablet). Calculations for the actual daily dose of total phytoestrogens ranged from 0.01 to 6.61 mg among the different products. Finally, all derived total phytoestrogen amounts turned out to be below the total content stated by manufacturers (less than 63% of the claimed specifications).

Folin Ciocalteu method was used for determination of total polyphenol content in phytoestrogen-containing samples. Among investigated raw materials the lowest amount of total polyphenols was found in hop-based samples. Soy- and red clover-based dietary supplements were richer source of total polyphenols than hop-, chaste berry- and flax-based dietary supplements containing.

DPPH method was applied for analysis of phytoestrogen-containing samples. Among investigated raw materials the lowest IC<sub>50</sub> value was found for chaste berry-based material, while the highest for hop-based material. Comparison of data obtained for food samples and raw materials reveals lower capability of raw material for binding DPPH radical. Overall, dietary supplements neutralise DPPH radical better than raw materials, with lowest values found for samples containing soy and red clover.

ABTS method was applied for analysis of phytoestrogen-containing samples. Analysis of raw material samples have shown that the lowest IC<sub>50</sub> values were found for hop-based material and the highest values for the flax-based material. Again, in dietary supplements with soy IC<sub>50</sub> was the lowest in soy dietary supplements, and the highest in chaste berry dietary supplements.

RPA method was applied for analysis of phytoestrogen-containing samples. In general, dietary supplement raw materials have shown better reduction capability than food samples. The highest reduction capability was found for soy- and red clover-based dietary supplements followed by samples containing flax.

CONCLUSION: In this work new methods were developed, validated and successfully applied for analysis of biologically active compounds in three different groups of samples (food, raw material and dietary supplement). Fast screening method for identification of active ingredients was developed using low-cost and eco-friendly DI-MS<sup>n</sup> technique. On the other hand, sophisticated LC/MS/MS technique enabled multi-target determination of phytoestrogens as marker compounds in one single analysis. Together with performed antioxidant test, results showed high variability in biologically active compound content among investigated products as well as high batch-to-batch variability for several products.

Key words: menopause, analytical method, food, dietary supplement raw material, dietary supplement, DI-MS<sup>n</sup>, LC-MS/MS, antioxidant test

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	3
2.1. Biljne vrste koje sadržavaju fitoestrogene .....	3
2.2. Dodatci prehrani.....	5
2.3. Analitičke tehnike u istraživanju dodataka prehrani koji sadržavaju fitoestrogene.....	6
2.3.1. Analitičke metode za ispitivanje sadržaja fitoestrogena u soji, crvenoj djetelini, hmelju, lanu i konopljici	6
2.3.2. Analitičke metode za određivanje antioksidacijskog učinka fitoestrogena u soji, crvenoj djetelini, hmelju, lanu i konopljici .....	8
3. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	12
4. MATERIJALI I METODE.....	13
4.1. Standardne supstancije .....	13
4.2. Uzorci dodataka prehrani .....	13
4.3. Uzorci biljnog industrijskog materijala.....	14
4.4. Uzorci prehrambenih proizvoda.....	14
4.5. Reagensi, organska otapala, plinovi i ostale kemikalije.....	15
4.6. Instrumenti i pribor .....	15
4.7. Programski paketi.....	16
4.8. Analitičke metode .....	17
4.8.1. Identifikacija aktivnih djelatnih tvari primjenom di-msn tehnike.....	17
4.8.2. Određivanje sadržaja fitoestrogena primjenom lc/ms/ms tehnike.....	18
4.8.3. Određivanje ukupnih polifenola folin-ciocalteu metodom.....	20
4.8.4. Određivanje sposobnosti hvatanja dp <sup>•</sup> ph slobodnog radikala.....	20
4.8.5. Određivanje sposobnosti hvatanja abts slobodnog radikala .....	21
4.8.6. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(iii).....	22
4.9. Statistička analiza.....	24
5. REZULTATI I RASPRAVA.....	25
5.1. Ekstrakcija fitoestrogena .....	27
5.2. Identifikacija fitoestrogena primjenom DI-MS <sup>n</sup> tehnike.....	28
5.2.1. Razvoj DI-MS <sup>n</sup> metode.....	28
5.2.2. Primjena DI-MS <sup>n</sup> metode .....	31
5.3. Određivanje fitoestrogena primjenom lc/ms/ms tehnike .....	34
5.3.1. Razvoj lc/ms/ms metode.....	34
5.3.2. Validacija lc/ms/ms metode.....	39
5.3.3. Primjena novorazvijene metode za analizu hrane, biljnih industrijskih materijala i dodataka prehrani	43
5.4. Sadržaj ukupnih polifenola određen folin ciocalteu metodom.....	50
5.4.1. Modifikacija folin ciocalteu metode.....	50
5.4.2. Validacija folin ciocalteu metode .....	51

5.4.3.	Primjena folin-ciocalteu metode za određivanje ukupnih polifenola u uzorcima hrane, biljnoga industrijskog materijala i dodataka prehrani.....	52
5.5.	DDPH metoda za određivanje antioksidacijskog učinka.....	58
5.5.1.	Modifikacija dpph metode.....	58
5.5.2.	Validacija dpph metode.....	58
5.5.3.	Primjena dpph metode za analizu hrane, biljnih industrijskih materijala i dodataka prehrani....	60
5.6.	ABTS metoda za određivanje antioksidacijskog učinka.....	65
5.6.1.	Modifikacija ABTS metode.....	65
5.6.2.	Validacija ABTS metode.....	65
5.6.3.	Primjena ABTS metode za analizu hrane, biljnih industrijskih materijala i dodataka prehrani..	67
5.7.	RPA metoda za određivanje antioksidacijskog učinka.....	72
5.7.1.	Izrada kalibracijske krivulje.....	72
5.7.2.	Primjena rpa metode za analizu uzoraka hrane, biljnog industrijskog materijala i dodataka prehrani	72
5.8.	Usporedba rezultata dobivenih kromatografskim i spektrofotometrijskim metodama.....	77
6.	ZAKLJUČCI.....	80
7.	LITERATURA.....	82
8.	PRILOZI.....	92
9.	ŽIVOTOPIS.....	97

TEMELJNA DOKUMENTACIJA KARTICA

BASIC DOCUMENTARY CARD

## 1. UVOD

Menopauza, odnosno klimakterij, sastavni je dio procesa starenja svake žene. Nastaje 12 mjeseci nakon posljednje menstruacije te označava završetak menstrualnog ciklusa. U većine žena pojavljuje se između 45. i 55. godine, iako može nastati i prije (posebice u žena kojima je uklonjena maternica), ali i poslije. Kako je navedeno, menopauza je prirodni proces, ne nastaje preko noći pa većina žena razvije pojedine simptome i prije potpunog prekida ciklusa, a menstruacije postaju nepravilne (dulje ili kraće od uobičajenog, s kraćim ili duljim ciklusima). To se razdoblje naziva perimenopauzom.

Perimenopauza može trajati od 4 do 8 godina, prema Sjevernoameričkom Društvu Menopauze (engl. *North American Menopause Society*) ili od 6 do 10 godina prema Centru za istraživanja menstrualnog ciklusa i ovulacije (engl. *Centre for Menstrual Cycle and Ovulation Research*).

Postmenopauza se često poistovjećuje s menopauzom. Definicije su im gotovo identične (da bi se definirala postmenopauza mora proći najmanje dvanaest mjeseci od posljednje menstruacije). Taj pojam označava dio ženina života u kojima su jajnici potpuno neaktivni.

Upravo je starenje jajnika, odnosno neaktivnost otpuštanja gonadotropnih hormona (estrogena i progesterona) glavni uzročnik menopauze.

Za sva tri razdoblja menopauze karakteristična je mogućnost nastanka velikog broja različitih simptoma koji znatno umanjuju kvalitetu ženina života.

Simptome je moguće podijeliti:

- u vazomotorne – napadi vrućine („valunzi“), preznojavanje, osjećaj hladnoće, ukočenost ekstremiteta
- u seksualne – vaginitis, suhoća vagine, gubitak spolnog nagona
- u mišićno-koštane – bol i napetost u leđima, ramenima, zglobovima, mišićna slabost i
- u psihološke – umor, iritabilnost, nesanica, depresija, napetost.

Iako se menopauza ne smatra bolešću nego normalnim razdobljem ženina života, navedeni simptomi mogu u pojedinaca biti znatno izraženi pa se primjenjuju različite metode liječenja kako bi se oni otklonili.

U terapijske svrhe primjenjuje se hormonska nadomjesna terapija, s estrogenom u žena kojima je uklonjena maternica, ili u kombinaciji s progestinom, u žena s netaknutom maternicom. U farmakoterapiju ubrajaju se selektivni modulatori estrogenskih receptora te u

pojedinin slučajevima inhibitori ponovne pohrane serotonina kad su izraženi vazomotorni simptomi.

Od ostalih metoda otklanjanja simptoma menopauze ponajprije se ističe primjena biljnih vrsta koje sadrže fitoestrogene (Chen 2015).

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Biljne vrste koje sadržavaju fitoestrogene

Nakon objavljivanja rezultata istraživanja Ženske zdravstvene inicijative (engl. *Women's Health Initiative*, WHI) iz 2002. godine, koji su uvelike promijenili stajalište o primjeni i dobiti hormonske nadomjesne terapije dulje razdoblje, pokazalo se da njihova primjena povisuje nastanak srčano-krvožilnih bolesti, tumora te povisuje morbiditet (Rossouw, Anderson & Prentice 2002).

Primjena biljnih vrsta koje sadrže fitoestrogene raste, kao i broj znanstvenih istraživanja u kojima se ispituje njihova djelotvornost i sigurnost primjene. U skladu s time otkrivaju se nove biljne vrste koje sadržavaju fitoestrogene na kojima se provode ispitivanja i koje se primjenjuju u svrhu otklanjanja, odnosno olakšavanja simptoma menopauze, kao zasebni proizvodi ili kao kombinirani.

Ovaj je rad obuhvatio ispitivanja uzoraka hrane, biljnog industrijskog materijala te gotovih proizvoda koji sadržavaju soju i crvenu djetelinu, kao predstavnike prvih primjenjivanih biljnih vrsta koje sadržavaju fitoestrogene te hmelja, konopljike i lana, kao predstavnike novije generacije biljnih vrsta koje sadržavaju fitoestrogene.

#### **Soja – *Glycine max* (L.) Merr., Fabaceae**

Soja je među najčešće korištenima biljnim vrstama koje sadrže fitoestrogene na kojima je proveden najveći broj znanstvenih istraživanja. U zapadnim se zemljama unosi u svakidašnjoj prehrani ili kao dodatak prehrani. Veliki broj znanstvenih istraživanja proveden je kako bi se procijenio učinak sojinih izoflavona na različite tegobe menopauze i bolesti koje se s njom povezuju. Ispitan je učinak na smanjenje napada vrućine, odnosno učestalosti njihovih pojava (Salinas 2017, Carroll 2006). Ispitivanja učinka izoflavona na osteoporozi obuhvaćala su parametre poput sastava minerala u kostima, mineralnu gustoću kostiju te markere koštane resorpcije (Arjmandi 2005, Dalais 2003, Gallagher 2004, Uesugi 2002). Nadalje, provedeno je više epidemioloških studija o povezanosti raka dojke i konzumacije soje, a antioksidacijski učinci sojinih izoflavona u *in vitro* i *in vivo* studijama upućuju na mogućnost prevencije oksidacijskog oštećenja ili aterogeneze (Gencel 2012).



### **Crvena djetelina – *Trifolium pratense* L., Fabaceae**

Kako crvena djetelina, poput soje sadržava izoflavone, u provedenim je istraživanjima ispitan njihov utjecaj na slične tegobe menopauze i bolesti koje se s njima povezuju (Kargozar 2017, Ghazanfarpour 2016)

### **Hmelj – *Humulus lupulus* L., Cannabaceae**

Premda su pozitivni i blagotvorni učinci hmelja na zdravlje čovjeka već dugo poznati, tek se u novije vrijeme primjenjuje za ublažavanje menopauzalnih simptoma. Glavne sastavnice hmelja kojima se pripisuju fitoestrogenska svojstva su ksantohumol, izoksantohumol te 8-prenilnaringenin koji se ubraja među tvari s najistaknutijim fitoestrogenskim djelovanjem (Keiler 2013). Ispitivanja učinkovitosti provedena su na sastavnicama hmelja (Ming 2012, Hümpel 2005, Bowe 2006), biljnim ekstraktima (Di Viesti 2011, Heyerick 2006) te gotovim proizvodima (Morali 2011).

### **Lan – *Linum usitatissimum* L., Linaceae**

Do sada provedena ispitivanja, koja su obuhvaćala primjenu lana i njegovih sastavnica lignana u menopauzi, većinom su obuhvaćala procjenu učinka na poboljšanje lipidnog profila žena u menopauzi. Ispitan je utjecaj na parametre poput ukupne koncentracije kolesterola, koncentracije triglicerida te koncentracije LDL i HDL kolesterola (Cambell 2013, Patade 2008, Lucas 2002).

Pojedina ispitivanja uključivala su i utjecaj na smanjenje simptoma menopauze, prema Kuppermanovu indeksu, učinak na debljinu endometrija te vaginalnu citologiju (Colli 2012).

## **Konopljika – *Vitex agnus-castus* L., Verbenaceae**

Konopljika se dugo primjenjuje u reproduktivnom razdoblju ženina života najčešće u svrhu otklanjanja tegoba povezanih s predmenstrualnim simptomom. Velika većina provedenih ispitivanja, koja su uključivala konopljiku, upravo se i odnose na tu vrstu primjene. Budući da konopljika sadržava biološki aktivne tvari koje se mogu vezati za estrogenske receptore poput apigenina u posljednje vrijeme se kombinira s navedenim biljnim vrstama (Kargozar 2017). Ipak, potrebno je provesti dodatna znanstvena istraživanja kako bi se ispitao učinak konopljike na ublažavanje simptoma menopauze.

### **2.2. Dodatci prehrani**

Na tržištu Republike Hrvatske posljednjih su godina dostupni mnogi proizvodi koji sadržavaju biljne vrste s fitoestrogenima kao biološki aktivnim tvarima. Te je proizvode moguće registrirati kao biljni lijek ili medicinski proizvod čime se osiguravaju visoki standard kvalitete, stroga kontrola kakvoće te kao dodatak prehrani, što omogućuje kraće razdoblje potrebno za registraciju proizvoda i niže troškove njezine provedbe.

Prema definiciji, dodacima prehrani smatraju se pripravci proizvedeni iz koncentriranih izvora hranjivih tvari (vitamini i minerali) ili drugih tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom kojima je svrha dodatno obogatiti uobičajenu prehranu radi održavanja zdravlja (aminokiseline, esencijalne masne kiseline, vlakna, biljne vrste, ekstrakti biljnih vrsta, mikroorganizmi, jestive gljive, alge, pčelinji proizvodi i druge tvari s hranjivim ili fiziološkim učinkom). Stavljanje na tržište dodataka prehrani, označavanje i sastav uređeno 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).

Pravilnikom o dodacima prehrani preuzete su odredbe Direktive 2002/46/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 10. lipnja 2002. o usklađivanju zakona država članica u vezi s dodacima prehrani.

Od podnositelja zahtjeva za stavljanje na tržište u Republici Hrvatskoj traži se da podnese, među ostalim, proizvođačku specifikaciju s podacima o kvalitativnom i

kvantitativnom sastavu proizvoda, načinu dobivanja, kemijskom sastavu (glavne sastavnice), zatim podatci o količini aktivnih tvari, navodi o interakcijama i o netoksičnosti te sigurnosti primjene kod ljudi.

Premda podnositelj zahtjeva mora dostaviti navedenu dokumentaciju, kontrola tih proizvoda provodi se isključivo samo tijekom njihove registracije, a u iznimnim je slučajevima naknadno provodi sanitarna inspekcija.

Pri registraciji proizvoda propisana je kontrola njegove zdravstvene ispravnosti, koja obuhvaća osnovne analize (mikrobiološka analiza, sadržaj teških metala, organoleptička analiza), specifične analize (udio pesticida, prisutnost GMO-a, mikotoksina, bojila, konzervansa i alergena) te ciljane analize za osnovnu (udio ugljikohidrata, masti, bjelančevina, procjena energetske vrijednosti) i za specifičnu (sadržaj vitamina, minerala i ostalih bioaktivnih tvari) nutritivnu vrijednost (Zakon, NN 39/2013-722).

Međutim, ako se pročita definicija dodataka prehrani, koja govori da ti proizvodi ne služe liječenju nego samo pomažu u održavanju zdravlja, da se dobivaju iz koncentriranih hranjivih tvari i da u osnovi upotpunjuju svakidašnju prehranu, vidljivo je da se od njih, za sada prema zakonima, i ne očekuje dokazivanje djelotvornosti ni standardizacija djelatnih tvari.

Mnoga znanstvena istraživanja upućuju na odstupanje sastava aktivnih i toksičnih tvari u dodatcima prehrani s obzirom na sastav koji se navodi na deklaraciji proizvoda (Vaclavik 2014). Upravo zbog takvih proizvoda nameće se pitanje kvalitete dodataka prehrani i pozitivnog učinka za zdravlje pacijenta.

### 2.3. Analitičke tehnike u istraživanju dodataka prehrani koji sadržavaju fitoestrogene

S obzirom na sve učestaliju primjenu dodataka prehrani koji sadržavaju fitoestrogene te sve veći broj prisutnih proizvoda na tržištu, jasna je potreba za razvojem novih analitičkih metoda za određivanje i aktivnih i štetnih tvari u sirovinama koje se koriste u proizvodnji te u gotovim proizvodima.

#### 2.3.1. Analitičke metode za ispitivanje sadržaja fitoestrogena u soji, crvenoj djetelini, hmelju, lanu i konopljiki

Do danas je u znanstvenoj i stručnoj literaturi objavljen veliki broj analitičkih metoda za ispitivanje prisutnosti i određivanje fitoestrogena u dodatcima prehrani. Tehnike koje su se primijenile u tu svrhu mogu se podijeliti u dvije skupine: kromatografske te

nekromatografske. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) povezana s raznovrsnim detektorima najčešće je korištena kromatografska tehnika kod ovakvih ispitivanja. Kod ove tehnike pokretna faza pod povišenim tlakom prolazi kroz kromatografsku kolonu u kojoj je smještena nepokretna faza (Nguyen 2006). Ubrizgavač je dio uređaja HPLC za uvođenje tekućeg uzorka. Kolona odvaja sastavnice uzorka primjenom različitih fizikalnih i kemijskih parametara. Analiti prolaze kroz kolonu pri različitim brzinama i razdvajaju se prema afinitetu za nepokretnu fazu kolone (Gritti 2013). Zadnji dio HPLC uređaja je detektor koji se koristi za identifikaciju i određivanje analita (Markovitch 2020). Detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD), zbog niske cijene, primjenjivosti na veliki broj analita te mogućeg povezivanja s drugim vrstama detektora, prikladan je odabir za ovu vrstu analiza (Boniglia 2009, Yanaka 2012, Almeida 2015, Krenn 2006, Delmonte 2006, Fukahori 2014). Ipak ograničenja tog detektora, poput slabe specifičnosti i osjetljivosti zajedno s HPLC tehnikom dovode do dugotrajnih analitičkih postupaka neprikladnih za rutinske analize. Vrijeme analitičkog postupka Magiera i suradnici (Magiera 2015) vidljivo su skratili primjenom tekućinske kromatografije ultra-visoke djelotvornosti (engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC). Isto je postignuto i primjenom selektivnoga i osjetljivoga detektora masenog spektrometra (engl. *Mass Spectrometer*, MS) (Romani 2010, Chen 2005) te tandemskoga masenog spektrometra (engl. *Tandem Mass Spectrometer*, MS/MS) (Coldham 2001, Andres 2015, Delmonte 2006, Clarke 2008). Pregledom znanstvene i stručne literature utvrđeno je da je samo jedna metoda objavljena za određivanje fitoestrogena u dodatcima prehrani primjenom jednostavne tehnike niske cijene tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Thin-Layer Chromatography*, HPTLC) (Sowa 2014). Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatograph*, GC) se također pokazala kao prikladna analitička tehnika za određivanje fitoestrogena u dodatcima prehrani, no zahtjeva osjetljive i dugotrajne predanalitički postupci koji obuhvaćaju derivatizaciju analita (Thompson 2007). Uz navedeno, primjenjivala se i UV/Vis tehnika za analizu fitoestrogena u dodatcima prehrani. Koristila se u određivanju izoflavona (daizdein, genistein, formononetin) u biljnim vrstama porodice *Leguminaceae* (Ha 2006), određivanju pojedinih aglikona i glikozida deset različitih izoflavona u uzorcima biljnog materijala (Klejdus 2008) te u određivanju ukupnih flavonoida u ekstraktima lišća smokve, rogača i pistacije (Vaya 2006). Osim gore navedenih široko primjenjivanih tehnika za ispitivanje prisutnosti i određivanje fitoestrogena u dodatcima prehrani korištene su i neke manje uobičajene tehnike. Tako se, primjerice, voltametrijska tehnika pokazala kao prikladna tehnika za određivanje fitoestrogena u

datcima prehrani, zbog svoje jednostavnosti, visoke osjetljivosti te relativno niskih troškova (Fogliatto 2010).

Većina analitičkih metoda objavljenih za određivanje fitoestrogena u datcima prehrani obuhvaćala je ispitivanje samo pojedine skupine fitoestrogena. No, komercijalno dostupni dodatci prehrani često sadržavaju kombinaciju nekoliko biljnih vrsta u svrhu postizanja sinergijskog učinka, odnosno otklanjanja simptoma menopauze. Zbog zahtjevnosti razvoja takvih metoda nije iznenađujuće da je u literaturi dostupno samo nekolicina metoda za određivanje fitoestrogena iz različitih biljnih vrsta (Clarke 2008., Thompson 2007.).

Prema našim spoznajama do danas nije razvijena analitička metoda za istovremenu ekstrakciju te određivanje većeg broja fitoestrogena kao vodećih djelatnih tvari u datcima prehrani koji sadržavaju raznovrsne biljne izvore kao što su soja, crvena djetelina, konopljika, hmelj i lan.

### 2.3.2. Analitičke metode za određivanje antioksidacijskog učinka fitoestrogena u soji, crvenoj djetelini, hmelju, lanu i konopljici

Fenoli, u koje spadaju i fitoestrogeni, čine veliku skupinu sekundarnih metabolita. Do danas su poznati desetci tisuća različitih spojeva koji pripadaju toj skupini, a nalazimo ih u gotovo svim višim biljnim vrstama. Premda veliki broj spojeva spada u tu skupinu, oni imaju neka zajednička svojstva, poput antioksidacijskog djelovanja. Upravo ono ih čini skupinom spojeva iznimno važnih za ljudski organizam te za njegovu zaštitu.

Fenoli su podložni „napadu” slobodnih radikala ili reaktivnih oksidacijskih radikala stvarajući stabilni fenolni radikal. Na taj način neutraliziraju slobodne radikale i pokazuju antioksidacijski učinak.

Provedena ispitivanja sa sintetskim antioksidansima fenolne prirode, poput troloksa i butiliranog hidroksitoluena, jasno su pokazala da djeluju različitom brzinom pri oksidacijskom stresu te je moguće relativno lako izmjeriti njihovu sposobnost vezanja slobodnih radikala. Posljednjih desetljeća veliki broj metoda postao je dostupan za mjerenje antioksidacijskog učinka biljnog materijala. Među testove koji se najčešće koriste ubrajaju se: Folin-Ciocalteuov (FC) test, DPPH test (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), ABTS test (engl. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*) te test reduktivne sposobnosti (engl. *Reducing Power Assay*, RPA).

Kolorimetrijske reakcije imaju široku primjenu u UV/VIS spektrofotometrijskoj tehnici. Analitičke metode primjenom ove tehnike lako se izvode, brze su, rutinski se koriste u svakidašnjoj laboratorijskoj praksi te se kao dodatna prednost ističe niska cijena analiza.

Ukupni fenoli određuju se kao dobar pokazatelj antioksidacijskog djelovanja. Istraživanja su pokazala povezanost između udjela fenolnih sastavnica uzoraka i antioksidacijskog učinka. Određivanje ukupnih fenola provodi se FC metodom uz primjenu standardne otopine. FC reagens sastoji se od fosfovolframvoske i fosfomolibdenske kiseline te je ta smjesa obojena žuto. Te se kiseline, u reakciji s fenolnim sastavnicama, reduciraju u plavo obojene okside, a njihovu je koncentraciju moguće odrediti spektrofotometrijski jer intenzitet obojenja ovisi o koncentraciji fenolnih sastavnica u uzorku. Kako bi nastali kompleks bio stabilan, reakcija se provodi u alkalnome mediju uz dodatak natrijeva karbonata (Blainski 2013).

DPPH radikal je komercijalno dostupan stabilan oblik dušikova radikala u kojem nespareni elektron u strukturi radikala pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (ljubičasto obojen). U reakciji s antioksidansima DPPH radikal reducira se u hidrazin pri čemu se prati smanjenje apsorpcije pri valnoj duljini od približno 515 nm:



Nastalo obezbojenje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona. Najčešće se sposobnost hvatanja slobodnih radikala antioksidansa izračunava s pomoću postotka preostalog radikala jer je navedena vrijednost proporcionalna koncentraciji samog antioksidansa. Antioksidacijski učinak moguće je izraziti i na osnovi  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti koja označava koncentraciju antioksidansa potrebnu za smanjenje početne koncentracije DPPH radikala za 50 %. Ta je metoda jednostavna, pouzdana te prikladna za rutinske analize. Štoviše, reagensi i oprema za njeno izvođenje su financijski nezahtjevni te nije iznenađujuće da je široko primjenjivana za veliki broj raznosvrskih uzoraka (Molineux 2004).

Mehanizam ABTS metode sličan je mehanizmu DPPH metode. Ta metoda određivanja antioksidacijskog učinka koristi plavo-zelenu obojeni radikal 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonske kiseline), koji također dodatkom antioksidansa blijedi.

Neutralizacija ABTS radikal-kationa prati se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 670 – 734 nm, a prikazana je u jednadžbi 2.



Dobiveni se rezultati najčešće iskazuju kao ekvivalenti pojedinih primijenjenih standarda, poput Troloxa ili askorbinske kiseline (Sochor 2010).

RPA metoda je još jedna kolorimetrijska metoda koja se temelji na izmjeni jednog elektrona te se njome mjeri sposobnost redukcije. Kod te metode u prisutnosti antioksidansa dolazi do redukcije žuto obojenog kompleksa Fe(III)-TPTZ u plavo obojeni kompleks Fe(II)-TPTZ, što se prati pri valnoj duljini od 593 nm.

Kako je navedeno, zbog jednostavnosti, brzine te financijske prihvatljivosti navedene metode za ispitivanje antioksidacijskog učinka ubrajaju se u rutinske analitičke postupke koji su do sada primijenjeni na različitim uzorcima. Premda su do sada provedena ispitivanja na mnogim biljnim vrstama, uključujući i one koje sadržavaju i fitoestrogene, mali broj istraživanja proveden je na dodatcima prehrani kao komercijalno dostupnim proizvodima. Većina znanstvenih istraživanja uključila je u ispitivanje antioksidacijske učinkovitosti biljnih vrsta, koje sadržavaju fitoestrogene, više metoda koje se temelje na različitim mehanizmima te različite postupke ekstrakcije djelatnih tvari iz biljnog materijala (Indranupakorn 2010, Orhan 2011, Maltas 2011).

Antioksidacijska učinkovitost soje ispitana je ovisno o vrsti soje (Malenčić 2007, Mujić 2011, Orhan 2011) te zrelosti sjemena (Avila 2012). Ispitani su utjecaj postupka fermentacije na antioksidacijski učinak soje (Chaiyavat 2010, Moktan 2008) te utjecaj vlažne granulacije (Chaiyavat 2010). Osim na biljnom materijalu, ispitivanja su provedena na izolatu sojinih proteina (Mitra 2014). Potrebno je istaknuti kako su Georgetti i suradnici različitim metodama ispitali i antioksidacijski učinak dodatka prehrani koji sadržava ekstrakt soje s deklariranim sadržajem s više od 40 % izoflavonoida. Dobivene vrijednosti bile su u rasponu 2,9 – 196,0 mg/g (Georgetti 2007).

Ispitivanja provedena na crvenoj djetelini pokazala su da je ta biljna vrsta iznimno bogat izvor antioksidansa (Küçükboyacı 2013, Tundis i sur. 2015, Esmali 2015). S druge strane, prema našim saznanjima ni jedno istraživanje nije provedeno na dodatcima prehrani koji sadržavaju ekstrakt te biljne vrste.

Pregledom literature utvrđeno je kako su mnoge znanstvene skupine istraživanja usmjerile na antioksidacijski učinak hmelja. U sklopu navedenih istraživanja evaluirana je antioksidacijska učinkovitost različitih podvrsta i dijelova biljke (Abram 2015, Niknejad 2014). Ispitan je i utjecaj skupljanja, skladištenja i pohrane biljnog materijala na sadržaj biološki aktivnih tvari koje pokazuju antioksidacijski učinak (Krofta 2008). Različite tehnike predobrade uzoraka ispitivane su u svrhu optimizacije ekstrakcije biološki aktivnih (Wojdylo 2007, Morales 2012, Kowalczyk 2013 Gil-Ramirez 2012). Istraživanja antioksidacijskog učinka bila su usmjerena i na izolirane fitoestrogene (Zhang 2014).

Uočljivo manji broj istraživanja proveden je u svrhu ispitivanja antioksidacijskog učinka lana. Većina istraživanja usmjerena je na optimizaciju ekstrakcije (vrijeme, temperatura, ekstrakcijsko sredstvo, uklanjanje masne komponente iz uzoraka...) polifenola iz sjemenaka lana bogatih omega-3 masnim kiselinama (Anwar 2012, Sargi 2013, Karamac 2014).

Sve navedene metode za ispitivanje antioksidacijske učinkovitosti uzoraka primijenjene su na uzorcima konopljike. Srž ovih ispitivanja bila je optimizacija postupka ekstrakcije polifenola iz biljnog materijala. U tu su se svrhu koristila otapala različite polarnosti (Latoui 2012, Rashed 2013, Shaikh 2010, Maltas 2010, Saglam 2007, Sarikurkcü 2009).

Prema podacima iz literature moguće je utvrditi da je veći broj istraživanja proveden u svrhu ispitivanja antioksidacijske učinkovitosti biljnih vrsta soje, crvene djeteline, konopljike, hmelja i lana. Međutim, prema našim spoznajama do danas nije provedeno određivanje antioksidativne učinkovitosti dodataka prehrani koji sadržavaju raznovrsne biljne izvore kao što su soja, crvena djetelina, konopljika, hmelj i lan kao izvore polifenola.



### 3. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Dodaci prehrani s ekstraktima biljnih vrsta, soja (*Glycine max* (L.) Merr.), crvena djetelina (*Trifolium pratense* L.), hmelj (*Humulus Lupulus* L.), lan (*Linum usitatissimum* L.) i konopljika (*Vitex agnus-castus* L.), sadrže biološki aktivne tvari koje pokazuju fitoestrogenski učinak u ublažavanju simptoma menopauze, kao i antioksidacijsku učinkovitost.

Ciljevi:

1. Razviti brzu metodu za identifikaciju fitoestrogena primjenom masene spektrometrije s izravnim unosom uzoraka.
2. Razviti novu metodu za istovremenu analizu 11 fitoestrogena u biljnim ekstraktima i dodacima prehrani u različitim farmaceutskim oblicima primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije.
3. Optimizirati spektrofotometrijske metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti fitoestrogena.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Standardne supstancije

- apigenin  $\geq 95$  % (HPLC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- biokanin A  $\geq 95$  % (HPLC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- kasticin  $\geq 98$  % (HPLC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- daizdein  $\geq 95$  % (HPLC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- genistein  $\geq 97$  % (HPLC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- formononetin  $> 98$  % (HPLC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- izoksantohumul  $\geq 99$  % (HPLC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- matairezinol  $\geq 95$  % (HPLC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- sekoizolariciresinol  $\geq 95$  % (HPLC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- ksantohumul  $\geq 96$  % (HPLC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- 8-prenilnaringenin  $\geq 95$  % (HPLC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)

### 4.2. Uzorci dodataka prehrani<sup>1</sup>

- Belmiran san (Belupo, Koprivnica, Hrvatska)
- Bonisan (Dietpharm, Rakitje, Hrvatska)
- Cirkulin valerijana (Roha Arzneimittel GmbH, Bremen, Njemačka)
- Evine kapi (Suban ljekovito bilje, Strmec, Hrvatska)
- FemFlax (Palmer Natural Products, Star, Idaho, SAD)
- Feminal (Jadran Galenski laboratorij, Rijeka, Hrvatska)
- Herbal Female Complex (Solgar Inc., Leonia, New Jersey, SAD)
- Maxi life mega soy (Twinlab, Hauppauge, New York, SAD)
- Meno Guide (Erba Vita S.p.A., San Marino, Italija)
- Menopause (Helvetia Direct Marketing s. r. o., Prag, Češka Republika)
- Menopause relief (Natural wealth, Milsing d. o. o., Zagreb, Hrvatska)
- NaturalMax Premenstrual solution (Natural Balance, Englewood, California, SAD)
- Pausa (Specchiasol s.r.l, Bussolengo, Italija)
- Phytoestrogen one daily (Solaray, Park City, Utah, SAD)

---

<sup>1</sup> Detaljan opis uzoraka naveden je u Prilogu 8.3.

- Red Clover Blossom (Solaray, Park City, Utah, SAD)
- Soja Flavon (Dietpharm, Rakitje, Hrvatska)
- Sojini izoflavoni (Natural Wealth, Milsing d. o. o., Zagreb, Hrvatska)
- Vitality for Women (Kal, Park City, Utah, SAD)
- Solaray Vitex (Solaray, Park City, Utah, SAD)
- Vitex Solutio (Specchiasol S.r.l., Bussolengo, Italija)

#### 4.3. Uzorci biljnog industrijskog materijala<sup>2</sup>

- suhi ekstrahirani biljni materijal crvene djeteline – *Trifolium pratense* L., Fabaceae (Specchiasol, s.r.l, Bussolengo, Italija)
- suhi ekstrahirani biljni materijal hmelja – *Humulus lupulus* L., Cannabaceae (Specchiasol s.r.l, Bussolengo, Italija)
- suhi ekstrahirani biljni materijal konopljike – *Vitex agnus castus* L., Lamiaceae (Specchiasol s.r.l, Bussolengo, Italija)
- suhi ekstrahirani biljni materijal lana – *Linum usitatissimum* L., Linaceae (Specchiasol s.r.l, Bussolengo, Italija)
- suhi ekstrahirani biljni materijal soje – *Glycine max* (L.) Merr., Fabaceae (Specchiasol s.r.l, Bussolengo, Italija)

#### 4.4. Uzorci prehrambenih proizvoda<sup>3</sup>

- lan – sjeme – *Linum usitatissimum* L., Linaceae (Bio&bio, Zagreb, Hrvatska)
- lan – sjeme – *Linum usitatissimum* L., Linaceae (Garden, Zagreb, Hrvatska)
- soja – zrno – *Glycine max* (L.) Merr., Fabaceae (Bio&bio, Zagreb, Hrvatska)
- soja – zrno – *Glycine max* (L.) Merr., Fabaceae (Podravka, Koprivnica, Hrvatska)

---

<sup>2</sup> Detaljan opis uzoraka naveden je u Prilogu 8.2.

<sup>3</sup> Detaljan opis uzoraka naveden je u Prilogu 8.1.

#### 4.5. Reagensi, organska otapala, plinovi i ostale kemikalije

- ABTS reagens  $\geq 98$  % (čistoće za HPLC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- acetonitril (čistoće za HPLC) (Scharlau, Barcelona, Španjolska)
- askorbinska kiselina  $\geq 99$  % (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- DPPH reagens  $> 90$  % (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- etanol (čistoće za HPLC) (J. T. Baker, Center Valley, PA, SAD)
- $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  97 % (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Folin-Ciocalteuov reagens 97 % (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- galna kiselina 97,5 – 102,5 % (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- generator dušika NM30LA (Peak Scientific, Renfrewshire, UK)
- helij  $> 99,999$  %vol (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)
- $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$   $\geq 99$  % (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$   $\geq 99$  % (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- otopina za kalibraciju masenog spektrometra (Agilent Technologies, Waldbrunn, Njemačka)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  bezvodni 99,5 – 101,0 % (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- metanol 98 – 100 %, p. a. čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- mravlja kiselina 98 – 100 %, p. a. čistoće (T. T. T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- natrijev hidroksid  $> 97$  % (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- bezvodni natrijev karbonat  $\geq 99,5$  % (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- petroleter (40 – 70 °C) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- trikloroctena kiselina  $\geq 99$  % (Semikem, Sarajevo, Bosna i Hercegovina)

#### 4.6. Instrumenti i pribor

- analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- bočice za uzorkovanje (Agilent Technologies, Waldbrunn, Njemačka)
- ACRODISC® injekcijski PTFE membranski filter, diam. 13 mm, veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- centrifugirka (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- pH-metar FiveEasy F20 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- generator dušika NM30LA (PEAK Scientific, Renfrewshire, Velika Britanija)

- kolona za tekućinsku kromatografiju Symmetry C18 dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 µm (Waters, Milford, SAD)
- maseni spektrometar s ionizacijskom tehnikom elektroraspršenja i analizatorom stupicom za ione LC/MSD Trap VL (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- magnetska mješalica C-MAG HS7 (IKA-Werke, Staufen, Njemačka)
- mlin Knifetec 1095 (Foss Tecator AB, Höganäs, Švedska)
- Soxtec 2055 (Foss Tecator AB, Höganäs, Švedska)
- spektrofotometar Agilent 8453 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- stakleni sustav za filtriranje otapala (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- sustav za pročišćavanje vode Mili-Q (Millipore, Bedford, SAD)
- tekućinski kromatograf Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- ultrazvučna kupelj S 30 H Elmasonic (Elma, Singen, Njemačka)
- vanjska pumpa za izravno unošenje uzoraka u spektrometar masa (KD Scientific Inc., Holliston, SAD)

#### **4.7. Programski paketi**

- Chemstation (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- GraphPadPrism verzija 5.03 (GraphPad Software, La Jolla, SAD)
- HP845 UV-Visible Chemstation System Rev. A. 07.02 (Agilent Technologies, Mulgrave, SAD)
- LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Microsoft® Office Excel 2007 (Microsoft, Seattle, SAD)
- OriginPro 7.5 SRO (OriginLab Corporation, Northampton, SAD)
- Programski jezik R (verzija 4.0.5)
- SigmaPlot za Windowse verzija 12.0 (Systat Software, San Jose, SAD)

## 4.8. Analitičke metode

### 4.8.1. Identifikacija aktivnih djelatnih tvari primjenom di-msn tehnike

#### 4.8.1.1. Priprema standardnih otopina i uzoraka

Matične standardne otopine fitoestrogena (daizdeina, genisteina, biokanina A, formononetina, ksantohumola, 8-prenilnaringenina, matairezina, sekoizolaricirezinola, apigenina i kasticina) koncentracija od 1,0 mg/mL pripremljene su otapanjem u acetonitrilu te su pohranjene u hladnjak na 4 °C gdje su bile stabilne pet dana. Prije analize sve su standardne otopine filtrirane kroz PTFE membranski filter veličine pora od 0,45 µm.

Uzorci hrane, sojine i lanene sjemenke, usitnjeni su uz primjenu mlina Knifetec 1095. Nakon usitnjavanja uzorci ( $1 \pm 0,02$  g) su stavljeni u porozne celulozne posude i odmašćeni petroleterom (70 mL) tijekom dva sata te nakon 30 minuta pohranjeni u vakuumu na 40 °C.

Uzorci biljnih industrijskih materijala usitnjeni su i homogenizirani u tarioniku s tučkom.

Deset tableta dodataka prehrani odvagano je i usitnjeno u fini prah u tarioniku s tučkom, dok je sadržaj deset kapsula odvagano, objedinjeno te usitnjeno u fini prah.

Usitnjeni i homogenizirani uzorci preneseni su ( $1 \pm 0,02$  g) u odmjerne tikvice (10 mL) te je do oznake dodan apsolutni etanol. Uzorci su nakon toga stavljeni u ultrazvučnu kupelj na 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Dobiveni ekstrakt je centrifugiran na 3000 g deset minuta pri sobnoj temperaturi, supernatant je filtriran kroz PTFE membranski filter veličine pora od 0,45 µm.

Uzorci dodataka prehrani u tekućem obliku analizirani su bez prethodne obrade.

#### 4.8.1.2. Masena spektrometrija s izravnim unosom uzoraka

Identifikacija deset fitoestrogena provedena je masenim spektrometrom s ionizacijskom tehnikom elektroraspršenja i analizatorom stupicom za ione koji je svaki dan kalibriran. Vanjska pumpa uporabljena je za unos uzoraka pri protoku od 5 mL/min. Temperatura izvora iona iznosila je 350 °C, a napon na kapilari 3,5 kV. Dušik se koristio kao plin za raspršivanje pri protoku od 10,0 L/min i tlaku od 20,0 psi. Tijekom analize praćeni su pozitivno nabijeni ioni. Spektar snimanja masa bio je u rasponu  $m/z$  vrijednosti od 100 do 500. U analizatoru je bilo zadržano 10 000 iona, a vrijeme zadržavanja iona iznosilo je 200 ms. Za fragmentiranje iona uporabljen je plin helij. Analize su provedene MRM načinom

(engl. *Multiple Reaction Monitoring*), a uvjeti praćenja prikazani su u tablici 1. Prikupljanje i obrada podataka izvedeni su primjenom računalnog programa LC/MSD Trap v.5.2. Sva mjerenja provedena su u triplikatu.

Tablica 1. Prijelazi MRM načina snimanja te ioni nastali fragmentacijom pseudomolekularnog iona

ANALIT	TRANZICIJA	FRAGMENTNI IONI
apigenin	271→225	153, 225, 243
biokanin A	285→270	153, 229, 253, 270
kasticin	375→360	315, 345, 360
daidzein	255→227	137, 181, 199, 227, 237
formononetin	269→254	137, 213, 237, 254
genistein	271→243	153, 197, 215, 243, 253
matairezinol	359→341	137, 341
sekoizolaricirezinol	345→327	137, 327
ksantohumol	355→299	179, 235, 299
8-prenilnaringenin	341→285	165, 221, 285

#### 4.8.2. Određivanje sadržaja fitoestrogena primjenom lc/ms/ms tehnike

##### 4.8.2.1. Priprema standardnih otopina i uzoraka

Matične standardne otopine fitoestrogena (daizdeina, genisteina, biokanina A, formononetina, ksantohumola, izoksantohumola, 8-prenilnaringenina, matairezinola, sekoizolaricirezinola, apigenina i kasticina) koncentracija od 1,0 mg/mL pripremljene su otapanjem u acetonitrilu te su pohranjene u hladnjak na 4 °C gdje su bile stabilne pet dana.

Radne standardne otopine koje su se koristile za razvoj, optimizaciju i validaciju metode priređene su neposredno prije mjerenja razrjeđivanjem do odgovarajuće koncentracije acetonitrilom. Prije analize sve su standardne otopine filtrirane kroz PTFE membranski filter veličine pora od 0,45 µm.

Uzorci hrane, biljnih industrijskih materijala i dodataka prehrani priređeni su prema postupcima navedenima u poglavlju 4.8.1.1.

#### 4.8.2.2. Vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije

Analiza jedanaest fitoestrogena provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti obrnutih faza (engl. *Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC) primjenom instrumenta Agilent 1100 opremljen automatskim injektorom, kvaternom pumpom, komorom za termostatiranje kolone, DAD detektorom (engl. *Diode Array Detector*) te masenim spektrometrom s ionizacijskom tehnikom elektroraspršenja i analizatorom stupicom za ione. Odjeljivanje je provedeno primjenom Symmetry C18 kolone, dimenzija 150 mm x 4,6 mm i veličine čestica 3,5  $\mu\text{m}$ . Pokretna faza sastojala se od 0,1 %-tne otopine mravlje kiseline u ultračistoj vodi (eluenta A) i 0,1 %-tne otopine mravlje kiseline u acetonitrilu (eluent B) uz elucijske uvjete prikazane u tablici 2. Analiza je trajala 45 minuta te je dodatnih 10 minuta bilo potrebno za pripremu sustava za analizu sljedećeg uzorka. Brzina protoka pokretne faze iznosila je 1,0 mL/min.

Tablica 2. Gradijent otapala za dodjeljivanje 11 fitoestrogena LC/DAD/MS/MS metodom

VRIJEME (min)	UDIO ELUENTA A (%)	UDIO ELUENTA B (%)
0 – 10	90	10
10 – 15	65	35
15 – 25	65	35
25 – 30	50	50
30 – 40	90	10
40 – 45	10	90

Nakon pripreme uzorci su pohranjeni u automatskom injektoru pri temperaturi od 4 °C u tamnim bočicama za uzorkovanje. Volumen injektiranja iznosio je 10  $\mu\text{L}$ , a temperatura kolone bila je  $25,0 \pm 0,1$  °C.

Trećina pokretne faze eluirana s tekućinskog kromatografa dovedena je do masenog spektrometra. Uzorci su analizirani u pozitivnom ionizacijskome modu. Temperatura izvora iona iznosila je 350 °C, a napon na kapilari 3,5 kV. Dušik se koristio kao plin za raspršivanje pri protoku od 10,0 L/min i tlaku od 20,0 psi. Spektar snimanja masa bio je u rasponu  $m/z$  vrijednosti od 100 do 600. Fragmentacija iona potaknuta je helijem kao kolizijskim plinom. MRM prijelazi prikazani su u tablici 1. Prikupljanje i obrada podataka izvedeni su primjenom



računalnog programa ChemStation for LC 3D i LC/MSD Trap v.5.2. Sva mjerenja provedena su u triplikatu.

#### 4.8.3. Oodređivanje ukupnih polifenola folin-ciocalteu metodom

##### 4.8.3.1. Priprema standardnih otopina i uzorka

Matična otopina galne kiseline koncentracije mg/mL pripremljena je otapanjem u ultračistoj vodi. Pripremljena otopina pohranjena je u hladnjak (4 °C) te je bila stabilna sedam dana.

Radne otopine koje su se koristile za razvoj, optimizaciju i validaciju metode priređene su neposredno prije mjerenja razrjeđivanjem matične otopine do odgovarajuće koncentracije ultračistom vodom.

Otopine FC reagensa i natrij karbonata korištene u razvoju, optimizaciji i validaciji metode priređene su neposredno prije mjerenja.

Otopina FC reagensa priređena je razrjeđivanjem ultračistom vodom, u omjeru 1 : 10, a zasićena otopina Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> priređena je otapanjem 10,75 g bezvodnog Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u odmjerne tikvici od 100 mL u ultračistoj vodi.

Uzorci hrane, biljnih industrijskih materijala i dodataka prehrani priređeni su prema postupcima navedenima u poglavlju 4.8.1.1.

##### 4.8.3.2. UV/VIS spektrofotometrija

Alikvot od 400 µL pojedinog uzorka pomiješan je u tamnoj odmjerne tikvici od 10 mL s 2 mL FC reagensa te je sadržaj tikvice dopunjen do oznake otopinom 10,75 % bezvodnog Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Ako je bilo potrebno, ekstrakti su razrijeđeni apsolutnim etanolom.

Mjerenja su obavljena 10 minuta nakon pripreme reakcijske smjese na UV/VIS spektrofotometru, na sobnoj temperaturi, zaštićena od izravne izloženosti svjetlu. Apsorbancija je mjerena pri 740 nm uz ultračistu vodu kao slijepu probu. Sva mjerenja provedena su u triplikatu.

#### 4.8.4. Određivanje sposobnosti hvatanja dpph slobodnog radikala

##### 4.8.4.1. Priprema standardnih otopina i uzorka

Matična otopina askorbinske kiseline koncentracije od 0,2 mg/mL pripremljena je otapanjem supstancije u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL. Otopina je čuvana u hladnjaku na 4 °C i bila je stabilna sedam dana.

Otopina DPPH radikala, 0,1 mg/mL u apsolutnom etanolu, korištena za razvoj, optimizaciju i validaciju metode pripremana je neposredno prije mjerenja.

Neposredno prije ispitivanja pripremljene su osnovne otopine uzoraka hrane, biljnih industrijskih materijala i dodataka prehrani prema postupcima navedenima u poglavlju 4.8.1.1. iz kojih su serijskim razrjeđivanjem dobiveni nizovi testiranih koncentracija u rasponu od 0,2 do 100 mg/mL.

#### 4.8.4.2. UV/VIS spektrofotometrija

Reakcijske smjese (mjerne otopine) priređene su u odmjernim tikvicama od 5 mL dodatkom 450 mL etanolne otopine uzorka te dopunjavanjem do oznake etanolnom otopinom DPPH radikala. Otopina za određivanje maksimalne apsorpcije (u vremenu  $t = 0$ ) priređena je na isti način samo se umjesto uzorka koristio etanol.

Nakon pripreme reakcijske smjese njezin je sadržaj snažno promućkan te je smjesa inkubirana pri sobnoj temperaturi na tamnome mjestu 30 minuta.

Apsorbancija uzoraka, zaštićenih od izravne izloženosti svjetlu, izmjerena je na UV/VIS spektrofotometru na valnoj duljini od 515 nm pri sobnoj temperaturi. Kao slijepa proba koristio se etanol. Sva su mjerenja provedena u triplikatu.

#### 4.8.5. Određivanje sposobnosti hvatanja abts slobodnog radikala

##### 4.8.5.1. Priprema standardnih otopina i uzorka

Standardna otopina askorbinske kiseline koncentracije 0,1 mg/mL pripremljena je otapanjem u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL. Otopina je čuvana u hladnjaku na 4 °C i bila je stabilna sedam dana.

Matična otopina ABTS pripremljena je vaganjem 38,41 mg te otapanjem u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 5 mL. Matična otopina  $K_2S_2O_8$  pripremljena je vaganjem 6,6 mg te otapanjem u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 5 mL.

Otopina ABTS radikala nastaje miješanjem gore navedenih otopina u jednakim omjerima pri čemu neposredno nakon miješanja počinje stvaranje ABTS radikala uz nastanak

plavo-zelenog obojenja. Kako bi se osigurao potpuni završetak reakcije, otopina je pohranjena 12 sati u mraku dok nije nastao konačni intenzitet boje. Radne otopine ABTS-a pripravljene su razrjeđivanjem otopine s ultračistom vodom dok se nije postigla apsorbancija u rasponu od 0,7 do 0,8, pri valnoj duljini od 734 nm. Matične otopine ABTS-a i  $K_2S_2O_8$  pripravljene su svaki drugi dan, a radne otopine ABTS radikala neposredno prije mjerenja. Matične otopine čuvane su u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C.

Uzorci hrane, biljnih industrijskih materijala i dodataka prehrani priređeni su prema postupcima navedenim u poglavlju 4.8.1.1. iz kojih su serijskim razrjeđivanjem dobiveni nizovi testiranih koncentracija u rasponu od 0,2 do 100 mg/mL.

#### 4.8.5.2. UV/VIS spektrofotometrija

Reakcijske smjese (mjerne otopine) priređene su u odmjernim tikvicama od 5 mL dodatkom 300  $\mu$ L etanolne otopine uzorka te dopunjavanjem do oznake otopinom ABTS radikala. Otopina za određivanje maksimalne apsorbancije (u vremenu  $t = 0$ ) priređena je na isti način samo se umjesto uzorka koristio etanol.

Nakon pripreme reakcijske smjese njezin je sadržaj snažno promućkan te je premješten u kivetu UV/VIS spektrofotometra. Mjerenja su obavljena šest minuta nakon pripreme reakcijske smjese na valnoj duljini od 734 nm uz ultračistu vodu kao slijepu probu. Sva mjerenja provedena su u triplikatu.

#### 4.8.6. Određivanje sposobnosti redukcije iona željeza(iii)

##### 4.8.6.1. Priprema standardnih otopina i uzorka

Fosfatni pufer (0,2 M, pH 6,6) pripremljen je miješanjem 250 mL otopine  $KH_2PO_4$  (27 g/L) te 89 mL otopine NaOH (8 g/L).

Otopina  $K_3(Fe(CN)_6)$  u ultračistoj vodi (1 %, w/v) pripravljena je u odmjernoj tikvici od 100 mL. Otopina je čuvana u hladnjaku na 4 °C te je bila stabilna sedam dana.

Otopina trikloroctene kiseline u ultračistoj vodi (10 %, w/v) pripravljena je u odmjernoj tikvici od 100 mL. Otopina je čuvana u hladnjaku na 4 °C te je bila stabilna sedam dana.

Otopina željezova klorida u ultračistoj vodi (0,1 %, w/v) pripremljena je u odmjernoj tikvici od 100 mL. Pripremala se svaki dan, neposredno prije upotrebe.

Otopina askorbinske kiseline u ultračistoj vodi (0,025 mg/mL) pripremljena je u odmjernoj tikvici od 100 mL.

Uzorci hrane, biljnih industrijskih materijala i dodataka prehrani priređeni su prema postupcima navedenima u poglavlju 4.8.1.1. iz kojih su serijskim razrjeđivanjem dobiveni nizovi testiranih koncentracija od 0,2 do 100 mg/mL.

#### 4.8.6.2. UV/VIS spektrofotometrija

Reakcijska smjesa (mjerna otopina) priređena je dodatkom 1 mL uzorka, 2,5 mL fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6) i 2,5 mL 1 %-tne otopine kalijeva heksacijanoferata. Reakcijska smjesa je nakon toga inkubirana 20 minuta na vodenoj kupelji pri 50 °C. Nakon inkubacije u reakcijsku je smjesu dodano 2,5 mL 10 %-tne otopine trikloroctene kiseline te je smjesa centrifugirana 10 minuta pri 1750 okretaja/minuti. Alikovotu od 2,5 mL gornjeg sloja reakcijske smjese dodano je 2,5 mL ultračiste vode i 0,5 mL 0,1 %-tne otopine željezova (III) klorida.

Sva mjerenja provedena su na UV/VIS spektrofotometru, na sobnoj temperaturi, zaštićena od izravne izloženosti svjetlu. Apsorbancija je mjerena pri 700 nm. Za slijepu probu koristila se ultračista voda. Sva mjerenja provedena su u triplikatu.

#### 4.9. Statistička analiza

Za statističku obradu dobivenih rezultata koristili su se računalni programi Microsoft Exel 2007, GraphPadPrism verzija 5.03 te SigmaPlot za Windowse verzija 12.0. Dobiveni podatci prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija triju određivanja. Koncentracije uzoraka koje ostvaruju 50 %-tni učinak ( $IC_{50}$ ) dobivene su interpolacijom na temelju linearne regresijske analize odnosa koncentracije i učinka ili logaritma testiranih koncentracija i pripadajućih postotaka inhibicije koristeći se metodom najmanjih kvadrata. Linearna ovisnost između svih parova metoda je određena Pearsonovim koeficijentom korelacije, a međusobna monotona nelinearna ovisnost između dviju metoda je određena Kendallovim koeficijentom korelacije.

Statistička analiza je napravljena u programskom jeziku R (verzija 4.0.5).

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom doktorskom radu razvijene su i validirane metode za tri različite skupine proizvoda (hrana, biljni industrijski materijal i dodaci prehrani) koji sadržavaju pet najčešće upotrebljavanih biljnih vrsta (soja, crvena djetelina, hmelj, lan i konopljika), u čijem sastavu se nalaze fitoestrogenske aktivne tvari. Uzorci hrane i dodataka prehrani analizirani u ovome doktorskom radu svakodnevno se primjenjuju kod žena u različitim fazama menopauze. Biljni industrijski materijal čini važnu skupinu uzoraka s obzirom na to da se upravo oni koriste u proizvodnji dodataka prehrani i osnova su za dobivanje kvalitetnog i sigurnog proizvoda.

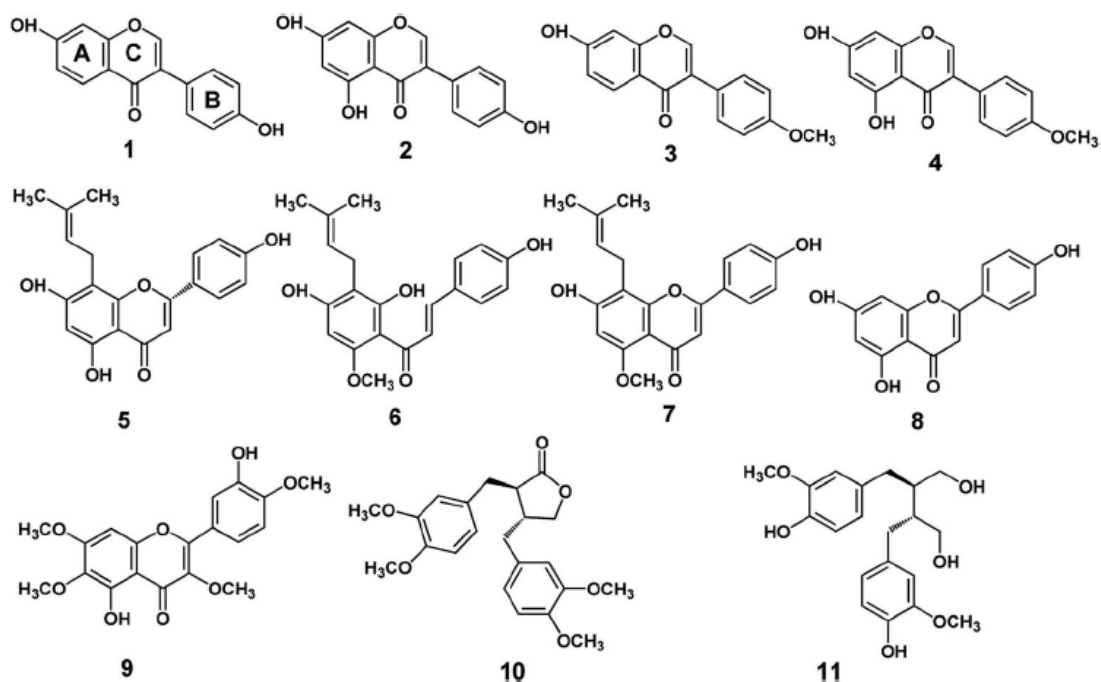
Odabrani dodaci prehrani, čiji je detaljan opis dan u tablici priloga 8.3. dostupni su na hrvatskom tržištu.

Ispitivane djelatne tvari odabrane su na osnovi svojih udjela i fitoestrogenskih djelovanja u navedenim biljnim vrstama.

Ispitane djelatne tvari spadaju u skupinu fenola, zajedničko u njihovoj kemijskoj strukturi je hidroksilna skupina (-OH) vezana izravno na aromatski prsten. Fenolne tvari dijele se na jednostavne fenole ili polifenole, ovisno o broju fenolnih skupina u molekuli.

Fenole uključene u ovo istraživanje moguće je podijeliti u sljedeće skupine:

- Izoflavoni (daizdein, genistein, biochanin A, formononetin) koje karakterizira zajednička 3-fenil-krom-4-on struktura, a razlikuju se u prisutnosti metoksilnih i hidroksilnih skupina
- Prenilflavonoidi (ksantohumol, izoksanthumol, 8-prenilnaringenin) od kojih izoksanthumol i 8-prenilnaringenin spadaju u podskupinu flavonoida koji imaju hidrofobnu prenilnu skupinu vezanu na flavonoidnu strukturu, a ksantohumol je kalkanoid koji sadržava hidrofobnu prenilnu skupinu u svojoj strukturi
- Lignani (matairezinol, sekoisolaricirezinol) koji su dimeri fenilpropana povezani beta-beta vezama. Matairezinol sadržava dodatni oksolan prsten, a sekoisolaricirezinol samo dva fenilna prstena
- Flavoni (apigenin) koji sadržava fenilbenzopiranski prsten
- Flavonoli (kasticin) koji na položaju 3 sadržavaju hidroksilnu skupinu (slika 1.).



Slika 1. Kemijske strukture ispitivanih fitoestrogena: daidzein (1), genistein (2), formononetin (3), biochanin A (4), 8-prenilnaringenin (5), ksantohumul (6), izoksantohumul (7), apigenin (8), kasticin (9), matairezol (10) i sekoizolaricirezol (11)

Prvo je proveden postupak optimizacije ekstrakcije u svrhu dobivanja što veće ekstrakcijske učinkovitosti za sve analizirane biološki aktivne tvari. Zatim se primijenila DI-MS<sup>n</sup> tehnika u svrhu njihove identifikacije u raznovrsnim uzorcima. Nadalje, primjena LC/MS/MS tehnike omogućila je određivanje sadržaja fitoestrogena u ispitivanim uzorcima i usporedbu dobivenih vrijednosti s deklariranim sadržajem. S obzirom da se zadnjih desetljeća naglašava nužnost unosa većih količina biljnih polifenola u organizam zbog njihovog antioksidativnog učinka (Apak 2007), u ovome su radu provedena i ispitivanja određivanja sadržaja ukupnih polifenola Folin Ciocalteu metodom i antioksidativnog učinka DPPH, ABTS i RPA metodama.

## 5.1. Ekstrakcija fitoestrogena

Preglednom literature utvrđeno je da se ekstrakcija fitoestrogena iz raznovrsnih uzoraka, primjerice biljnog materijala, prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani, najčešće provodi primjenom organskih otapala. Potrebno je istaknuti da se odabir otapala, udio vode, vrijeme i temperatura ekstrakcije razlikuju ovisno o vrsti uzoraka te o skupini fitoestrogena (Bustamante-Rangel 2018). Kako bi se postigla učinkovita ekstrakcija strukturno različitih fitoestrogena prisutnih u raznovrsnim uzorcima, pratio se utjecaj svakog od uvjeta na ekstrakciju. Prvi korak u optimizaciji ekstrakcije uključivao je odabir organskog otapala. Ispitana je učinkovitost ekstrakcije organskih otapala različite polarnosti etanola i acetonitrila. Primjenom etanola postignuta je bolja ekstrakcijska učinkovitost svih fitoestrogena u odnosu prema acetonitrilu (ekstrakcijska učinkovitost kod acetonitrila bila je niža od 83 % za sve ispitivane djelatne biološki aktivne tvari). Dobiveni rezultati su u skladu s podacima prikazanima u istraživanjima Boniglia i suradnika (Boniglia 2009) te Clarkea i suradnika (Clarke 2008), koji su uočili bolju ekstrakcijsku učinkovitost fitoestrogena iz dodataka prehrani primjenom otapala veće polarnosti. Kako bi se utvrdilo utječe li dodatak vode u organsko otapalo, odnosno etanol na poboljšanje ekstrakcijske učinkovitosti, ekstrakcija fitoestrogena provedena je različitim omjerima etanola i ultračiste vode (dodano je od 10 % do 50 % ultračiste vode u etanol). Dodatkom vode postignuta je i do 17 % niža ekstrakcijska učinkovitost za sve podskupine fitoestrogena. Potrebno je istaknuti i utjecaj temperature na ekstrakcijsku učinkovitost. Uočeno je da je povišena temperatura ekstrakcije blago povećala ekstrakciju većine fitoestrogena. Ipak, zamijećeno je i kako je povišena temperatura prouzročila degradaciju pojedinih fitoestrogena poput 8-prenilnaringenina (približno 50 %). Zato su daljnja ispitivanja provedena na sobnoj temperaturi. Konačno, utvrđeno je da ekstrakcija s pomoću etanola, pri sobnoj temperaturi, u razdoblju od 15 minuta, osigurava zadovoljavajuću ekstrakcijsku učinkovitost za sve ispitane fitoestrogene (više od 88 %). Nadalje, kao prednost opisanoga ekstrakcijskog postupka ističu se jednostavnost, niska cijena analize te kratko vrijeme trajanja postupka. Opisani postupak ekstrakcije primijenjen je za pripremu uzoraka u svim daljnjim ispitivanjima.



## 5.2. Identifikacija fitoestrogena primjenom DI-MS<sup>n</sup> tehnike

Posljednjih godina tehnika direktnog injektiranja uzorka u maseni spektrometar sve je važnija u identifikaciji velikog broja biološki aktivnih tvari u dodacima prehrani (Serić 2014). Glavna je prednost te tehnike mogućnost dobivanja pouzdanih podataka za strukturno različite spojeve prisutne u raznovrsnim uzorcima u kratkom vremenu. Budući da tehnika ne uključuje korak razdvajanja analita te upotrebu organskih otapala, moguće ju je svrstati u ekološki i ekonomski prihvatljive tehnike.

### 5.2.1. Razvoj DI-MS<sup>n</sup> metode

Upravo zato je DI-MS tehnika primijenjena za identifikaciju deset fitoestrogena, koji spadaju u različite skupine, u prehrambenim proizvodima, biljnim industrijskim materijalima i dodacima prehrani koji sadržavaju soju, crvenu djetelinu, konopljiku, hmelj i lan.

Odabir biološki aktivnih tvari uzetih u istraživanje bio je temeljen na njihovoj ulozi u kontroli kvalitete pojedinih proizvoda, ali i tvrdnji navedenoj na deklaraciji proizvoda te je uključivao spojeve iz skupine izoflavona, prenilflavonoida, flavona, flavonola i lignana. Dakle, ispitani su fitoestrogeni: daidzein, genistein, formononetin, biokanin, 8-prenilnaringenin, ksantohumol, apigenin, kasticin, matairezol, sekoizolaricirezol (slika 1.).

Preliminarna istraživanja pokazala su kako izoksanotolumol i ksantohumol imaju iste MS spektre te ih u uzorcima koje sadrže nije moguće jasno razlučiti. Navedeno je bilo i za očekivati zbog sličnosti u njihovim strukturama (slika 1. oznake 5 i 6). Zato su uzorci koji sadrže analit sa istovjetnim spektrom kao ova dva spoja označeni kao da sadržavaju ksantohumol. To predstavlja ograničenje u primjeni DI-MS<sup>n</sup> tehnike u odnosu na LC-MS/MS tehniku čijom primjenom u uspješno određeni svi fitoestrogeni prikazani na slici 1.

Kako bi se identificirali fitoestrogeni u složenim uzorcima bilo je potrebno optimizirati više parametara: protok vanjske pumpe, način ionizacije, naboj kapilare, tlak i protok dušika i temperaturu ionizatora, vrijeme zadržavanja iona te njihov broj u stupici. U poglavlju 3.2.1.2. navedeni su eksperimentalni uvjeti koji su se pokazali najprikladnijima za analizu svih ispitanih fitoestrogena. Sljedeći korak u razvoju analitičke metode uključivao je ispitivanje fragmentacijskih putova svakog analita primjenom standardnih otopina kako bi se izabrao pseudomolekulski ion te njegov fragmentni ion za MRM način snimanja analita u uzorcima.

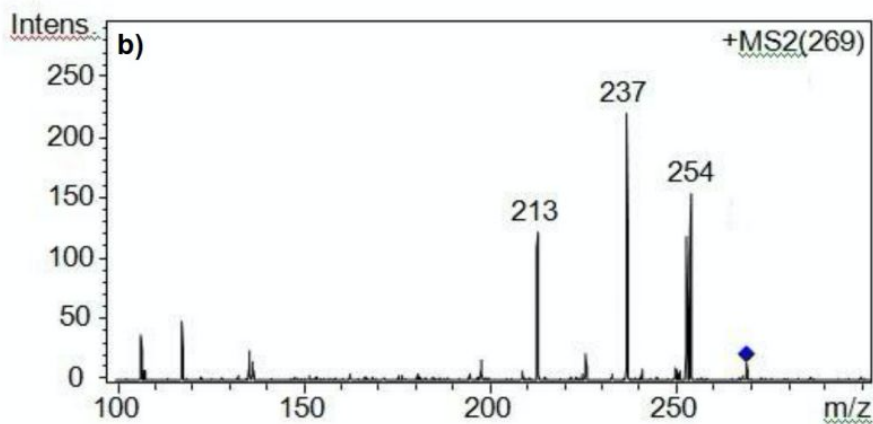
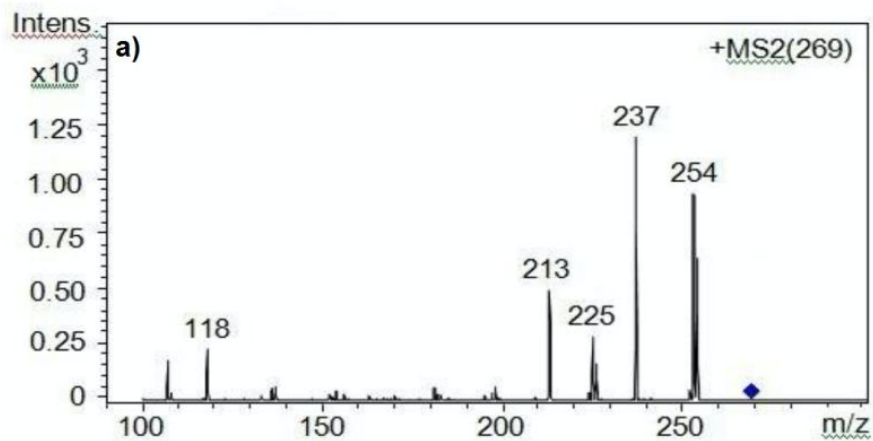
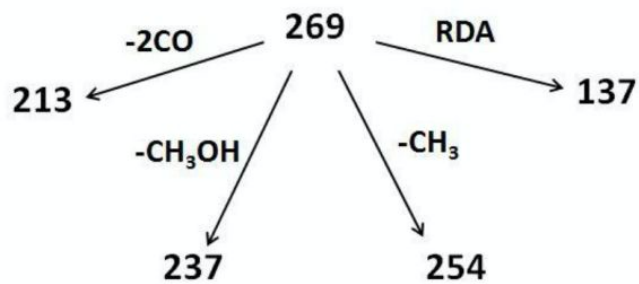
Najzastupljeniji ion u MS spektrima svih izoflavona (daidzeina, genisteina, formononetina, biokanina A) odgovarao je protoniziranoj molekuli  $[M+H]^+$  na  $m/z$  255, 271, 269 i 285. Fragmentacijom pseudomolekulskih iona  $[M+H]^+$  izoflavona dobiveni su složeni ESI-MS/MS spektri. Za sve je izoflavone karakteristična osnovna 3-fenil-krom-4-on struktura te se razlikuju u dodanim metoksilnim ili hidroksilnim skupinama. Analizom MS<sup>2</sup> spektara daidzeina i genisteina utvrđena je prisutnost fragmentnih iona pri  $m/z$  237 za daidzein, odnosno 253 za genistein koji odgovaraju ionu  $[M+H-H_2O]^+$ , a on nastaje gubitkom 18 Da ili molekule vode. Nasuprot tomu, MS<sup>2</sup> fragmentacija pseudomolekulskih iona *O*-metiliranih izoflavona rezultirala je nastankom fragmentnih iona pri  $m/z$  254 (formononetin) i 270 (biokanin A), koji odgovaraju radikal ionu  $[M+H-CH_3]^+$ .  $[M+H]^+$  ioni svih izoflavonoida mogu također izgubiti jednu ili dvije CO skupine, pretpostavlja se s C prstena, čime nastaju fragmentni ioni pri  $m/z$  227 i 199 za daidzein,  $m/z$  243 i 215 za genistein,  $m/z$  213 za formononetin te  $m/z$  229 za biokanin A. Fragmentni ioni pri  $m/z$  181 za daidzein i  $m/z$  197 za genistein odgovaraju gubitku još jedne molekule vode (18 Da) i nastanku iona  $[M+H-2CO-H_2O]^+$ . Istaknuti fragmentni ioni pri  $m/z$  237 (formononetin) i  $m/z$  253 (biokanin A) predstavljaju fragmentni put karakterističan za *O*-metilirane izoflavone. Ti ioni nastanu gubitkom CH<sub>3</sub>OH iz B prstena. Uzevši u obzir zastupljenost navedenih fragmentnih iona, moguće je utvrditi kako je upravo taj fragmentacijski put dominantan kod *O*-metiliranih izoflavona. Jedan od osnovnih putova fragmentacije aglikona flavonoida jest putem retro Diels-Alder reakcije u kojoj šesteročlani prsten, koji sadržava fragmente dvostruke veze, podliježe „premještanju” veza uz nastajanje diena i dienofila (Demarque 2016). Specifični ioni retro Diels-Alderove reakcije su također uočeni u MS<sup>2</sup> spektrima svih ispitivanih izoflavona ( $m/z$  137 za daidzein,  $m/z$  153 za genistein,  $m/z$  137 za formononetin te  $m/z$  153 za biokanin A). No, RDA fragmenti za oba *O*-metilirana izoflavona bili su relativno malo zastupljeni (manje od 3 %) (slika 2a).

U MS spektru apigenina uočen je pseudomolekulski ion koji odgovara protoniziranoj molekuli  $[M+H]^+$  pri  $m/z$  271, dok je MS<sup>2</sup> spektralna analiza pokazala prisutnost samo triju fragmentnih iona:  $m/z$  243 ( $[M+H-CO]^+$ ),  $m/z$  225 ( $[M+H-CO-H_2O]^+$  – najzastupljeniji ion) i  $m/z$  153 ( $(M+H-C_8H_8O)$ -RDA – specifični ion). Nasuprot tomu, MS<sup>2</sup> spektralna analiza metoksiliranog flavonoida kasticina pokazala je progresivni gubitak metilnih skupina s fragmentnim ionima pri  $m/z$  360, 345 i 315. Takva karakteristična fragmentacija izoflavona i flavona dokazana je i u radu Madeira i suradnika (Madeira 2009).

Za lignane sekoizolaricirezinol i matairezinol uočen je karakteristični put fragmentacije koji uključuje progresivni gubitak 18 Da, odnosno molekula vode iz pozitivnih

pseudomolekulskih iona  $[M+H]^+$  pri  $m/z$  345 za sekoizolaricirezinol i  $m/z$  359 za matairezinol. Obje molekule su dimeri fenilpropana, povezana  $\beta$ - $\beta$  vezama koje se razlikuju samo u dodatnom peteročlanom oksolanskom prstenu prisutnom u strukturi matairezinola. Zato je u  $MS^2$  spektrima obaju spojeva moguće uočiti karakterističan fragmentni ion pri  $m/z$  137 koji nastane nakon pucanja središnje veze.

U pozitivnom načinu snimanja, prenilirani kalkanoid ksantohumol dao je protonizirani pseudomolekulski ion  $[M+H]^+$  pri  $m/z$  355, a u  $MS^2$  spektru najzastupljeniji je stabilni ion pri  $m/z$  299  $[M+H-C_4H_8]^+$ . Taj fragmentni ion nastao je nakon gubitka 2-metilpropena iz prenilne skupine. Nadalje su u  $MS^2$  spektru ksantohumola uočljivi RDA fragment pri  $m/z$  235 te fragmentni ion pri  $m/z$  179 koji je nastao daljnjim gubitkom još jedne prenilne skupine iz prstena A. U  $MS^2$  spektru preniliranog flavonoida, 8-prenilnaringenina, uočena su tri glavna fragmentna iona pri  $m/z$  285, 221 i 165. Sličan fragmentacijski put opisan je u znanstvenim radovima koje su objavili Yilmazer i suradnici (Yilmazer 2001) te Prokudina i suradnici (Prokudina 2012).



Slika 2. MS<sup>2</sup> spektar formononetina u standardnoj otopini (a) i uzorku DP10 (b) sapredloženim putovima fragmentacije

### 5.2.2. Primjena DI-MS<sup>n</sup> metode

Nakon proučavanja MS i MS<sup>2</sup> spektra standardnih otopina fitoestrogena, odabrani su ioni za MRM način snimanja (tablica 1.). Svi odabrani ioni imali su intenzitet signala veći od  $6 \cdot 10^3$  iona. Metoda je nakon toga primijenjena za analizu prehrambenih proizvoda, biljnoga

industrijskog materijala i dodataka prehrani. Sva mjerenja provedena su u triplicatu i odstupanja u signala bila su manja od  $\pm 5\%$ . Nadalje, drugi, manje zastupljeni fragmentni ioni također su praćeni u svrhu potvrde identiteta odabranih fitoestrogena.

Nakon što je DI-MS metoda uspješno optimirana, primijenjena je za identifikaciju fitoestrogena u uzorcima. Nijedan od ispitivanih fitoestrogena nije identificiran u ispitanim prehrambenim proizvodima, dok su dva, od ukupno pet, biljna industrijska materijala sadržavala detektabilne razine fitoestrogena. Daidzein i genistein identificirani su u uzorku BIM1 (ekstrakt soje) i u uzorku BIM3 (ekstrakt crvene djeteline). Kako se i očekivalo, u uzorku BIM3 pronađeni su *O*-metilirani izoflavoni, formononetin i biokanin A.

Prema podacima navedenima na deklaraciji proizvoda utvrđeno je da dodatci prehrani označeni oznakama od DP1 do DP15 sadržavaju jednu biljnu vrstu, a pet proizvoda označenih oznakama od DP16 do DP20 sadržava najmanje dvije biljne vrste. Za četiri proizvoda navedeno je da sadržavaju soju (DP1-DP4), što je i potvrđeno DI-MS metodom jer su sojini izoflavoni, daidzein i genistein, identificirani u tim dodatcima prehrani. Fragmentacijski putovi obaju izoflavona u uzorcima bili su u skladu s onima dobivenima analizom standardnih otopina (tablica 1.). Intenzitet signala MRM prijelaza 255→227 bila je od  $9,7 \cdot 10^2$  iona (DP1) do  $1,6 \cdot 10^4$  iona (DP4), a kod prijelaza 271→243 bilo je od  $2,3 \cdot 10^2$  iona (DP3) do  $6,0 \cdot 10^3$  iona (DP4). Potrebno je istaknuti da su najviši signali za oba izoflavona uočeni u uzorku DP4 te se može smatrati najbogatijim izvorom fitoestrogena među dodatcima prehrani koji sadržavaju soju. Nadalje, moglo se očekivati da će se genistein i daidzein identificirati i u uzorcima koji uz soju sadržavaju i konopljiku (DP17), crvenu djetelinu (DP18) te lan (DP19). No, samo su u uzorku DP17 identificirani daidzein (intenzitet signala MRM prijelaza 255→227 iznosio je  $1,1 \cdot 10^3$  iona) i genistein (intenzitet signala MRM prijelaza 271→243 iznosio je  $3,2 \cdot 10^2$  iona).

Prema podacima navedenima na deklaraciji proizvoda utvrđeno je da pet uzoraka dodataka prehrani označenih oznakama od DP5 do DP9 sadržava konopljiku kao jedinu biljnu vrstu. Međutim, ni u jednom od proizvoda analiziranih razvijenom DI-MS metodom nisu identificirani apigenin i kasticin.

Na deklaraciji proizvoda obilježenog oznakom DP10 navedeno je da sadržava crvenu djetelinu kao biljnu vrstu, a proizvod obilježen oznakom DP20 uz crvenu djetelinu sadržava i druge biljne vrste. Izoflavoni formononetin i biokanin A identificirani su u tim proizvodima (intenziteti signala MRM prijenosa 269→254 bili su veći od  $6,0 \cdot 10^3$  iona, a prijenosa 285→270 veći od  $3,7 \cdot 10^3$  iona). I drugi manje zastupljeni fragmentni ioni navedeni u tablici 1. također su praćeni u svrhu potvrde identiteta formononetina i biokanina A u tim

proizvodima. MS<sup>2</sup> spektar formononetina snimljenog analizom uzorka DP10 prikazan je na slici 2b.

Prema podacima navedenima na deklaraciji proizvoda označenih oznakama DP12, DP13, DP14 i DP20 ti proizvodi sadržavaju hmelj. Međutim, u tim uzorcima razvijenom DI-MS metodom nije bilo moguće identificirati prenilflavonoide (8-prenilnaringenin i ksantohumol).

Kao što je navedeno, u uzorcima prehrambenih proizvoda te u biljnome industrijskome materijalu, koji sadržaju lan, razvijenom DI-MS metodom nisu utvrđene mjerljive razine lignana (matairesinola i sekoizolaricirezinola). No, u uzorku DP17, koji sadržava lan, identificiran je sekoizolaricirezinola (intenzitet signala MRM prijenosa 345→327 od  $3,0 \cdot 10^2$  iona), što upućuje na to da bi mogao biti najzastupljeniji fitoestrogen u uzorcima koji sadržavaju lan. Nažalost u MS<sup>2</sup> spektru sekoizolaricirezinola u navedenom uzorku nije uočen fragmentni ion ( $m/z$  137). Takvo se odstupanje moglo i očekivati jer intenziteti signala fragmentnih iona, ovisno o fizičko-kemijskim karakteristikama analita, mogu imati varijabilnost pri nižim koncentracijama analita u složenim uzorcima.

Provedeno istraživanje pokazalo je da se brzom, jednostavnom i ekološki prihvatljivom DI-MS tehnikom mogu identificirati fitoestrogeni prisutni u raznovrsnim uzorcima. Opisana metoda primjenjiva je u rutinskim probirnim analizama velikog broja analita u složenim uzorcima. Međutim, nije pogodna za identifikaciju niskih koncentracija fitoestrogena (manje od 100 mg/kg). Složen sastav ispitivanih uzoraka, posebice onih koji sadržavaju više različitih biljnih vrsta, uzrok je slabe osjetljivosti metode i varijabilnosti u MS<sup>2</sup> spektru analita u standardnoj otopini i u uzorku.

### 5.3. Određivanje fitoestrogena primjenom lc/ms/ms tehnike

Pregledom literature utvrđeno je da za određivanje sadržaja fitoestrogena u prehrambenim proizvodima, biljnim vrstama te dodatcima prehrani postoji više polukvalitativnih i kvalitativnih metoda (Boniglia 2009, Chen 2005, Clarke 2008, Coldham 2001, Mari 2012). Tim je metodama moguće odrediti sadržaj fitoestrogena koji se nalaze u jednoj do dviju biljnih vrsta. Posebice kada se govori o dodatcima prehrani potrebno je istaknuti kako se u tim uzorcima nalazi i po nekoliko biljnih vrsta u istom proizvodu, a s fitoestrogenima iz različitih skupina. S obzirom na navedeni nedostatak analitičkih metoda za analizu fitoestrogena prisutnih u različitim biljnim vrstama, u ovom je radu predložena nova LC/MS/MS metoda. Razvijena metoda omogućuje istovremenu analizu spomenutih pet različitih biljnih vrsta.

#### 5.3.1. Razvoj lc/ms/ms metode

Na vrijeme zadržavanja odabranih fitoestrogena utječu različiti čimbenici, poput njihova afiniteta za nepokretnu fazu, sastava pokretne faze te načina elucije analita. Odvajanje fitoestrogena na kromatografskoj koloni obrnutih faza temelji se na hidrofobnoj interakciji analita s nepokretnom fazom. Najkraće su se na koloni zadržavali daidzein ( $6,79 \pm 0,01$  min) i genistein ( $8,61 \pm 0,01$  min), odnosno polarni analiti koji u strukturi sadržavaju polarne hidroksilne skupine vezane za dva aromatska prstena međusobno povezana mostom od triju ugljikovih atoma. Kako se moglo i predvidjeti, vremena zadržavanja produljivala su se ako su polarne hidroksilne skupine zamijenjene apolarnim metoksilnim skupinama. Zbog toga su formononetin (4-metilirani oblik daidzeina) i biokanin A (4-metilirani oblik genisteina) bili jače vezani na nepokretnoj fazi, u usporedbi s daidzeinom i genisteinom. Na kromatografskoj koloni najdulje su se zadržavali 8-prenilnaringenin ( $26,71 \pm 0,02$  min) te ksantohumol ( $30,42 \pm 0,29$  min), koji sadržavaju hidrofobni prenilni lanac.

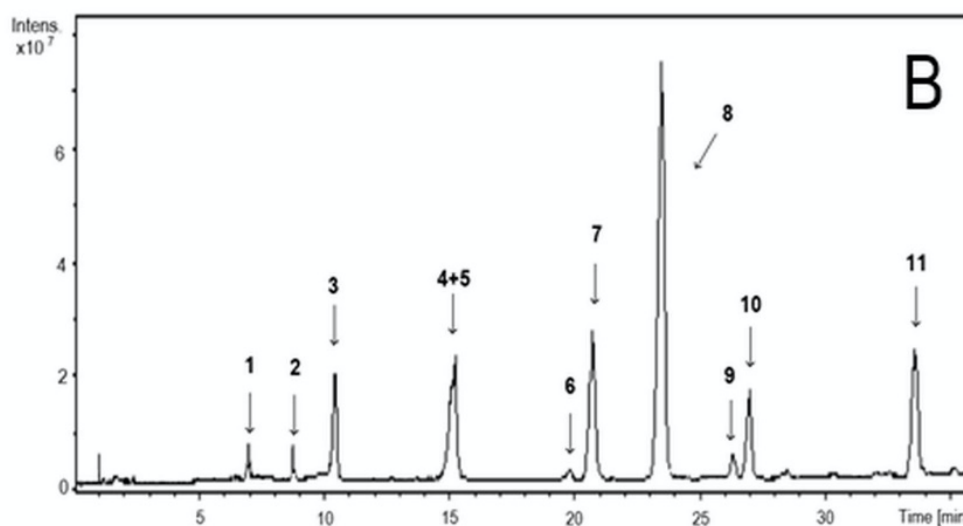
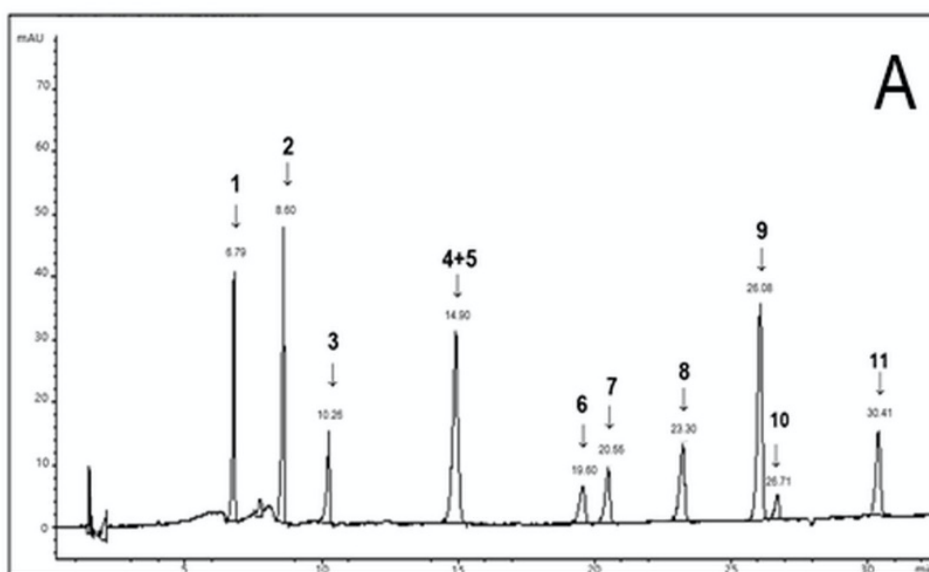
Sastav pokretne faze jedan je od ključnih čimbenika koji utječe na zadržavanje analita, odnosno selektivnost metode, ali i simetričnost samih kromatografskih pikova. Acetonitril je izabran za sastavnicu pokretne faze jer ima nižu viskoznost od metanola. U pokretnu fazu dodana je i mravlja kiselina što je omogućilo učinkovito razdvajanje fitoestrogena uz zadovoljavajuću simetriju pikova.

Kako bi se postiglo učinkovito razdvajanje jedanaest strukturno različitih fitoestrogena te prihvatljivo vrijeme analize, tijekom analize miješan je udio acetonitrila i vode u pokretnoj fazi, to jest primijenjena je gradijentna elucija analita prikazana u tablici 2.

Pregledom literature uočeno je da se za detekciju fitoestrogena najčešće primjenjuje DAD detektor (Delmonte 2006, Krenn 2006, Boniglia 2009, Yanaka 2012, Fukahori 2014, Almeida 2015). Kako je svrha istraživanja bila razviti analitičku metodu koja bi se mogla koristiti u rutinskim istraživanjima, navedeni detektor upotrijebljen je i u ovom istraživanju. Optimizirani kromatografski uvjeti omogućili su zadovoljavajuću simetriju pikova (simetrija pikova svih fitoestrogena iznosila je oko 1,1). Nadalje, faktor razlučivanja bio je veći od 2,2, za sve analite, osim za kritični par, apigenin i matairesinol (slika 3A). S obzirom na to da nije postignuto njihovo potpuno razdvajanje, primijenjen je selektivni detektor maseni spektrometar.

LC/MS/MS analiza fitoestrogena najčešće se provodi primjenom sljedećih ionizatora: kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku i ionizacije elektroraspršenjem. Rybak i suradnici (Rybak 2008) ispitali su prednosti i nedostatke tih dvaju načina ionizacije te su uočili da je primjenom ionizacije elektroraspršenjem postignuta osjetljivija metoda za određivanje fitoestrogena. Zato se u ovom istraživanju kao detektor koristio maseni spektrometar s ionizacijom elektroraspršenjem. Budući da je protok pokretne faze bio 1,0 mL/min, koristio se razdjelnik (1 : 2) koji je u maseni spektrometar dovodio jednu trećinu pokretne faze. Tijekom optimizacije metode maseni spektri analita snimani su u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije. Pozitivnim načinom ionizacije postignuta je bolja osjetljivost metode te se taj je ovaj način korišten u daljnjim analizama. Selektivna detekcija masenim spektrometrom omogućilo je pouzdanu kvantifikaciju svih analita u samo jednom kromatografskom snimanju. Slika 3B prikazuje kromatogram ukupnih iona svih 11 ispitivanih fitoestrogena LC/MS metodom.





Slika 3. DAD kromatogram (A) i kromatogram ukupnih iona (B) smjese standarda (10  $\mu\text{g/mL}$ )

Legenda: 1 – daidzein, 2 – genistein, 3 – sekoizolaricirezinol, 4 – apigenin, 5 – matairezol, 6 – formononetin, 7 – izoksantohumul, 8 – kasticin, 9 – biokanin A, 10 – 8 – prenilnaringenin, 11 – ksantohumul

Pseudomolekulski ioni  $[M+H]^+$  bili su najzastupljeniji u spektrima svih analita, uz iznimku kod sekoizolaricirezinola, gdje je fragment  $[M+H-H_2O]^+$  nastao gubitkom molekule vode bio najzastupljeniji ion. Dobiveni osnovni pikovi odabrani su za fragmentaciju.

Izoflavonoidi, daidzein i genistein imaju hidroksilne skupine na A i B prstenima, što omogućuje stvaranje karakterističnih  $[M+H-H_2O]^+$  fragmenata iona na  $m/z$  237 i 253, za

daidzein, odnosno genistein (slika 4A). Pseudomolekulski ioni obaju izoflavonoida mogu također izgubiti CO grupu s C-prstena što rezultira nastajanjem fragmentnih iona  $m/z$  227 za daidzein te  $m/z$  225 za genistein. Fragmenti na  $m/z$  199 za daidzein i  $m/z$  215 za genistein, koji odgovaraju gubitku još jedne CO grupe, također su uočeni u MS spektrima tih izoflavonoida. Gubitak još jedne molekule H<sub>2</sub>O doveo je do nastanka  $[M+H-2CO-H_2O]^+$  fragmenta na  $m/z$  181 za daidzein, odnosno  $m/z$  197 za genistein. Kao što je navedeno u poglavlju 3.2.1., jedan od osnovnih putova fragmentacije aglikona flavonoida je retro Diels-Alder reakcijom (Demarque, 2016.). RDA ioni na  $m/z$  137 za daidzein i  $m/z$  153 za genistein također su prisutni u MS<sup>2</sup> spektrima tih izoflavonoida (slika 4A).

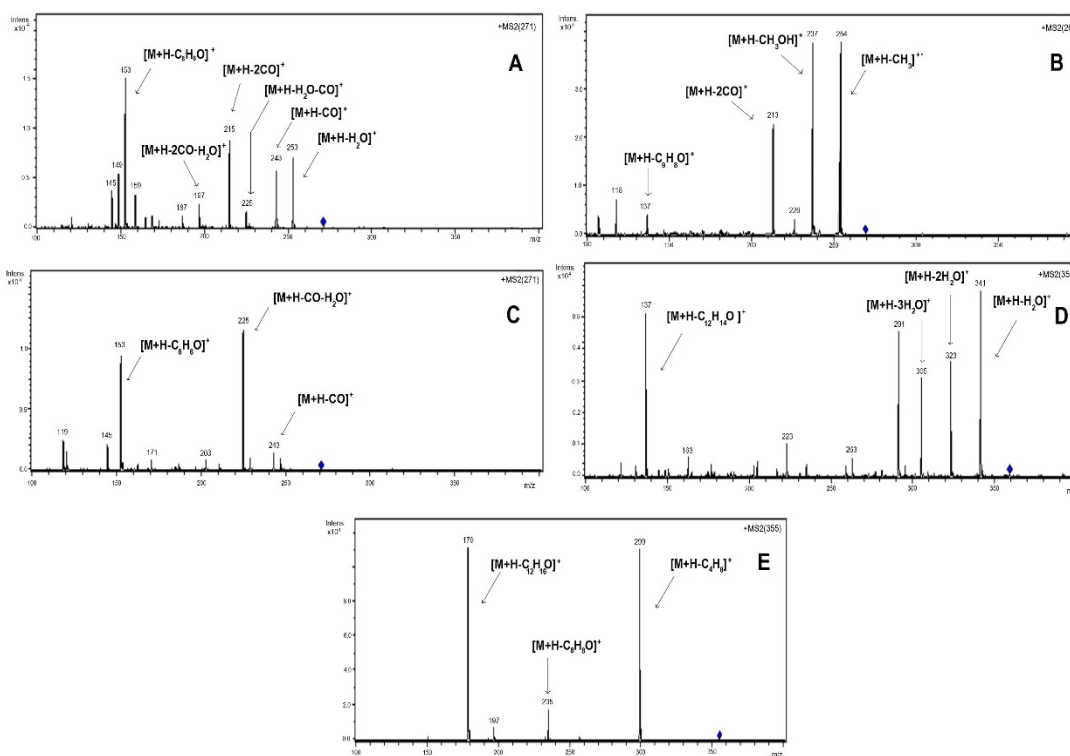
Analiza MS<sup>n</sup> spektra *O*-metiliranih izoflavona, formononetina i biokanina A, pokazala je da je ion na  $m/z$  254 najzastupljeniji fragmentni ion u MS<sup>2</sup> spektru formononetina (slika 4B) te  $m/z$  270 u MS<sup>2</sup> spektru biokanina A. Ti se ioni prepisuju radikal ionu  $[M+H-CH_3]^+$ . Uzevši u obzir i istaknute fragmentne ione na  $m/z$  237 (formononetin) te  $m/z$  253 (biokanin A), nastale zbog gubitka CH<sub>3</sub>OH skupine, moguće je pretpostaviti da je gubitak funkcionalnih skupina s prstena B dominantan način fragmentacije *O*-metiliranih izoflavona. Fragmentni ioni na  $m/z$  213 za formononetin i  $m/z$  229 za biokanin A nastali su gubitkom dviju CO skupina. Taj fragmentni put uočen je kod svih izoflavonoida. RDA fragmentacija *O*-metiliranih izoflavona također je uočena kao i kod izoflavona genisteina i daidzeina, ali je zastupljenost tih fragmentnih iona na  $m/z$  137 (formononetin) te  $m/z$  153 (biokanin A) bila manja od 2,9 %.

Uspoređujući fragmentaciju flavona apigenina s odgovarajućim izoflavonom genisteinom, zamijećen je nastanak manjeg broja različitih fragmentnih iona u MS<sup>2</sup> spektru (slika 4C). Osnovni pik čini fragmentni ion nastao gubitkom vode i CO skupine. RDA dijagnostički ion na  $m/z$  153 također je prisutan u MS<sup>2</sup> spektru apigenina, a fragmentni ion na  $m/z$  243 (gubitak CO skupine) ima zastupljenost manju od 4 %. Moguće je pretpostaviti da su strukturne razlike flavona apigenina i izoflavona genisteina (položaj prstena B) razlog njihovih različitih putova fragmentacije. Slični putovi fragmentacije izoflavona i flavona opisani su u istraživanju Madeire i suradnika (Madeira 2010).

U MS<sup>2</sup> spektru metiliranog flavonoida kasticina uočeni su fragmentni ioni nastali gubitkom metilnih skupina ( $m/z$  360, 345, 315 i 300).

U MS<sup>2</sup> spektru lignana, sekoizolariciresinol i matairezinol, uočeni su fragmentni ioni nastali gubitkom molekula vode. Nadalje, fragmentni ion na  $m/z$  163 sekoizolariciresinola, nastao pucanjem središnje veze, identičan je fragmentnom ionu matairezinola (slika 4D).

MS-MS fragmentacija pseudomolekulskih iona svih ispitivanih analita s hidrofobnom prenilnom skupinom vezanom za osnovnu strukturu, ksantohumol, izoksantohumol i 8-prenilnaringenin, rezultirala je nastankom triju fragmentnih iona koji se mogu vidjeti u MS<sup>2</sup> spektru ksantohumola (Slika 4E). Istaknuti, stabilni ioni na *m/z* 299 (ksantohumol, izoksantohumol) i 285 (8-prenilnaringenin) nastali su nakon gubitka prenilne skupine [M+H-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup>. Moguće je pretpostaviti da fragmentni ioni na *m/z* 235 i 221 pripadaju prstenu A nastalom nakon RDA fragmentacije ksantohumola, izoksantohumola i 8-prenilnaringenina. Treći fragmentni ioni na *m/z* 179 (ksantohumol, izoksantohumol) i 165 (8-prenilnaringenin) nastali su nakon dodatnoga gubitka prenil supstituenta s fragmentih iona *m/z* 235 odnosno 221 (Prokundina 2012, Yilmazer 2001).



Slika 4. MS<sup>2</sup> spektr genisteina (A), formononetina (B), apigenina (C), matairezina (D), ksantohumol (E)

Dobiveni fragmentni putovi u skladu su s onima dobivenima DI-MS metodom (poglavlje 4.2.2.). Nakon optimizacije uvjeta na masenom spektrometru uzorci prehrambenih proizvoda, industrijskih sirovina i dodataka prehrani analizirani su MRM načinom. U tablici 1. prikazane su odabrane MRM tranzicije. Kako bi se postigla zadovoljavajuća osjetljivost metode, MRM prijenosi prilagođeni su vremenima zadržavanja analita.

### 5.3.2. Validacija lc/ms/ms metode

Validacija metode provedena je sukladno ICH (engl. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) smjernicama (ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology). Za validaciju metode odabrani su sljedeći parametri: selektivnost, linearnost, učinkovitost ekstrakcije, preciznost i točnost. Dodatno, određivale su se i granice dokazivanja, granice određivanja, kao i stabilnost analita u uzorcima i stabilnost otopina standarda.

#### **Linearnost, granica dokazivanja i granica određivanja**

Linearnost je svojstvo analitičkog postupka kojim se dobivaju rezultati izravno proporcionalni koncentraciji analita unutar radnog područja. Linearnost se ispitala u koncentraciji od 1,5 do 250 µg/mL za daidzein i genistein, od 5,0 do 250 µg/mL za apigenin, kasticin, matairezanol i sekoizolaricirezanol, od 0,5 do 250 µg/mL za izoksantohumol i 8-prenilnaringenin te od 0,5 do 500 µg/mL za biokanin A, formononetin i ksantohumol. Kalibracijske krivulje dobivene su kao ovisnost omjera površine analita o njegovoj koncentraciji. Jednadžbe pravca dobivene su linearnom regresijom te su prikazane u tablici 4. Metoda je linearna za sve analite u širokome koncentracijskom rasponu uz visoke koeficijente određivanja ( $R^2 \geq 0,97$ ).

Granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection*, LOD) analitičkog postupka je najniža koncentracija analita u uzorku koju je moguće dokazati, ali ne mora se nužno moći i odrediti. Granica određivanja (engl. *Limit of Quantification*, LOQ) najmanja je količina analita u uzorku koja se može odrediti s prihvatljivom točnošću i pouzdanošću. LOD i LOQ vrijednosti određene su iz omjera signala i šuma. Određivanje omjera signala i šuma provelo se usporedbom izmjerenih signala iz uzoraka s poznatim niskim koncentracijama analita s onima slijepe probe te određivanjem najmanje koncentracije pri kojoj se analit može pouzdano dokazati. Signal prema šumu u omjeru 3 : 1 uzet je prihvatljivim za procjenu granice dokazivanja, a 10 : 1 za procjenu granice određivanja. Dobivene vrijednosti također su prikazane u tablici 3. Dobivene granice u skladu su s prethodno dobivenim vrijednostima za fitoestrogene (Almeida 2015, Magiera 2015).

Tablica 3. Linearnost i osjetljivost LC/MS/MS metode

ANALIT	VRIJEME ZADRŽAVANJA (min ± SD*)	TRANZICIJA	RASPON LINEARNOSTI (µg/mL)	JEDNADŽBA	R <sup>2</sup>	LOD** (µg/mL)	LOQ*** (µg/mL)
daidzein	6,79 ± 0,01	255→227	1,5 – 250	y = 3068x + 41588	0,98	0,5	1,5
genistein	8,61 ± 0,01	271→243	1,5 – 250	y = 2545x + 41614	0,97	0,5	1,5
sekoizolaricirezinol	10,23 ± 0,01	345→327	5,0 – 250	y = 4285x + 5496	0,99	1,5	5,0
apigenin	14,85 ± 0,02	271→225	5,0 – 250	y = 806x + 1015	0,99	1,5	5,0
matairezinol	15,00 ± 0,03	359→341	5,0 – 250	y = 4355x + 4606	0,98	1,5	5,0
formononetin	19,61 ± 0,02	269→254	0,5 – 500	y = 18031x + 190805	0,99	0,2	0,5
izoksantohumol	20,55 ± 0,02	355→299	0,5 – 250	y = 100849x + 1590185	0,98	0,2	0,5
kasticin	23,38 ± 0,02	375→359	5,0 – 250	y = 321324x + 2598721	0,99	1,5	5,0
biokanin A	26,20 ± 0,02	285→270	0,5 – 500	y = 15410x + 58185	0,99	0,2	0,5
8-prenilnaringenin	26,71 ± 0,02	341→285	0,5 – 250	y = 51431x + 885530	0,97	0,2	0,5
ksantohumol	30,42 ± 0,29	355→299	0,5 – 500	y = 14661x + 369624	0,99	0,2	0,5

\* SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

\*\* LOD - granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection*)

\*\*\* LOQ - granica određivanja (engl. *Limit of Quantification*)

## **Preciznost i točnost**

Preciznost je validacijski parametar koji pokazuje podudarnost rezultata niza ponovljenih mjerenja istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima. Može biti iskazana kao ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) te obnovljivost (engl. *reproducibility*). Preciznost iskazana kao ponovljivost znači podudarnost rezultata analize provedenih pri istim uvjetima u kratkom vremenu i dobivenih istom metodom. Ponovljivost metode ispitana je primjenom smjese standardnih otopina svih analita, u koncentraciji od 100 µg/mL.

Ponovljivost metode ispitana je uz šest uzastopnih mjerenja unutar istog dana (*preciznost*) te tri uzastopna mjerenja unutar tri dana (*srednja preciznost*). Rezultati mjerenja iskazani su kao relativne standardne devijacije (engl. *Relative Standard Deviations*, RSD). Vrijednosti RSD bile su manje od 4,71 %, odnosno 4,98 %, što pokazuje da je metoda precizna. Dobivene vrijednosti za ponovljivost i srednju preciznost prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Preciznost i točnost LC/MS/MS metode

ANALIT	PONOVLJIVOST (RSD*, %, $n = 6$ )	SREDNJA PRECIZNOST (RSD, %, $n = 9$ )	TOČNOST (% , $n = 3$ )		
			NISKA	SREDNJA	VISOKA
daidzein	4,70	4,97	104,38	104,87	103,82
genistein	4,30	4,88	105,00	104,97	104,33
sekoizolaricirezinol	4,48	4,76	97,07	104,19	102,59
apigenin	2,70	3,70	104,93	95,01	103,08
matairezinol	4,12	4,48	96,01	103,59	102,70
formononetin	3,75	4,55	104,95	104,91	104,03
izoksantohumol	3,13	4,45	101,15	104,97	101,24
kasticin	1,26	4,78	99,69	104,81	96,10
biokanin A	4,39	4,82	104,80	102,80	101,75
8-prenilnaringenin	4,71	4,98	98,37	104,15	102,62
ksantohumol	3,93	4,54	101,96	103,24	101,66

\* RSD - relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviations*)

Točnost metode predstavlja stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Određena je analizom uzoraka poznate koncentracije. Mjerene su tri otopine djelatnih tvari, na trima koncentracijskim razinama: niska (5 µg/mL), srednja (100 µg/mL) i visoka (250 µg/mL). Rezultati su prikazani kao prinos, kao razlika između srednje izmjerene vrijednosti i prihvaćene stvarne vrijednosti, izraženo u postotku. Na osnovi dobivenih vrijednosti (98,37 - 105,00 %) moguće je zaključiti da je točnost predložene metode zadovoljavajuća. Rezultati su prikazani u tablici 4.

### **Stabilnost**

Stabilnost analita ispitana je upotrebom standardne otopine genisteina (0,1 µg/mL) te ekstrahiranih uzoraka dodataka prehrani. Ispitivala se stabilnost unutar radnog tjedna (ukupno pet dana) za standardnu otopinu genisteina, čuvanu u hladnjaku pri 4 °C. Također se ispitivala dugoročna stabilnost ekstrahiranih uzoraka nakon dva tjedna čuvanja u hladnjaku pri 4 °C. Stabilnost je izražena analitičkim prinosom, a izračunata kao omjer koncentracije analita određene analizom uzorka neposredno poslije pripreme i koncentracije analita određene nakon zadanog razdoblja skladištenja. Oba su se analita pokazala stabilna u ispitivanim vremenima, odnosno njihove koncentracije razlikovale su se manje od 1,5 %.

#### **5.3.3. Primjena novorazvijene metode za analizu hrane, biljnih industrijskih materijala i dodataka prehrani**

Razvijena i validirana LC/MS/MS metoda primijenjena je za analizu raznovrsnih uzoraka koji sadržavaju fitoestrogene: hrana (oznake H1 - H4), biljni industrijski materijal (oznake BIM1 - BIM5) i dodatci prehrani (oznake DP1 - DP20). Količine analita prikazane su u tablici 5. i tablici 6.



Tablica 5. Sadržaj fitoestrogena u ispitivanim uzorcima hrane i biljnoga industrijskog materijala dobiven LC/MS/MS metodom

OZNAKA UZORKA	BOTANIČKI IZVOR	KONCENTRACIJA ANALITA (mg/g ± RSD* (%), n = 3)										
		daidzein	genistein	formononetin	biokanin A	apigenin	kasticin	8- prenilnaringenin	izoksantohumol	ksantohumol	matairezinol	sekoizolaricirezinol
HRANA												
H1	soja	0,002 ± 5,0	0,036 ± 7,7	NO**	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
H2	soja	NP***	<LOQ****	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
H3	lan	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NP	NP
H4	lan	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NP	NP
BILJNI INDUSTRIJSKI MATERIJAL												
BIM1	soja	38,26 ± 0,8	2,44 ± 4,7	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
BIM2	konopljika	NO*	NO*	NO*	NO*	37,99 ± 3,9	0,078 ± 4,4	NO	NO	NO	NO	NO
BIM3	crvena djetelina	2,90 ± 6,6	2,12 ± 5,5	12,34 ± 3,5	30,63 ± 0,8	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
BIM4	hmelj	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NP	<LOQ	<LOQ	NO	NO
BIM5	lan	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	0,013 ± 1,2	0,539 ± 2,1

\*RSD - relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviations*)

\*\*NO – nije očekivan

\*\*\*NP – nije pronađen

\*\*\*\*LOQ - granica određivanja (engl. *Limit of Quantification*)

Kako se i očekivalo, u uzorcima hrane soje utvrđene su znatno niže koncentracije fitoestrogena u odnosu na prisutnost u dodatcima prehrani. Nadalje, samo je u jednom uzorku (H2) određena koncentracija genisteina. U pojedinim azijskim državama, gdje je soja u svakidašnjoj prehrani zastupljena više od 3000 godina, normalni unos može iznositi i do 100 g/dan. U zapadnim je državama uporaba soje porasla tek posljednjih desetljeća, zajedno s popularizacijom vegetarijanstva i osvješćivanjem stanovništva. Prethodna istraživanja na biljnom materijalu koji sadrži daidzein i genistein upućuju na varijabilnost u njihovom sadržaju između pojedinih vrsta te pod različitim uvjetima uzgoja (Nakamura 2000, He 2013). Tako su Neascu i suradnici (Neascu 2008) pronašli više koncentracije izoflavona u modificiranoj soji. Također, veliki utjecaj na udio izoflavona može imati obrađenost soje (He 2013, Rizzo 2018).

Rezultati provedenog istraživanja upućuju na niske količine daidzeina i genisteina (niže od 3,77 mg/dan) u prehranbenim proizvodima.

Lan je najbogatiji prehranbeni izvor lignana (Popova 2009). No, oba ispitivana uzorka (H3 i H4) nisu sadržavala mjerljive koncentracije lignana. Moguće je pretpostaviti da je razlog tomu prisutnost lignana u glikozidnom obliku (tablica 5.).

Kvaliteta dodatka prehrani ponajprije ovisi o kvaliteti biljnih industrijskih materijala koji se primjenjuju u njihovoj proizvodnji. Osiguranje kvalitete biljnih industrijskih materijala nije jednostavno s obzirom da na njihovu kvalitetu utječu brojni čimbenici poput fizioloških, genetskih i okolišnih čimbenika te uvjeta branja te skladištenja. Upravo zbog navedenog od izuzetno je velike važnosti redovita provjera prisustva aktivnih i toksičnih tvari. HPLC/MS<sup>n</sup> metoda opisana u ovom radu primijenjena je za analizu pet biljnih industrijskih materijala koji se primjenjuju u proizvodnji dodataka prehrani. Djelatne tvari navedene na deklaracijama proizvoda potvrđene su primijenjenom HPLC/MS<sup>n</sup> metodom. Biljni industrijski materijal, deklariran kao soja ekstrakt (BIM1) sadržavao je daidzein i genistein. Za razliku od uzoraka hrane, omjer koncentracija daidzeina i genisteina bio je 16 : 1. Osim daidzeina i genisteina u biljnom industrijskom materijalu, deklariranom kao ekstrakt crvene djeteline (BIM3) određeni su i izoflavoni formononetina i biokanina A. Biljni industrijski materijal deklariran kao konopljika (BIM2), sadržavao je flavonoide apigenin i kasticin, dok su lignani, sekoizolaricirezinol i matairezol, određeni u biljnom industrijskom materijalu deklariranom kao ekstrakt lana (BIM5). U biljnom industrijskom materijalu deklariranom kao ekstrakt hmelja (BIM4) indentificirani su izoksantohumola i ksantohumola, dok jedan od najdjelotvornijih fitoestrogena, 8-prenilnaringenin, nije pronađen u navedenom uzorku.

Ukupni sadržaj fitoestrogena u uzorcima iznosio je od 0,01 (BIM4) do 48 (BIM3) mg/g. Pokazalo se da su crvena djetelina, soja i konopljika najbolji izvori fitoestrogena (tablica 5.)

Naposljetku, metoda je primijenjena za određivanje 11 fitoestrogena u 20 različitih dodataka prehrani namijenjenih za uklanjanje simptoma menopauze (tablica 6.). Većina uzoraka sadržavala je samo jedan ispitivani biljni ekstrakt: soja (oznake od DP1 do DP4), konopljika (oznake od DP5 do DP9), crvena djetelina (oznake od DP10 do DP11), hmelj (oznake od DP12 do DP14) i lan (oznaka DP15). Dio uzoraka sadržavao je dva ekstrakta: soja i konopljika (oznake DP16 i DP17), soja i crvena djetelina (oznaka DP18), soja i lan (oznaka DP19) te crvena djetelina i hmelj (oznaka DP20). Dostupne informacije na deklaracijama proizvoda nisu bile ujednačene, odnosno nisu pružale jednake informacije. Detaljni opisi nalaze se u prilogu 7.3. Kod gotovo polovice proizvoda označene specifikacije naznačile su samo količinu biljnih ekstrakata upotrijebljenih u proizvodnji gotovih proizvoda dok uopće nisu sadržavale količine fitoestrogena. Deklaracije devet proizvoda sadržavale su ukupne količine fitoestrogena, dok su na deklaracijama svega dva proizvoda bile navedene količine pojedinačnih fitoestrogena.

U svrhu određivanja prosječne mase dozirnog oblika odvagano je deset tableta ili kapsule. Za sve uzorke utvrđena je ujednačena težina dozirnih obila osim za jedan uzorak (DP5) koji je značajno varirao u težini (razlika manja od 5 % je označena kao prihvatljiva). Osam uzoraka sadržavalo je soju, što je potvrđeno njihovom analizom budući da su u ovim uzorcima identificirani sojini izoflavoni, daidzein i genistein, a iznimka je uzorak DP19. Ukupni sadržaj sojinih izoflavona iznosio je između 0,4 i 3,9 mg/g. Slično analiziranom biljnome industrijskome materijalu soje, najzastupljeniji izoflavon bio je daidzein, no znatno manje količine nađene su u dodacima prehrani. Slične vrijednosti nađene su i u prijašnjim ispitivanjima (Delmonte 2006, Boniglia 2009, Uifălean 2015).

Tablica 6. Sadržaj fitoestrogena u ispitivanim uzorcima dodataka prehrani dobiven LC/MS/MS metodom

OZNAKA UZORKA	BOTANIČKI IZVOR	KONCENTRACIJA ANALITA (mg/g ± RSD* (%), n = 3)											UKUPNA KOLIČINA FITOESTROGENA U DNEVNOJ DOZI (mg)	PRONAĐEN/DEKLARIRAN (%)
		daidzein	genistein	formonone tin	biochanin A	apigenin	kasticin	8-preniharin genin	izoksahtoh umol	ksantohum ol	matarežin ol	sekoizolari cirezolol		
DP1	soja	1,26 ± 6,5	0,668 ± 6,1	NO**	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	1,64	5,1
DP2	soja	2,04 ± 3,6	1,02 ± 3,8	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	1,4	2,0
DP3	soja	0,643 ± 2,9	0,093 ± 5,3	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	0,57	2,6
DP4	soja	2,31 ± 1,8	1,54 ± 2,4	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	2,77	11,6
DP5	konopljika	NO	NO	NO	NO	NP***	NP	NO	NO	NO	NO	NO		
DP6	konopljika	NO	NO	NO	NO	0,150 ± 4,6	<LOQ***	NO	NO	NO	NO	NO		
DP7	konopljika	NO	NO	NO	NO	NP	0,168 ± 2,1	NO	NO	NO	NO	NO		
DP8	konopljika	NO	NO	NO	NO	NP	0,003 ± 3,4	NO	NO	NO	NO	NO	0,01	ND
DP9	konopljika	NO	NO	NO	NO	NP	<LOQ	NO	NO	NO	NO	NO		
DP10	crvena djetelina	NP	<LOQ	6,79 ± 3,2	5,57 ± 5,8	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	1,76	4,4
DP11	crvena djetelina	<LOQ	<LOQ	0,299 ± 1,9	0,390 ± 0,5	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	0,28	ND
DP12	hmelj	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NP	NP	NP	NO	NO		
DP13	hmelj	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NP	<LOQ	<LOQ	NO	NO		
DP14	hmelj	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NP	<LOQ	<LOQ	NO	NO		
DP15	lan	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NP	2,10 ± 0,1	0,01	ND*****
DP16	soja, konopljika	<LOQ	<LOQ	NO	NO	0,222 ± 2,7	<LOQ	NO	NO	NO	NO	NO	0,14	ND
DP17	soja, konopljika	0,815 ± 0,3	0,559 ± 0,5	NO	NO	NP	<LOQ	NO	NO	NO	NO	NO	0,84	4,0
DP18	soja, crvena djetelina	0,345 ± 4,6	0,118 ± 7,5	1,26 ± 2,0	0,134 ± 2,2	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	1,60	4,6
DP19	soja, lan	NP	NP	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NP	0,037 ± 0,8	0,02	0,2
DP20	crvena djetelina, hmelj	NP	NP	4,82 ± 0,5	1,22 ± 0,6	NO	NO	0,032 ± 3,7	0,044 ± 5,0	0,636 ± 8,0	NO	NO	6,61	63,4

\*RSD - relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviations*)

\*\*NO - nije očekivan

\*\*\*NP - nije pronađen

\*\*\*\*granica određivanja (engl. *Limit of Quantification, LOQ*)

\*\*\*\*\*ND - nije deklariran

Svi proizvodi sa konopljikom sadržavali su barem jednu od ispitivanih djelatnih tvari, apigenin i kasticin (osim DP5). Međutim, njihove koncentracije su znatno varirale između ispitivanih uzoraka, vjerojatno zbog različitih izvora biljnih industrijskih materijala te proizvodnih postupaka. Pregledom literature pronađen je mali broj ispitivanja koja su obuhvaćala određivanje djelatnih tvari u dodatcima prehrani koji su sadržavali konopljiku. No, slične koncentracije kasticina (DP7 i DP8) pronađene su u ispitivanju Mari i suradnika (Mari 2012), nakon analize pet proizvoda s konopljikom.

U proizvodima koji su sadržavali crvenu djetelinu (DP10, DP11 i DP20), najveće koncentracije nađene su za izoflavone biokanin A i formononetin, dok su nađene niže koncentracije daidzeina i genisteina. U skladu s očekivanim, dodatak prehrani sa sojom i crvenom djetelinom (DP18), sadržavao je i znatne koncentracije daidzeina i genisteina. Važno je istaknuti da je ukupna koncentracija izoflavona u navedenim uzorcima bila između 0,6 i 12,4 mg/g. Međutim, i prethodna ispitivanja sadržaja proizvoda s crvenom djetelinom pokazala su znatna odstupanja u sadržaju djelatnih tvari (Almeida 2015, Andres 2015, Delmonte 2006).

8-prenilnaringenin jedan od najdjelotvornijih fitoestrogena pronađen je samo u uzorku DP20. Uz to, u istom su uzorku određen je i sadržaj drugih fitoestrogena hmelja, ksantohumola te izoksanthumola. Koncentracija ksantohumola bila je znatno veća (više od dvadeset puta) u odnosu na 8-prenilnaringenin i izoksanthumol, što upućuje da je ksantohumol najzastupljeniji fitoestrogen hmelja u ovom uzorku. Niže koncentracije u ostalim proizvodima koji sadrže hmelj (DP13, DP14), a nijedan od triju navedenih prenilflavonoida nije pronađen u uzorku DP12. Dobiveni rezultati sukladni su onima dobivenim u prethodnim ispitivanjima (Clarke 2008). Prema našim saznanjima, to je prvi put da je dokazano postojanje 8-prenilnaringenina u dodatku prehrani namijenjenom za otklanjanje simptoma menopauze.

Mnoga su ispitivanja pokazala da je lan važan izvor lignana, difenolnih tvari koje imaju slabo estrogensko djelovanje u žena u postmenopauzi (Thompson 2007). Za razliku od rezultata dobivenih analizom biljnoga industrijskog materijala lana (ukupna količina lignana bila je 0,55 mg/g), niske koncentracije sekoizolaricirezinola pronađene su u dodatcima prehrani (DP15 i DP19). Uz to, matairezinol nije nađen ni u jednom od uzoraka.

S obzirom na navedene rezultate, najbolji izvor fitoestrogena, odnosno u kojem je njihova koncentracija najveća, jest uzorak DP10 koji sadrži 12,3 mg izoflavona crvene djeteline po gramu proizvoda. Najviša koncentracija fitoestrogena, po pojedinačnoj dozi, određena je u dodatku prehrani koji sadrži crvenu djetelinu i hmelj, DP20 (6,61 mg/tableti), te

u dodatku prehrani koji sadrži soju, DP4 (2,77 mg/kapsuli). Prema uputama proizvođača, preporučeni unos bio je od jedne do šest tableta/kapsula na dan. Prema dobivenim rezultatima moguće je uočiti kako pacijent ukoliko slijedi upute proizvođača najveću količinu fitoestrogena unese uzorkom DP20. Usporedbom dobivenih vrijednosti i onih navedenih na deklaracijama proizvoda uočeno je da su izmjerene vrijednosti niže od onih navedenih na deklaracijama (manje od 63 % u odnosu prema navedenim vrijednostima). Međutim, uočljive razlike između dobivenih i navedenih vrijednosti zamijećene su i u prethodnim ispitivanjima (Boniglia 2009, Almeida 2015, Uifălean 2015). Te bi se razlike donekle mogle objasniti nejasnim označavanjem sadržaja na deklaracijama. Većina proizvoda nije imala navedene omjere aglikonskih i glikozidnih oblika fitoestrogena.

Odstupanja u sadržaju aktivnih tvari među različitim proizvodnim serijama pruža informaciju o ujednačenosti proizvodnje pojedinog proizvoda. Prirodne razlike u biljnim industrijskim materijalima, višestruki procesi proizvodnje koji utječu na njihov sastav te interakcije između više sastavnica mogu prouzročiti velike razlike između pojedinih serija proizvoda (Mornar 2013, Mornar 2016). Zbog toga su svi ispitivani uzorci analizirani u dvjema serijama. Relativne standardne devijacije između ispitivanih serija su bile između 1,4 i 24,3 %. Najveća razlika između ispitivanih serija zabilježena je u proizvodima koji su sadržavali konopljiku (RSD od 9,8 do 24,3 %).

Konačno, uspoređeni su rezultati istraživanja dobivenim DI-MS i LC/MS/MS tehnikama. Zasiurno naprednom LC/MS/MS tehnikom postignuta je bolja selektivnost i osjetljivost analičkog postupka. Premda je istraživačka grupa tijekom preliminarnih istraživanja pokušavala razviti kvantitativnu metodu za analizu fitoestrogena primjenom DI-MS tehnike od navedenog se odustalo zbog slabe ponovljivosti inteziteta signala „qualifier“ iona. Konačno usporedbom dobivenih podataka moguće je zaključiti da DI-MS metoda u odnosu na LC/MS/MS metodu ima ograničenja poput slabije selektivnosti (primjer ksantohumol i izoksantohumol), osjetljivosti (nije prikladna za analite prisutne u koncentracijama manjim od 100 mg/kg) te ponovljivosti (usporedbom inteziteta signala za pojedine analite dobivene ponovljenim mjerenjem kroz tri dana pokazala je RSD vrijednosti veće od 5 %). S druge strane, metoda je iznimno brza, ekološki i ekonomski prihvatljiva te prikladna za brzu identifikaciju fitoestrogena koncentracija preko 100 mg/kg u raznovrsnim uzorcima. LC/MS/MS metoda primjenjiva je za potrebe pouzdanog određivanja niskih koncentracija fitoestrogena u raznovrsnim uzorcima.

#### **5.4. Sadržaj ukupnih polifenola određen folin ciocalteu metodom**

Biljni polifenoli su aromatske hidroksilirane djelatne tvari koje često nalazimo u svakidašnjoj prehrani (voće, povrće), a spadaju i među terapijski najčešće upotrebljavane bioaktivne tvari. Stvaraju ih biljne vrste, kao posljedicu prilagodbe na oksidacijske procese.

Do danas su provedena mnoga istraživanja u kojima je ispitan njihov antioksidacijski, antitumorski, antivirusni i antibiotski učinak. Posljednjih se desetljeća ističe potreba za prehranom bogatom biljnim polifenolima u svrhu dugotrajnijeg održavanja zdravlja te smanjenja nastanka kroničnih i degenerativnih bolesti (Apak 2007).

Sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima određuje se analitičkom metodom koja se zasniva na reakciji fenolnih spojeva s kolorimetrijskim reagensom (Folin-Ciocalteu reagens) koji omogućuje mjerenja u vidljivom području spektra.

U ovom je doktorskom radu primijenjena Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih polifenola u prehrambenim proizvodima, biljnim industrijskim materijalima te dodatcima prehrani koji sadržavaju soju, crvenu djetelinu, hmelj, lan i konopljiku. Primjenjem je isti postupak ekstrakcije uzoraka kako je opisano u poglavlju 4.1. koji se pokazao prikladnim i za ova istraživanja.

Zato je u ovome radu modificirana, validirana i primijenjena Folin-Ciocalteu metoda kojom se odredila količina ukupnih polifenola u navedenim uzorcima.

##### **5.4.1. Modifikacija folin ciocalteu metode**

Tijekom modifikacije literaturno dostupne metode mijenjani su pojedini njeni parametri kako bi se postigli prikladni uvjeti analize za ciljanu svrhu. Korišteni su različiti omjeri galne kiseline odnosno uzorka i FC reagensa (1:1, 1:3, 1:5, 3:1, 5:1), vremena reakcije (10, 30 i 60 minuta), valne duljine apsorpcije (725, 740 te 760 nm) (Malenčić 2007, Mujić 2011, Orhan 2011). Za analizu uzoraka odabrani su sljedeći uvjeti: omjer galne kiseline, odnosno uzorka i FC reagensa - 1 : 5, duljina trajanja reakcije - 10 minuta te valna duljina - 740 nm. Sve reakcije i mjerenja provedeni su na sobnoj temperaturi, zaštićeni od izravne izloženosti svjetlu. Za slijepu probu koristila se ultračista voda.

#### 5.4.2. Validacija folin ciocalteu metode

Prema ICH smjernicama za validaciju metode odabrani su sljedeći parametri: linearnost, LOD, LOQ, preciznost i točnost.

##### **Linearnost**

Linearnost metode ispitana je mjerenjem šest različitih koncentracijskih razina galne kiseline (0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 7,5 µg/mL i 10 µg/mL). Linearnost metode određena je mjerenjem odaziva detektora za poznate koncentracije. Primjenom linearne regresije dobivena je jednačba pravca  $y = 0,1008 x + 0,0452$  uz koeficijent određivanja  $R^2 = 0,9975$ . S obzirom na njegovu visokou vrijednost moguće je utvrditi da je metoda linearna u zadanom području.

##### **Granica dokazivanja i granica određivanja**

U skladu s ICH smjernicama, granica dokazivanja i granica određivanja određene su iz jednačbi kalibracijskih pravaca, prema izrazu  $LOD = 3 \sigma/b$  odnosno  $LOQ = 10 \sigma/b$ , gdje je  $\sigma$  = standardna devijacija odsječka na osi y, a  $b$  = nagib pravca kalibracijske krivulje.

Standardna devijacija odsječka na osi y dobivena je primjenom programa OriginPro 7.5 SRO. Za izračun se koristila slijepa proba (destilirana voda). Broj mjerenja je iznosio 6 ( $n = 6$ ). Izračunane vrijednosti su  $LOD = 0,005 \mu\text{g/mL}$  te  $LOQ = 0,02 \mu\text{g/mL}$  što predstavlja granicu dokazivanja odnosno granicu određivanja ove metode.

##### **Preciznost**

Ponovljivost metode ispitana je uz šest uzastopnih mjerenja unutar istog dana (preciznost) te tri uzastopnih mjerenja unutar tri dana (srednja preciznost) primjenom otopine galne kiseline (5 µg/mL). Rezultati su iskazani kao RSD vrijednosti. Za ponovljivost dobivena RSD vrijednost bila je 1,9 %, dok je za srednju preciznost bila 2,3 %.

Srednja preciznost određena je i pripremom uzorka od drugog analitičara, u istom laboratoriju, s istim reagensima i mjerenjem na istim instrumentima te su dobivene RSD vrijednosti 2,6 %. Dobivene RSD vrijednosti manje od 5,0 % upućuju na zaključak da je metoda zadovoljavajuće precizna.



## Stabilnost

Stabilnost standardne otopine galne kiseline (5 µg/mL) ispitana je na sljedeći način:

1. pri sobnoj temperaturi tijekom 8 sati i
2. u hladnjaku, na temperaturi od 4 °C , tijekom 48 sati.

Dobivene vrijednosti prikazane su kao iskorištenje te s obzirom na visoke vrijednosti iskorištenja (97,8 % pri sobnoj temperaturi i 104,0 % u hladnjaku) moguće je utvrditi da je standardna otopina galne kiseline stabilna.

## Točnost

Točnost metode određena je mjerenjem triju različitih koncentracija (niska 2,5 µg/mL, srednja 5 µg/mL, visoka 7,5 µg/mL) galne kiseline u tri ponavljanja za svaku koncentraciju. Prinosi su iznosili: za nisku koncentraciju 105,7 %, za srednju koncentraciju 105,9 % te za visoku koncentraciju 104,3 %.

### 5.4.3. Primjena folin-ciocalteu metode za određivanje ukupnih polifenola u uzorcima hrane, biljnoga industrijskog materijala i dodataka prehrani

Nakon što je Folin-Ciocalteu metoda validirana, primijenjena je za analizu prehrambenih proizvoda, biljnog industrijskog materijala i dodataka prehrani.

Udio ukupnih polifenola u ispitivanim prehrambenim proizvodima bio je u rasponu od 1,72 do 5,88 mg/g ekstrakta, te su dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 7.

Određene su koncentracije ukupnih polifenola u prehrambenim proizvodima čija priprema za analizu uključivala je samo postupak mljevenja (uzorci označeni H1-H4). Kako bi se ispitaio utjecaj masne komponente prehrambenih proizvoda na određivanje ukupnih polifenola uzorci su analizirani nakon što su prošli postupak odmašćivanja (uzorci označeni H5-H8). U prehrambenim uzorcima soje ukupne vrijednosti polifenola bile su od 2,35 do 5,15 mg/g ekstrakta. Vidljivo je da je ukupna koncentracija polifenola bila veća u neodmašćenim uzorcima od omašćenih što je pokazalo da se tijekom postupka odmašćivanja gubi dio polifenolnih spojeva. Nešto niže vrijednosti ukupnih polifenola dane su i u radu Mujića i suradnika (Mujić 2011) gdje su vrijednosti ukupnih polifenola ispitivanih uzoraka bile između 0,08 i 2,2 mg/g ekstrakta za odmašćene uzorke. Vrijednosti ukupnih polifenola u uzorcima hrane lana bile su u rasponu od 1,72 do 5,88 mg/g ekstrakta. Iz tih je rezultata vidljivo da je veća koncentracija ukupnih polifenola određena u uzorcima koji su prošli proces odmašćivanja. Ovako suprotni rezultati mogu se objasniti činjenicom da uzorci

lana sadržavaju veće količine masne komponente te je udio polifenola na ukupnu masu uzorka manji. U istraživanju Anwar i suradnika (Anwar 2012) dobivene su sukladni podaci odnosno vrijednosti ukupnih polifenola u odmašćenim uzorcima lana bile su od 1,36 do 3,26 mg/g ekstrakta.

Tablica 7. Koncentracija ukupnih polifenola u ispitanim uzrocima prehrambenih proizvoda

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	POSTUPAK PRIPREME UZORKA	KONCENTRACIJA UKUPNIH POLIFENOLA (mg/g ekstrakta ± SD*, n = 3)
H1	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje	5,15 ± 0,08
H2	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje	4,22 ± 0,08
H3	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje	1,72 ± 0,07
H4	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje	2,78 ± 0,07
H5	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje/odmašćivanje	2,35 ± 0,01
H6	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje/odmašćivanje	4,14 ± 0,01
H7	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje/odmašćivanje	5,88 ± 0,01
H8	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje/odmašćivanje	3,09 ± 0,01

\*SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

Dobivene vrijednosti ukupnih polifenola u ispitivanim uzorcima biljnih industrijskih materijala, prikazane u tablici 8. Najniže koncentracije polifenola određene su u biljnome industrijskome materijalu hmelja (2,1 mg/g ekstrakta), a najveće u biljnome industrijskome materijalu lana (121 mg/g ekstrakta). Ukoliko se uspoređuju podaci za lan moguće je uočiti kako je više od dvadeset puta veća koncentracija polifenola određena u biljnom industrijskom materijalu u odnosu na prehrambene proizvode.

Tablica 8. Koncentracija ukupnih polifenola u ispitanim uzorcima biljnih industrijskih materijala

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	KONCENTRACIJA UKUPNIH POLIFENOLA (mg/g ekstrakta ± SD*, n = 3)
BIM1	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	2,30 ± 0,01
BIM2	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> L.	4,32 ± 0,01
BIM3	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> L.	9,27 ± 0,01
BIM4	hmelj - <i>Humulus lupulus</i> L.	2,10 ± 0,01
BIM5	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	121 ± 0,01

\*SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

Naposljetku, određena je i koncentracija ukupnih polifenola u dodatcima prehrani. Tablica 9. prikazuje rezultate za ispitivane uzorke dodataka prehrani koji sadržavaju jednu biljnu vrstu.

Tablica 9. Koncentracija ukupnih polifenola u ispitanim uzorcima dodataka prehrani koji sadržavaju jednu biljnu vrstu

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	KONCENTRACIJA UKUPNIH POLIFENOLA (mg/g ekstrakta $\pm$ SD*, $n = 3$ )	SADRŽAJ UKUPNIH POLIFENOLA U DOZIRNOM OBLIKU (mg)	SADRŽAJ UKUPNIH POLIFENOLA U PREPORUČENOJ DNEVNOJ DOZI (mg)
DP1	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	8,40 $\pm$ 0,01	4,56	9,12
DP2	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	26,1 $\pm$ 0,00	14,8	14,8
DP3	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	2,74 $\pm$ 0,01	2,05	2,05
DP5	konopljika - <i>Vitex agnus castus</i> L.	0,47 $\pm$ 0,00	0,17	1,02
DP8	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> L.	3,34 $\pm$ 0,00	3,34	10,0
DP10	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> L.	34,0 $\pm$ 0,01	5,58	5,58
DP11	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> L.	2,20 $\pm$ 0,00	0,89	5,34
DP15	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	2,22 $\pm$ 0,00	1,51	9,06

\*SD – standardna devijacija

Od tri uzorka koja sadržavaju soju (DP1, DP2 i DP3) najveće koncentracije ukupnih polifenola određene su u uzorku DP2 (26,1 mg/g ekstrakta), gotovo deset puta veću nego u uzorku DP3 (2,74 mg/g ekstrakta). I analizom uzoraka koji sadržavaju crvenu djetelinu (DP10 i DP11) dobivene su vrijednosti koje se razlikuju. Naime uzorak DP10 ima deset puta veću koncentraciju ukupnih polifenola od uzorka DP11. Niske koncentracije polifenola (DP5 0,47 mg/g ekstrakta i DP8 3,34 mg/g ekstrakta) određene su u dva uzorka koja sadržavaju konopljiku. U uzorku s lanom (DP15) određena koncentracija polifenola iznosila je 2,22 mg/g ekstrakta.

No, ako se uspoređuju vrijednosti iskazane kao količina ukupnih polifenola u preporučenoj dnevnoj dozi, vidljivo je da pacijent unosi preko 10 mg dnevno ukoliko koristi proizvode označene kao DP2 i DP8. Dnevni unos manji od 5 mg dobije se ukoliko uzima proizvode DP3 i DP5 prema preporukama proizvođača. Zanimljivo je i da pacijent uzimanjem uzorka DP10 kod kojeg je određena najveća koncentracija polifenola (34 mg/g ekstrakta) zapravo ima dnevni unos od svega 5,58 mg.

Dobivene koncentracije ukupnih polifenola u ispitanim uzorcima dodataka prehrani koji sadržavaju soju (2,74 – 26,1 mg/g ekstrakta), u usporedbi s onima određenim u biljnom industrijskom materijalu soje (2,3 mg/g ekstrakta), su veće u sva tri uzorka. Kod uzorka dodatka prehrani s crvenom djetelinom koncentracija ukupnih polifenola čak je tri puta viša od koncentracije izmjerene u uzorku biljnoga industrijskog materijala (DP10 34 mg/g ekstrakta, a BIM 9,27 mg/g ekstrakta). Dobiveni rezultati sukladni su prethodno provedenim istraživanjima (Georgetti 2007) gdje je ukupna količina polifenola u ispitivanom dodatku prehrani bila 75,0 mg/g ekstrakta, a u biljnom materijalu 45,0 mg/g ekstrakta. U dodacima prehrani koji sadržavaju konopljiku određene su koncentracije ukupnih polifenola (0,47 i 3,34 mg/g ekstrakta) su niže od onih dobivenih analizom biljnog industrijskog materijala konopljike (4,32 mg/g ekstrakta). Najveća razlika u koncentraciji polifenola između biljnog industrijskog materijala i gotovih proizvoda uočena je za uzorke koji sadržavaju lan (uzorak DP15 2,22 mg/g ekstrakta a BIM 121 mg/g ekstrakta).

U tablici 10. prikazani su rezultati određivanja koncentracije ukupnih polifenola u uzorcima dodataka prehrani koji sadržavaju dvije ili više biljnih vrsta. Visoka koncentracija polifenola određena je u uzorku DP9 (31,2 mg/g ekstrakta), a koji sadržava veliki broj različitih biljnih vrsta (detaljan opis nalazi se u prilogu 7.3.). Također je moguće zamijetiti da uzorci koji sadržavaju i hmelj (DP12, DP13 i DP14) imaju niže koncentracije ukupnih polifenola u usporedbi s drugim biljnim vrstama (1,12, 4,64 i 1,27 mg/g ekstrakta).

Ako se uspoređuju koncentracije ukupnih polifenola u dnevnoj dozi ponovno se ističe uzorak DP9 (115,6 mg/dnevna doza), s najviše polifenola u dnevnoj dozi, više od dvostruko od uzorka DP16 (54,0 mg/dnevna doza), odnosno gotovo 1000 puta od uzorka DP14 (0,15 mg/dnevna doza).

Tablica 10. Koncentracija ukupnih polifenola u ispitanim uzorcima dodataka prehrani koji sadržavaju više biljnih vrsta i/ili vitamine i minerale

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	KONCENTRACIJA UKUPNIH POLIFENOLA (mg/g ekstrakta $\pm$ SD*, n = 3)	SADRŽAJ UKUPNIH POLIFENOLA/ DOZA	SADRŽAJ UKUPNIH POLIFENOLA/PREPORU ČENA DNEVNA DOZA
DP4	soja ( <i>Glycine max</i> ), divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica Sinensis</i> )	9,40 $\pm$ 0,00	6,55	6,55
DP6	rusomača ( <i>Capsella bursa-pastoris</i> ), crvena hudika ( <i>Viburnum opulus</i> ), divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ), konopljika ( <i>Vitex agnus-castus</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> ), blaženi čkalj ( <i>Cnicus benedictus</i> ), Passiflora ( <i>Passiflora incarnata</i> ), kamilica ( <i>Matricaria recutita</i> ), maslačak ( <i>Taraxacum officinale</i> ), komorač ( <i>Foeniculum vulgare</i> ), alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )	7,45 $\pm$ 0,01	4,33	8,66
DP7	vrkuta ( <i>Alchemilla vulgaris</i> ), konopljika ( <i>Vitex agnus castus</i> )	16,0 $\pm$ 0,01	31,9	31,9
DP9	konopljika ( <i>Vitex Angus Castus</i> ), eleuthero ( <i>Elutherococcus Senticosus</i> ), damiana ( <i>Tumera Diffusa</i> ), ružmarin ( <i>Rosmarinum Officinale</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica Sinensis</i> ), zeleni čaj ( <i>Camellia Sinensis</i> ), brusnica ( <i>Vaccinium Marcrocarpon</i> ), silica ( <i>Bambusa Vulgaris</i> )	31,2 $\pm$ 0,01	57,8	115
DP12	odoljen ( <i>Valeriana officinalis</i> ), pasiflora ( <i>Passiflora incarnata</i> ), hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> )	1,12 $\pm$ 0,01	0,63	3,78
DP13	odoljen ( <i>Valeriana officinalis</i> ), hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> ), citronela ( <i>Cymbopogon winterianus</i> )	4,64 $\pm$ 0,01	1,84	5,52
DP14	odoljen ( <i>Valeriana officinalis</i> ), hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> )	1,27 $\pm$ 0,00	0,15	0,15
DP16	konopljika ( <i>Vitex agnus castus</i> ), divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ), soja ( <i>Glycine max</i> ), sikavica ( <i>Sylbum marianum</i> ), ( <i>Cimicifuga racemosa</i> ) srčenica ( <i>Leonorus cardiaca</i> ), astragalus ( <i>Astragalus membranaceus</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> )	29,1 $\pm$ 0,01	18,0	54,0
DP17	soja ( <i>Glycine max</i> ), ( <i>Cimicifuga racemosa</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> ), sladić ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> ), konopljika ( <i>Vitex agnus castus</i> )	4,26 $\pm$ 0,00	2,60	2,60
DP18	divlji jam ( <i>Dioscorea villosa</i> ), soja ( <i>Soya hispida</i> ), crvena djetelina ( <i>Trifolium pratense</i> ), glog ( <i>Crataegus oxycanta</i> )	24,2 $\pm$ 0,00	6,87	13,7
DP19	kudzu ekstrakt ( <i>Pueraria lobata</i> ), lan ( <i>Linum usitatissimum</i> ), caygua ( <i>Cyclanthera pedata</i> ), lan ( <i>Linum usitatissimum</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> ), srčenica ( <i>Leonurus cardiaca</i> ), crnoglavac ( <i>Ballota nigra</i> ), soja ( <i>Glycine max</i> ), preslica ( <i>Equisetum arvense</i> )	16,8 $\pm$ 0,01	7,10	21,3
DP20	hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> ), crvena djetelina ( <i>Trifolium pratense</i> ), kadulja ( <i>Salvia officinalis</i> )	4,92 $\pm$ 0,00	4,92	4,92

\*SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

Rezultati iz tablice 10. pokazuju relativno velik raspon koncentracija ukupnih polifenola ispitivanih uzoraka od 1,12 do 31,0 mg/g ekstrakta. Tri najveće koncentracije ukupnih polifenola određene su za uzorke DP9, DP16 i DP18 (31,02, 29,08 i 24,2 mg/g ekstrakta). Navedeni uzorci u svome sastavu imaju više različitih biljnih vrsta, čime bi se mogle objasniti više koncentracije u usporedbi s ostalim ispitivanim uzorcima. To se prije svega odnosi na uzorak DP9 s najvećim brojem biljnih vrsta u svome sastavu od svih ispitivanih uzoraka u ovome radu (detaljan opis nalazi se u prilogu 7.3.). Kod svih ispitivanih uzoraka koji u svom sastavu imaju jednu biljnu vrstu pokazalo se da imaju niže koncentracije ukupnih polifenola, osim uzorka DP2 koji sadržava soju čija je količina ukupnih polifenola bila 26,1 mg/ekstrakta.

RSD vrijednosti između dviju analiziranih serija uzoraka dodataka prehrani bila je do 54,8 % što je pokazalo velike razlike u proizvodnji između serija kod pojedinih proizvoda. Najveća RSD vrijednost 54,8 % bila je za uzorak DP14.

## 5.5. DPPH metoda za određivanje antioksidacijskog učinka

Metoda DPPH je brza, jednostavna i jeftina te se danas često koristi u određivanju sposobnosti „hvatanja” slobodnih radikala ili donora vodika u ispitivanju antioksidacijskog učinka. Metoda se uspješno primjenjuje u raznovrsnoj hrani (voće, povrće, žitarice, sokovi), ali i u raznovrsnim biljnim vrstama (Kedare 2011).

Zato je, da bi se odredio antioksidacijski učinak, u ovome radu modificirana, validirana i primijenjena DPPH metoda, kojom je određena  $IC_{50}$  vrijednost ispitivanih uzoraka pregrambenih proizvoda, biljnih industrijskih materijala te dodataka prehrani.

### 5.5.1. Modifikacija dpph metode

Tijekom modifikacije literaturno dostupne metode mijenjani su pojedini njeni parametri kako bi se postigli prikladni uvjeti analize za ciljanu svrhu. Korišteni su različiti omjeri askorbinske kiseline i etanolne otopine DPPH radikala (0,2 : 1,5, 1,5 : 1,5, 0,1 : 0,9, 0,75 : 1,5, 0,1 : 3, 0,2 : 4,5, 0,2 : 4,8, 0,6 : 4,9, 0,5 : 4,9), vremena trajanja reakcije (10, 20 i 30 minuta), valne duljine (515, 517, 520 nm) te su se uzorci tijekom reakcije izložili sunčevom svjetlu (Mujić 2011, Georgetti 2007, Orhan 2011). Nakon provedenog ispitivanja utvrđeni su sljedeći uvjeti kao najprikladniji: omjer askorbinske kiseline, odnosno uzorka i DPPH radikala 0,45 : 4,55 te duljina trajanja reakcije od 30 minuta, pri valnoj duljini od 515 nm. Sve reakcije i mjerenja provedeni su pri sobnoj temperaturi, zaštićeni od izravne izloženosti svjetlu. Za slijepu probu koristio se apsolutni etanol.

### 5.5.2. Validacija dpph metode

Prema ICH smjernicama za validaciju metode određivani su: linearnost, LOD, LOQ, preciznost i točnost.

#### **Linearnost**

Linearnost metode ispitana je mjerenjem pet različitih koncentracijskih razina askorbinske kiseline (10  $\mu\text{g/mL}$ , 7,5  $\mu\text{g/mL}$ , 5,0  $\mu\text{g/mL}$ , 2,0  $\mu\text{g/mL}$ , 0  $\mu\text{g/mL}$  (upotrebljen je apsolutni etanol)) uz dodatak otopine DPPH radikala do oznake u odmjerneju tikvici od 5 mL. Linearnost metode određena je mjerenjem odaziva detektora za poznate koncentracije. Primjenom linearne regresije dobivena je jednačba pravca  $y = -0,0922 x + 1,0722$  uz

koeficijent određivanja  $R^2 = 0,9802$ . S obzirom na njegovu visoku vrijednost moguće je utvrditi da je metoda linearna u zadanom području.

### **Granica dokazivanja i granica određivanja**

U skladu s ICH smjernicama, granica dokazivanja i granica određivanja određene su mjerenjima ( $n = 6$ ) reakcijske smjese koja sadržava slijepu probu. Izračunane vrijednosti su  $LOD = 0,04 \mu\text{g/mL}$  te  $LOQ = 0,11 \mu\text{g/mL}$  što predstavlja granicu dokazivanja i granicu određivanja ove metode.

### **Preciznost**

Ponovljivost metode ispitana je mjerenjem šest uzoraka koncentracije  $7,5 \mu\text{g/mL}$  u triplikatu unutar istog dana (preciznost) te mjerenjem tri uzoraka koncentracije  $7,5 \mu\text{g/mL}$  u triplikatu unutar tri dana (srednja preciznost) primjenom otopine askorbinske kiseline ( $7,5 \mu\text{g/mL}$ ). Rezultati su iskazani kao RSD vrijednosti. Za ponovljivost dobivena RSD vrijednost bila je  $0,43 \%$ , dok je za srednju preciznost bila  $0,30 \%$ .

Srednja preciznost određena je i pripremom uzorka od drugog analitičara, u istom laboratoriju, s istim reagensima i mjerenjem na istim instrumentima te su dobivene RSD vrijednosti  $0,21 \%$ . Dobivene RSD vrijednosti manje od  $5 \%$  upućuju na zaključak da je metoda zadovoljavajuće ponovljiva.

### **Stabilnost**

Stabilnost standardne otopine askorbinske kiseline ( $7,5 \mu\text{g/mL}$ ) ispitana je na sljedeći način:

1. pri sobnoj temperaturi tijekom 8 sati i
2. u hladnjaku, na temperaturi od  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , tijekom 48 sati.

Dobivene vrijednosti prikazane su kao iskorištenje te s obzirom na visoke vrijednosti iskorištenja ( $97,8 \%$  pri sobnoj temperaturi i  $104,0 \%$  u hladnjaku) moguće je utvrditi da je standardna otopina galne kiseline stabilna.

### **Točnost**

Točnost metode određivana je mjerenjem triju različitih koncentracija (visoka  $10 \mu\text{g/mL}$ , srednja  $7,5 \mu\text{g/mL}$ , niska  $2,0 \mu\text{g/mL}$ ) askorbinske kiseline u tri ponavljanja za svaku koncentraciju. Prinosi su iznosili: za visoku koncentraciju  $97,9 \%$ , za srednju koncentraciju  $102,5 \%$ , a za nisku koncentraciju  $97,2 \%$ . Dobiveni rezultati pokazuju zadovoljavajuću točnost.



### 5.5.3. Primjena dpph metode za analizu hrane, biljnih industrijskih materijala i dodataka prehrani

Nakon što je DPPH metoda optimizirana i validirana, primijenjena je na navedenim uzorcima prehranbenim proizvodima, biljnom industrijskom materijalu i dodacima prehrani.

Izračunane vrijednosti IC<sub>50</sub> u ispitivanim prehranbenim proizvodima bile su od 0,09 do 0,33 mg/g ekstrakta te su prikazane u tablici 11. Ispitivane su vrijednosti uzoraka hrane koja je bila samo mljevena (uzorci označeni H1-H4) te uzorci koji su nakon mljevenja podvrgnuti postupku uklanjanja masti (uzorci označeni H5-H8). Ako govorimo o prehranbenim proizvodima koji sadržavaju soju, IC<sub>50</sub> vrijednost iznosila je 0,18, odnosno 0,33 mg/g ekstrakta. Uzorci hrane analizirani nakon postupka uklanjanja masti imali su gotovo dvostruko veću IC<sub>50</sub> vrijednost, što pokazuje njihov slabiji antioksidacijski učinak te je sukladno s rezultatima ispitivanja koncentracije ukupnih polifenola uzorka soje. Ako govorimo o prehranbenim proizvodima koji sadržavaju lan, IC<sub>50</sub> vrijednost iznosila je 0,14, odnosno 0,16 mg/g ekstrakta za uzorke koji su samo podvrgnuti postupku mljevanja dok su IC<sub>50</sub> vrijednosti iznosile je 0,09, odnosno 0,32 mg/g ekstrakta za uzorke koji su podvrgnuti postupku mljevanja i odmašćivanja.

Tablica 11. IC<sub>50</sub> vrijednosti dobivene primjenom DPPH metode u ispitivanim prehranbenim proizvodima

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	POSTUPAK PRIPREME UZORKA	IC <sub>50</sub> (mg/g ekstrakta ± SD*, n = 3)
H1	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje	0,18 ± 0,01
H2	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje	0,18 ± 0,01
H3	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje	0,14 ± 0,01
H4	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje	0,16 ± 0,01
H5	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje/odmašćivanje	0,33 ± 0,00
H6	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje/odmašćivanje	0,33 ± 0,01
H7	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje/odmašćivanje	0,09 ± 0,02
H8	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje/odmašćivanje	0,32 ± 0,01

\* SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

Tablica 12. prikazuje vrijednosti IC<sub>50</sub> za ispitivane uzorke biljnih industrijskih materijala. Najniža vrijednost bila je za uzorak koji sadrži konopljiku (0,41 mg /g ekstrakta), a najviša za materijal koji sadrži hmelj (4,95 mg /g ekstrakta). Iz tih je rezultata vidljivo da, ako se uspoređuju s uzorcima prehranbenih proizvoda, biljni industrijski materijal soje i lana ima

manje mogućnosti vezanja DPPH radikala. Soja je imala najnižu vrijednost IC<sub>50</sub> 0,18 mg/g ekstrakta, a njezin biljni industrijski materijal 0,85 mg/g ekstrakta. Slično tome, lan je imao najnižu vrijednost IC<sub>50</sub> 0,09 mg/g ekstrakta a njegov biljni industrijski materijal 0,97 mg/g ekstrakta.

Tablica 12. IC<sub>50</sub> vrijednosti dobivene primjenom DPPH metode u ispitivanim uzorcima biljnoga industrijskog materijala

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	IC <sub>50</sub> (mg/g ekstrakta ± SD*, n = 3)
BIM1	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	0,85 ± 0,01
BIM2	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> L.	0,41 ± 0,00
BIM3	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> L.	0,85 ± 0,01
BIM4	hmelj - <i>Humulus lupulus</i> L.	4,95 ± 0,01
BIM5	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	0,97 ± 0,01

\*SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

Na kraju, određene su i IC<sub>50</sub> vrijednosti dodataka prehrani. Tablica 13. prikazuje rezultate za ispitivane dodatke prehrani koji sadržavaju jednu biljnu vrstu.

Vrijednosti IC<sub>50</sub> za uzorke koji sadržavaju samo soju (DP1, DP2 i DP3), niže su u usporedbi s uzorcima s drugim biljnim vrstama (0,13 mg/g ekstrakta je najniža vrijednost u uzorku DP3, a od ostalih uzoraka najnižu vrijednost ima DP5 od 0,26 mg/g ekstrakta). Ti su rezultati u skladu s ispitivanjima koncentracije ukupnih polifenola u ovome radu gdje je jedan od uzoraka koji sadržava soju (DP2) imao najveću količinu ukupnih polifenola od 26,1 mg/g ekstrakta. Nadalje, uzorak koji sadržava crvenu djetelinu, DP10, ima nižu vrijednost IC<sub>50</sub> (4,66 mg/g ekstrakta), u usporedbi s uzorkom DP11 (8,6 mg/g ekstrakta), koji također sadržava crvenu djetelinu. Uzorci koji sadržavaju konopljiku imaju niske vrijednosti IC<sub>50</sub> (DP5 0,26 mg/g ekstrakta i DP8 1,13 mg/g ekstrakta), kao i uzorak s lanom (DP15 0,29 mg/g ekstrakta) što pokazuje dobro vezanje DPPH radikala.

Dodatci prehrani koji sadržavaju soju imaju niže vrijednosti IC<sub>50</sub>, u odnosu prema njezinu biljnome industrijskome materijalu (0,13 odnosno 0,85 mg/g ekstrakta), a u uzorcima koji sadržavaju crvenu djetelinu je obrnuto, niži IC<sub>50</sub> ima njezin biljni industrijski materijal (0,85 odnosno 4,66 (DP10) mg/g ekstrakta). Kod konopljike uzorak DP5 ima nižu vrijednost, a uzorak DP8 znatno višu u odnosu prema biljnom materijalu (0,41 mg/g ekstrakta). Dodatak prehrani koji sadržava lan ima značajno nižu vrijednost (0,29 mg/g ekstrakta) u odnosu prema biljnom materijalu lana (0,97 mg/g ekstrakta).

Tablica 13. IC<sub>50</sub> vrijednosti dobivene primjenom DPPH metode u ispitivanim uzorcima dodataka prehrani koji sadržavaju jednu biljnu vrstu

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	IC <sub>50</sub> (mg/g ekstrakta ± SD*, n = 3)	IC <sub>50</sub> /DOZA	IC <sub>50</sub> /PREPORUČENA DNEVNA DOZA
DP1	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	0,37 ± 0,01	0,20	0,44
DP2	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	0,35 ± 0,01	0,20	0,20
DP3	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	0,13 ± 0,01	0,10	0,10
DP5	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> L.	0,26 ± 0,01	0,10	0,57
DP8	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> L.	1,13 ± 0,00	1,13	3,39
DP10	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> L.	4,66 ± 0,00	0,77	0,77
DP11	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> L.	8,60 ± 0,01	3,49	20,9
DP15	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	0,29 ± 0,01	0,19	1,18

\*SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

Tablica 14. prikazuje IC<sub>50</sub> vrijednosti dobivene primjenom DPPH testa za uzorke dodataka prehrani koji sadržavaju dvije ili više biljnih vrsta, odnosno njihove kombinacije s vitaminima i/ili mineralima. Dobiven je širok raspon IC<sub>50</sub> vrijednosti od 0,26 do 4,7 mg/g ekstrakta. Tri najniže vrijednosti zabilježene su za uzorke DP4, DP18 i DP6 (0,28, 0,72 i 0,74 mg/g ekstrakta) kada govorimo o uzorcima koji u svome sastavu imaju više različitih biljnih vrsta čime bi se mogle objasniti niže IC<sub>50</sub> vrijednosti (detaljan opis nalazi se u prilogu 7.3.).

Tablica 14. IC<sub>50</sub> vrijednosti dobivene primjenom DPPH metode u ispitivanim uzorcima dodataka prehrani koji sadržavaju više biljnih vrsta, i/ili vitamine i i/ili minerale

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	VITAMINI / MINERALI	IC <sub>50</sub> (mg/g ekstrakta ± SD*, n = 3)	IC <sub>50</sub> /DOZA	IC <sub>50</sub> /PREPORUČENA DNEVNA DOZA
DP4	Soja ( <i>Glycine max</i> ), divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ) ( <i>Cimicifuga Racemosa</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica Sinensis</i> ) Rusomača ( <i>Capsella bursa-pastoris</i> ), crvena hudika ( <i>Viburnum opulus</i> ), divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ), konopljika ( <i>Vitex agnus-castus</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> ), blaženi čkalj ( <i>Cnicus benedictus</i> ), Passiflora ( <i>Passiflora incarnata</i> ), kamilica ( <i>Matricaria recutita</i> ), maslačak ( <i>Taraxacum officinale</i> ), komorač ( <i>Foeniculum vulgare</i> ), alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) vrkuta ( <i>Alchemilla vulgaris</i> ), konopljika ( <i>Vitex agnus castus</i> )		0,28 ± 0,00	0,19	0,19
DP6	konopljika ( <i>Vitex Angus Castus</i> ), eleuthero ( <i>Elutherococcus Senticosus</i> ), damiana ( <i>Tumera Diffusa</i> ), ružmarin ( <i>Rosmarinum Officinalis</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica Sinensis</i> ), zeleni čaj ( <i>Camellia Sinensis</i> ), brusnica ( <i>Vaccinium Marcrocarpon</i> ), silica ( <i>Bambusa Vulgaris</i> )	vitamin B6, vitamin B12, folna kiselina	0,74 ± 0,01	0,43	0,86
DP7	odoljen ( <i>Valeriana officinalis</i> ), pasiflora ( <i>Passiflora incarnata</i> ), hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> )	vitamin A, vitamin C, vitamin D, vitamin E, tiamin, vitamin B2, vitamin B3, folna kiselina, vitamin B12, biotin, pantotenska kiselina, kalcij, željezo, jod, magnezij, cink, selen, bakar, mangan, krom, molibden, kalij, para-aminobenzojeva kiselina	0,84 ± 0,01	1,68	1,68
DP9	odoljen ( <i>Valeriana officinalis</i> ), hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> ), citronela ( <i>Cymbopogon winterianus</i> )		1,10 ± 0,01	2,06	4,11
DP12	odoljen ( <i>Valeriana officinalis</i> ), hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> )		0,76 ± 0,00	0,43	2,57
DP13	konopljika ( <i>Vitex agnus castus</i> ), divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ), soja ( <i>Glycine max</i> ), sikavica ( <i>Sylbum marianum</i> ), ( <i>Cimicifuga racemosa</i> ) srčeničica ( <i>Leonorus cardiaca</i> ), astragalus ( <i>Astragalus membranaceus</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> )		0,26 ± 0,00	0,10	0,31
DP14	soja ( <i>Glycine max</i> ), ( <i>Cimicifuga racemosa</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> ), sladić ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> ), konopljika ( <i>Vitex agnus castus</i> )	kalcij	4,70 ± 0,01	0,56	0,56
DP16	divlji jam ( <i>Dioscorea villosa</i> ), soja ( <i>Soya hispida</i> ), crvena djetelina ( <i>Trifolium pratense</i> ), glog ( <i>Crataegus oxycanta</i> )		1,14 ± 0,01	0,71	2,12
DP17	kudzu ekstrakt ( <i>Pueraria lobata</i> ), lan ( <i>Linum usitatissimum</i> ), caygua ( <i>Cyclanthera pedata</i> ), lan ( <i>Linum usitatissimum</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> ), srčeničica ( <i>Leonorus cardiaca</i> ), crnoglavac ( <i>Ballota nigra</i> ), soja ( <i>Glycine max</i> ), preslica ( <i>Equisetum arvense</i> )		0,98 ± 0,01	0,60	0,60
DP18	hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> ), crvena djetelina ( <i>Trifolium pratense</i> ), kadulja ( <i>Salvia officinalis</i> )	cink, vitamin B6	0,72 ± 0,01	0,21	0,42
DP19		vitamin D, kalcij, fosfor, magnezij	0,80 ± 0,01	0,34	1,01
DP20		vitamin B6, vitamin B9, vitamin B12	0,97 ± 0,01	0,97	0,97

\*SD – standardna devijacija (engl. Standard Deviation)

RSD vrijednosti između dviju analiziranih serija dodataka prehrani bile su manje od 28 % što je pokazalo velike razlike u proizvodnji između serija pojedinih proizvoda. Razlika u  $IC_{50}$  vrijednostima između dvije proizvodne linije nije utvrđena za uzorak DP17, a najveća RSD vrijednost od 28 % dobivena je za uzorak DP8.

No, važno je istaknuti da DPPH radikal reagira sa svim tvarima koje mogu donirati  $H^+$ , odnosno koje ga mogu reducirati. Ispitivanja koja su obuhvaćala primjenu DPPH testa pokazala su da njegova redukcija ovisi i o prisutnosti hidroksilnih skupina unutar struktura analiziranih uzoraka. Također, DPPH radikal je topljiv u organskim otapalima te je zbog toga ograničena njegova mjerljivost hidrofilnih analita pa je on model za lipofilne radikale (Indranupakorn 2010).

## 5.6. ABTS metoda za određivanje antioksidacijskog učinka

ABTS metoda je, poput DPPH metode, brza, jednostavna i jeftina te se danas također često koristi u određivanju sposobnosti „hvatanja” slobodnih radikala ili donora vodika u određivanju antioksidacijskog učinka.

Zato je, u svrhu određivanja antioksidacijskog učinka, u ovome radu modificirana, validirana i primijenjena ABTS metoda na svim navedenim uzorcima.

### 5.6.1. Modifikacija ABTS metode

Tijekom modifikacije literaturno dostupne metode mijenjani su pojedini njeni parametri kako bi se postigli prikladni uvjeti analize za ciljanu svrhu. Korišteni su različiti omjeri askorbinske kiseline i vodene otopine ABTS radikala (0,05 : 5,0, 0,1 : 4,9, 0,6 : 6,0, 0,2 : 4,9, 0,25 : 4,9, 0,225 : 5,0); vrijeme trajanja reakcije (6, 15 i 25 minuta) te valne duljine (734 i 670 nm) (Sargi 2015, Sochor 2010). Ispitan je utjecaj svjetla na provedbu analiza. Utvrđeni su sljedeći uvjeti kao najprikladniji: omjer askorbinske kiseline, odnosno uzorka i ABTS radikala 0,3 : 5,0, duljina trajanja reakcije od 6 minuta, na svjetlu, pri valnoj duljini od 734 nm. Sve reakcije i mjerenja provedeni su pri sobnoj temperaturi, zaštićeni od izravne izloženosti svjetlu. Za slijepu probu koristila se ultračista voda.

### 5.6.2. Validacija ABTS metode

Prema ICH smjernicama za validaciju metode određivani su: linearnost, LOD, LOQ, preciznost i točnost.

#### **Linearnost**

Linearnost metode ispitana je mjerenjem pet različitih koncentracijskih razina askorbinske kiseline (30,0 µg/mL, 22,5 µg/mL, 15,0 µg/mL, 7,5 µg/mL, 0 µg/mL (upotrebljena je ultračista voda)) uz dodatak otopine ABTS radikala do oznake u odmjerneju tikvici od 5 mL. Linearnost metode određena je mjerenjem odaziva detektora za poznate koncentracije. Primjenom linearne regresije dobivena je jednadžba pravca  $y = -0,0194 x + 0,6817$  uz koeficijent određivanja  $R^2 = 0,999$ . S obzirom na njegovu visoku vrijednost moguće je utvrditi da je metoda linearna u zadanom području.

#### **Granica dokazivanja i granica određivanja**

Granica dokazivanja i granica određivanja određene su mjerenjima ( $n = 6$ ) reakcijske smjese koja sadržava slijepu probu. Izračunane vrijednosti su  $LOD = 0,07 \mu\text{g/mL}$  te  $LOQ = 0,22 \mu\text{g/mL}$  što predstavlja granicu dokazivanja i granicu određivanja ove metode.

### **Preciznost**

Ponovljivost metode ispitana je mjerenjem šest uzoraka koncentracije  $15 \mu\text{g/mL}$  u triplicatu unutar istog dana (preciznost) te mjerenjem tri uzoraka koncentracije  $15 \mu\text{g/mL}$  u triplicatu unutar tri dana (srednja preciznost) primjenom otopine askorbinske kiseline ( $7,5 \mu\text{g/mL}$ ). Rezultati su iskazani kao RSD vrijednosti. Za ponovljivost dobivena RSD vrijednost bila je  $0,30 \%$ , dok je za srednju preciznost bila  $0,31 \%$ .

Srednja preciznost određena je i pripremom uzorka od drugog analitičara, u istom laboratoriju, s istim reagensima i mjerenjem na istim instrumentima te su dobivene RSD vrijednosti  $0,37 \%$ . Dobivene RSD vrijednosti manje od  $5 \%$  upućuju na zaključak da je metoda zadovoljavajuće ponovljiva.

### **Stabilnost**

Stabilnost standardne otopine askorbinske kiseline ( $15 \mu\text{g/mL}$ ) ispitana je na sljedeći način:

1. pri sobnoj temperaturi tijekom 8 sati i
2. u hladnjaku, na temperaturi od  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , tijekom 24 sata.

Dobivene vrijednosti prikazane su kao iskorištenje te s obzirom na visoke vrijednosti iskorištenja ( $104,1\%$  pri sobnoj temperaturi i  $107,1 \%$  u hladnjaku) moguće je utvrditi da je standardna otopina galne kiseline stabilna.

### **Točnost**

Točnost metode određivana je mjerenjem triju različitih koncentracija (visoka  $22,5 \mu\text{g/mL}$ , srednja  $15,0 \mu\text{g/mL}$ , niska  $7,5 \mu\text{g/mL}$ ) askorbinske kiseline u tri ponavljanja za svaku koncentraciju. Prinosi su iznosili: za visoku koncentraciju  $98,0 \%$ , za srednju koncentraciju  $101,7 \%$ , a za nisku koncentraciju  $98,9 \%$ . Dobiveni rezultati pokazuju visoku točnost.

### 5.6.3. Primjena ABTS metode za analizu hrane, biljnih industrijskih materijala i dodataka prehrani

Nakon što je ABTS metoda modificirana i validirana, primijenjena je na navedenim uzorcima hrane, biljnog industrijskog materijala i dodataka prehrani.

Izračunane vrijednosti  $IC_{50}$  u ispitivanim uzorcima prehrambenih proizvoda bile su od 0,75 do 1,63 mg/g ekstrakta te su prikazane u tablici 15. Ispitani su prehrambeni proizvodi koji su prije ekstrakcije samo usitnjeni postupkom mljevenja (uzorci H1-H4) te isti uzorci koji su bili dodatno i odmašćeni (uzorci H5-H8). Kod uzoraka soje,  $IC_{50}$  vrijednosti nisu se značajno razlikovale za uzorke koji su pripremljeni za analizu na isti način (0,78 i 0,77 mg/g ekstrakta za neodmašćene uzorke, odnosno 1,59 i 1,63 mg/g ekstrakta za odmašćene). Odmašćeni uzorci hrane imali su gotovo dvostruko veću  $IC_{50}$  vrijednost, što pokazuje njihov slabiji antioksidacijski učinak, što je u skladu s rezultatima dobivenim određivanjem ukupnih polifenola i DPPH iz ovoga rada, kako je opisano u poglavlju 4.4.3. gdje su ukupni polifenoli neodmašćenih uzoraka bili veći u odnosu na odmašćene (neodmašćeni uzorci: 5,15 i 4,22 mg/g ekstrakta, a odmašćeni: 2,35 i 4,14 mg/g ekstrakta) a njihove DPPH  $IC_{50}$  vrijednosti (poglavljje 4.5.3.) gotovo dvostruko niže (neodmašćeni uzorci: 0,18 mg/g ekstrakta, a odmašćeni: 0,33 mg/g ekstrakta). Dobiveni podaci pokazuju da se tijekom postupka odmašćivanja uklanja dio antioksidansa iz uzorka.

Tablica 15.  $IC_{50}$  vrijednosti dobivene primjenom ABTS metode u ispitivanim prehrambenim proizvodima

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	POSTUPAK PRIPREME UZORKA	$IC_{50}$ (mg/g ekstrakta $\pm$ SD*, $n = 3$ )
H1	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje	0,78 $\pm$ 0,01
H2	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje	0,77 $\pm$ 0,00
H3	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje	0,75 $\pm$ 0,00
H4	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje	0,76 $\pm$ 0,01
H5	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje/odmašćivanje	1,59 $\pm$ 0,01
H6	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje/odmašćivanje	1,63 $\pm$ 0,01
H7	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje/odmašćivanje	1,51 $\pm$ 0,01
H8	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje/odmašćivanje	1,52 $\pm$ 0,00

\* SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

Tablica 16. prikazuje vrijednosti  $IC_{50}$  za ispitivane uzorke biljnih industrijskih materijala. Najniža vrijednost bila je za materijal hmjelja (2,63 mg/g ekstrakta), a najviša za materijal lana (čak 149,51 mg/g ekstrakta). Iz tih je rezultata vidljivo da, ako se uspoređuju s



uzorcima hrane, biljni industrijski materijal soje i lana ima manju mogućnost vezanja ABTS radikala. Također se zamjećuje da navedeni ispitivani uzorci biljnoga industrijskog materijala znatno bolje vežu DPPH radikal u usporedbi s ABTS-om (razlika dobivenih IC<sub>50</sub> vrijednosti bila je u rasponu od 7,2 do 148,1 mg/g ekstrakta). Navedeno ne vrijedi za biljni industrijski materijal hmelja budući da su vrijednosti dobivene ABTS testom bile niže u odnosu na one dobivene DPPH testom. Utvrđene razlike se mogu objasniti činjenicom da su primjenjene različite metode kod kojih se za određivanje antoksidativne aktivnosti koriste različiti slobodni radikali te dolazi do drugačijih reakcija između slobodnih radikala i antioksidansa u uzorcima, što ovisi o strukturi fenolnih tvari (Singleton i Rossi, 1965).

Tablica 16. IC<sub>50</sub> vrijednosti dobivene primjenom ABTS metode u ispitivanim uzorcima biljnoga industrijskog materijala

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	IC <sub>50</sub> (mg/g ekstrakta ± SD*, n = 3)
BIM1	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	46,9 ± 0,01
BIM2	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> L.	8,31 ± 0,01
BIM3	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> L.	8,09 ± 0,01
BIM4	hmelj - <i>Humulus lupulus</i> L.	2,63 ± 0,00
BIM5	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	149,1 ± 0,01

\*SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

Na kraju primjenom ABTS testa dobivene su i IC<sub>50</sub> vrijednosti uzoraka dodataka prehrani. Tablica 17. prikazuje rezultate za ispitivane dodatke prehrani koji sadržavaju jednu biljnu vrstu.

Tablica 17. IC<sub>50</sub> vrijednosti dobivene primjenom ABTS metode u uzorcima dodataka prehrani koji sadržavaju jednu biljnu vrstu

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	IC <sub>50</sub> (mg/g ekstrakta ± SD*, n = 3)	IC <sub>50</sub> /DOZA	IC <sub>50</sub> /PREPORUČENA DNEVNA DOZA
DP1	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	0,29 ± 0,01	0,16	0,32
DP2	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	9,17 ± 0,01	5,20	5,20
DP3	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	0,08 ± 0,01	0,06	0,06
DP5	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> L.	0,72 ± 0,01	0,26	1,58
DP8	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> L.	25,6 ± 0,00	25,6	76,8
DP10	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> L.	18,29 ± 0,01	3,00	3,00
DP11	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> L.	2,52 ± 0,00	1,02	6,14
DP15	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	0,75 ± 0,01	0,51	3,06

\*SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

Za uzorak DP3 izmjerena je najniža vrijednost  $IC_{50}$  te je iznosila 0,08 mg/g ekstrakta. Potrebno je istaknuti da je i najniža  $IC_{50}$  vrijednost unutar ove skupine uzoraka primjenom DPPH testa dobivena i za ovaj uzorak. Analizom uzorka DP8 koji sadržava konopljiku dobivena je najviša vrijednost (25,6 mg/g ekstrakta).

Dodatci prehrani koji sadržavaju soju imaju niže vrijednosti  $IC_{50}$ , u odnosu prema njezinu biljnome industrijskome materijalu (dodaci prehrani 0,08 – 9,17 mg/g ekstrakta, a biljni industrijski materijal 46,9 mg/g ekstrakta). Nadalje, analizom dodatka prehrani koji sadržava lan dobivena je niža  $IC_{50}$  vrijednost (0,75 mg/g ekstrakta) u odnosu onu koja je dobivena analizom biljnog materijala (149,1 mg/g ekstrakta). Isti zaključci ne mogu se utvrditi i za druge uzorke ove skupine.

Tablica 18. prikazuje rezultate  $IC_{50}$  ABTS testa za uzorke dodataka prehrani koji sadržavaju dvije ili više biljnih vrsta, odnosno njihove kombinacije s vitaminima i/ili mineralima. Iz prikazanih rezultata moguće je utvrditi također širok raspon  $IC_{50}$  vrijednosti (0,20 do 28,8 mg/g ekstrakta) dobivenih analizom uzoraka koji sadrže više biljnih vrsta odnosno obogaćeni su vitaminima i/ili mineralima.

Tablica 18. IC<sub>50</sub> vrijednosti dobivene primjenom ABTS metode u uzorcima dodataka prehrani koji sadržavaju više biljnih vrsta, i/ili vitamine i i/ili minerale

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	VITAMINI / MINERALI	IC <sub>50</sub> (mg/g ekstrakta ± SD*, n = 3)	IC <sub>50</sub> /DOZA	IC <sub>50</sub> /PREPORUČENA DNEVNA DOZA
DP4	Soja ( <i>Glycine max</i> ), divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ) ( <i>Cimicifuga Racemosa</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica Sinensis</i> )		2,98 ± 0,00	2,06	2,06
DP6	Rusomača ( <i>Capsella bursa-pastoris</i> ), crvena hudika ( <i>Viburnum opulus</i> ), divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ), konopljika ( <i>Vitex agnus-castus</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> ), blaženi čkalj ( <i>Cnicus benedictus</i> ), Passiflora ( <i>Passiflora incarnata</i> ), kamilica ( <i>Matricaria recutita</i> ), maslačak ( <i>Taraxacum officinale</i> ), komorač ( <i>Foeniculum vulgare</i> ), alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )	vitamin B6, vitamin B12, folna kiselina	1,53 ± 0,01	0,89	1,78
DP7	vrkuta ( <i>Alchemilla vulgaris</i> ), konopljika ( <i>Vitex agnus castus</i> )		0,56 ± 0,01	1,12	1,12
DP9	konopljika ( <i>Vitex Angus Castus</i> ), eleuthero ( <i>Elutherococcus Senticosus</i> ), damiana ( <i>Tumeria Diffusa</i> ), ružmarin ( <i>Rosmarinum Officinalis</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica Sinensis</i> ), zeleni čaj ( <i>Camellia Sinensis</i> ), brusnica ( <i>Vaccinium Macrocarpon</i> ), silica ( <i>Bambusa Vulgaris</i> )	vitamin A, vitamin C, vitamin D, vitamin E, tiamin, vitamin B2, vitamin B3, folna kiselina, vitamin B12, biotin, pantotenska kiselina, kalcij, željezo, jod, magnezij, cink, selen, bakar, mangan, krom, molibden, kalij, para-aminobenzojeva kiselina	3,75 ± 0,01	6,95	13,9
DP12	odoljen ( <i>Valeriana officinalis</i> ), pasiflora ( <i>Passiflora incarnata</i> ), hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> )		4,57 ± 0,00	2,57	15,4
DP13	odoljen ( <i>Valeriana officinalis</i> ), hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> ), citronela ( <i>Cymbopogon winterianus</i> )		0,20 ± 0,00	0,08	0,24
DP14	odoljen ( <i>Valeriana officinalis</i> ), hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> )		3,04 ± 0,00	0,36	0,36
DP16	konopljika ( <i>Vitex agnus castus</i> ), divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ), soja ( <i>Glycine max</i> ), sikavica ( <i>Sylbum marianum</i> ), ( <i>Cimicifuga racemosa</i> ) srčenica ( <i>Leonorus cardiaca</i> ), astragalus ( <i>Astragalus membranaceus</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> )		4,04 ± 0,01	2,50	7,50
DP17	soja ( <i>Glycine max</i> ), ( <i>Cimicifuga racemosa</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> ), sladić ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> ), konopljika ( <i>Vitex agnus castus</i> )	kalcij	18,7 ± 0,01	11,4	11,4
DP18	divlji jam ( <i>Dioscorea villosa</i> ), soja ( <i>Soya hispida</i> ), crvena djetelina ( <i>Trifolium pratense</i> ), glog ( <i>Crataegus oxycanta</i> ) kudzu ekstrakt ( <i>Pueraria lobata</i> ), lan ( <i>Linum usitatissimum</i> ), caygua ( <i>Cyclanthera pedata</i> ), lan ( <i>Linum usitatissimum</i> ), kineska anđelika	cink, vitamin B6	7,79 ± 0,01	2,21	4,42
DP19	( <i>Angelica sinensis</i> ), srčenica ( <i>Leonorus cardiaca</i> ), crnoglavac ( <i>Ballota nigra</i> ), soja ( <i>Glycine max</i> ), preslica ( <i>Equisetum arvense</i> )	vitamin D, kalcij, fosfor, magnezij	5,20 ± 0,01	2,19	6,58
DP20	hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> ), crvena djetelina ( <i>Trifolium pratense</i> ), kadulja ( <i>Salvia officinalis</i> )	vitamin B6, vitamin B9, vitamin B12	28,8 ± 0,00	28,8	28,8

\* SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

RSD vrijednosti između dviju analiziranih serija uzoraka dodataka prehrani bile su od 3,4 (DP4) do 26,9 % (DP5) što je pokazalo velike razlike u proizvodnji između serija kod pojedinih uzoraka.

## 5.7. RPA metoda za određivanje antioksidacijskog učinka

U ovome je radu primijenjena i RPA metoda kojom se određuje redukcijska sposobnost ispitivanih uzoraka.

Metoda se zasniva na redukciji  $\text{Fe}^{3+}$  (feri) iona iz fericijanidnog kompleksa u fero oblik ( $\text{Fe}^{2+}$ ), u prisutnosti reducirajućeg sredstva, odnosno antioksidansa. Nastanak fero oblika mjeri se razvojem Perl-Prussianova plavog kompleksa pri valnoj duljini od 700 nm (Moktan 2008).

Povećana apsorbanacija reakcijske smjese znači i veću redukcijsku sposobnost uzorka.

Za ispitivanje korištena je metoda Oyaizu i Yen i Chen, s malim preinakama. Postupak primijenjene metode opisan je u poglavlju 3.2.6.2.

### 5.7.1. Izrada kalibracijske krivulje

Kalibracijska krivulja dobivena je mjerenjem pet različitih koncentracijskih razina askorbinske kiseline (25, 18,7, 12,5, 6,25 i 0  $\mu\text{g/mL}$  (upotrebljena je ultračista voda)). Linearnost metode određena je mjerenjem odaziva detektora za poznate koncentracije. Primjenom linearne regresije dobivena je jednadžba pravca  $y = 0,0404 x + 0,0349$  uz koeficijent određivanja  $R^2 = 0,982$ . S obzirom na njegovu visoku vrijednost moguće je utvrditi da je metoda linearna u zadanom području.

### 5.7.2. Primjena rpa metode za analizu uzoraka hrane, biljnog industrijskog materijala i dodataka prehrani

Izračunane vrijednosti redukcijske sposobnosti u ispitivanim uzorcima hrane bile su u rasponu od 1,61 do 10,65 mg/g ekstrakta i prikazane su u tablici 19. Ispitivane su vrijednosti uzoraka hrane koja je bila samo mljevena (uzorci H1-H4) te uzorci koji su se nakon postupka mljevenja dodatno odmastili (uzorci H5-H8). Veća redukcijska sposobnost (RS) dobivena je analizom uzoraka koji su samo mljeveni (za uzorke soje dobivena su RS vrijednosti 10,29 i 5,91 mg/g ekstrakta, za uzorke lana 10,65 i 6,87 mg/g ekstrakta) u odnosu prema onima i odmašćenima (za soju 1,61 i 2,36, a za lan 2,83 i 2,6 mg/g ekstrakta). Odmašćeni uzorci hrane imali su više nego dvostruko smanjenu redukcijsku sposobnost što se može zaključiti iz navedenih rezultata a pokazuje da postupak odmašćivanje ima negativan utjecaj na redukcijsku sposobnost uzoraka.

Tablica 19. Vrijednosti redukcijske sposobnosti (RS) u ispitivanim uzorcima hrane

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	POSTUPAK PRIPREME UZORKA	RS (mg/g ekstrakta ± SD*, n = 3)
H1	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje	10,29 ± 0,00
H2	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje	5,91 ± 0,00
H3	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje	10,65 ± 0,00
H4	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje	6,87 ± 0,00
H5	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje/odmaščivanje	1,61 ± 0,00
H6	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	mljevenje/odmaščivanje	2,36 ± 0,00
H7	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje/odmaščivanje	2,83 ± 0,00
H8	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	mljevenje/odmaščivanje	2,60 ± 0,00

\*SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

Tablica 20. prikazuje redukcijske sposobnosti za ispitivane uzorke biljnih industrijskih materijala. Najniža vrijednost bila je za materijal hmelja (2,13 mg/g ekstrakta), a najviša za materijal konopljike (25,11 mg/g ekstrakta). Iz tih je rezultata vidljivo da, biljni industrijski materijal soje i lana ima također veću redukcijску sposobnost (BIM soje 13,58 mg/g ekstrakta, BIM lana 12,93 mg/g ekstrakta) u odnosu na ispitivane uzorke hrane.

Tablica 20. Vrijednosti redukcijske sposobnosti u ispitivanim uzorcima biljnoga industrijskog materijala

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	RS (mg/g ekstrakta ± SD*, n = 3)
BIM1	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	13,58 ± 0,00
BIM2	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> L.	25,11 ± 0,00
BIM3	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> L.	8,71 ± 0,00
BIM4	hmelj - <i>Humulus lupulus</i> L.	2,13 ± 0,00
BIM5	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	12,93 ± 0,00

\*SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

Na kraju, utvrđene su i redukcijske sposobnosti uzoraka dodataka prehrani. Tablica 21. prikazuje rezultate za ispitivane dodatke prehrani koji sadržavaju jednu biljnu vrstu. Dobivene vrijednosti bile su u rasponu od 2,57 (DP11) do 25,90 (DP10) mg/g ekstrakta.

Tablica 21. Vrijednosti redukcijske sposobnosti (RS) u uzorcima dodataka prehrani koji sadržavaju jednu biljnu vrstu

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	RS (mg/g ekstrakta ±	RS/DOZA	RS/PREPORUČENA DNEVNA DOZA
---------------	--------------	----------------------	---------	----------------------------

		SD*, n = 3)		
DP1	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	14,50 ± 0,01	7,99	15,80
DP2	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	13,20 ± 0,00	7,50	7,50
DP3	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	3,89 ± 0,01	2,91	2,91
DP5	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> L.	4,95 ± 0,00	1,81	10,90
DP8	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> L.	7,87 ± 0,00	7,87	23,60
DP10	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> L.	25,90 ± 0,01	4,26	4,26
DP11	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> L.	2,57 ± 0,01	1,04	6,26
DP15	lan - <i>Linum usitatissimum</i> L.	15,60 ± 0,01	10,60	63,50

\*SD – standardna devijacija

Tablica 22. prikazuje rezultate ispitivanja redukcijske sposobnosti primjenom RPA testa za uzorke dodataka prehrani koji sadržavaju dvije ili više biljnih vrsta, odnosno njihove kombinacije s vitaminima i/ili mineralima. Rezultati iz tablice 22. pokazuju širok raspon RS vrijednosti od 3,77 (DP12) do 61,85 (DP9) mg/g ekstrakta.

Za dodatke prehrani koji sadrže hmelj (DP12, DP13 i DP14) dobivene su RS vrijednosti 3,77, 5,71 i 4,13 mg/g ekstrakta što spada među niže vrijednosti. Sukladno navedenom najniža određena RS vrijednost u skupini uzoraka biljnog industrijskog materijala izmjerena je analizom uzorka koji sadrži hmelj, 2,13 mg/g ekstrakta.

Tablica 22. Vrijednosti redukcijske sposobnosti u ispitivanim uzorcima dodataka prehrani koji sadržavaju više biljnih vrsta, i/ili vitamine i i/ili minerale

OZNAKA UZORKA	BILJNA VRSTA	VITAMINI / MINERALI	RS (mg/g ekstrakta ± SD*, n = 3)	RS/DOZA	RS/PREPORUČENA DNEVNA DOZA
DP4	Soja ( <i>Glycine max</i> ), divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ) ( <i>Cimicifuga Racemosa</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica Sinensis</i> )		4,10 ± 0,00	2,84	2,84
DP6	Rusomača ( <i>Capsella bursa-pastoris</i> ), crvena hudika ( <i>Viburnum opulus</i> ), divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ), konopljika ( <i>Vitex agnus-castus</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> ), blaženi čkalj ( <i>Cnicus benedictus</i> ), Passiflora ( <i>Passiflora incarnata</i> ), kamilica ( <i>Matricaria recutita</i> ), maslačak ( <i>Taraxacum officinale</i> ), komorač ( <i>Foeniculum vulgare</i> ), alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )	vitamin B6, vitamin B12, folna kiselina	10,30 ± 0,00	5,97	11,90
DP7	vrkuta ( <i>Alchemilla vulgaris</i> ), konopljika ( <i>Vitex agnus castus</i> )		24,20 ± 0,01	48,30	48,30
DP9	konopljika ( <i>Vitex Angus Castus</i> ), eleuthero ( <i>Elutherococcus Senticosus</i> ), damiana ( <i>Tumera Diffusa</i> ), ružmarin ( <i>Rosmarinum Officinale</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica Sinensis</i> ), zeleni čaja ( <i>Camellia Sinensis</i> ), brusnica ( <i>Vaccinium Macrocarpon</i> ), silica ( <i>Bambusa Vulgaris</i> )	vitamin A, vitamin C, vitamin D, vitamin E, tiamin, vitamin B2, vitamin B3, folna kiselina, vitamin B12, biotin, pantotenska kiselina, kalcij, željezo, jod, magnezij, cink, selen, bakar, mangan, krom, molibden, kalij, para-aminobenzojeva kiselina	61,85 ± 0,01	114,50	229,10
DP12	odoljen ( <i>Valeriana officinalis</i> ), pasiflora ( <i>Passiflora incarnata</i> ), hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> )		3,77 ± 0,00	2,12	12,70
DP13	odoljen ( <i>Valeriana officinalis</i> ), hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> ), citronela ( <i>Cymbopogon winterianus</i> )		5,71 ± 0,01	2,27	6,80
DP14	odoljen ( <i>Valeriana officinalis</i> ), hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> )		4,13 ± 0,00	0,49	0,49
DP16	konopljika ( <i>Vitex agnus castus</i> ), divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ), soja ( <i>Glycine max</i> ), sikavica ( <i>Sylbum marianum</i> ), ( <i>Cimicifuga racemosa</i> ) srčenica ( <i>Leonorus cardiaca</i> ), astragalus ( <i>Astragalus membranaceus</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> )		39,30 ± 0,01	24,30	73,00
DP17	soja ( <i>Glycine max</i> ), ( <i>Cimicifuga racemosa</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> ), sladić ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> ), konopljika ( <i>Vitex agnus castus</i> )	kalcij	5,95 ± 0,01	3,63	3,63
DP18	divlji jam ( <i>Dioscorea villosa</i> ), soja ( <i>Soya hispida</i> ), crvena djetelina ( <i>Trifolium pratense</i> ), glog ( <i>Crataegus oxyacantha</i> ) kudzu ekstrakt ( <i>Pueraria lobata</i> ), lan ( <i>Linum usitatissimum</i> ), caygua ( <i>Cyclanthera pedata</i> ), lan ( <i>Linum usitatissimum</i> ), kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> ), srčenica ( <i>Leonorus cardiaca</i> ), crnoglavac ( <i>Ballota nigra</i> ), soja ( <i>Glycine max</i> ), preslica ( <i>Equisetum arvense</i> )	cink, vitamin B6	4,62 ± 0,00	1,31	2,62
DP19	hmelj ( <i>Humulus lupulus</i> ), crvena djetelina ( <i>Trifolium pratense</i> ), kadulja ( <i>Salvia officinalis</i> )	vitamin D, kalcij, fosfor, magnezij	56,90 ± 0,01	24,00	71,90
DP20		vitamin B6, vitamin B9, vitamin B12	5,86 ± 0,01	5,86	5,86

\*SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)



Najviša vrijednost izmjerena je analizom uzorka DP9 (61,85 mg/g ekstrakta) kada se uspoređuju uzorci koji u svome sastavu imaju više različitih biljnih vrsta (detaljan opis nalazi se u prilogu 7.3.). Ti su rezultati sukladni rezultatima Folin Ciocalteu testa iz ovog rada s obzirom da su upravo u uzorku DP9 izmjerene najveće vrijednosti ukupnih polifenola od 31,20 mg/g ekstrakta.

RSD vrijednosti između dviju analiziranih serija uzoraka dodataka prehrani bila su u rasponu od 1,9 % (DP9) do 26,2 % (DP13) što je pokazalo velike razlike u proizvodnji između serija kod pojedinih uzoraka.

## 5.8. Usporedba rezultata dobivenih kromatografskim i spektrofotometrijskim metodama

Između dobivenih podataka ispitan je Pearsonov koeficijent korelacije. Prvo su statistički uspoređene vrijednosti između koncentracije ukupnih polifenola dobivenih Folin Ciocalteu metodom i sadržaja fitoestrogena dobivenog LC-MS/MS metodom te dobiveni Pearsonov koeficijent korelacije nije statistički značajan i iznosi  $r = -0,063$  ( $T = -0,35$ ,  $df = 31$ ,  $p = 0,729$ )<sup>4</sup>. Nadalje, između  $IC_{50}$  vrijednosti dobivenih antioksidacijskim testovima (ABTS i DPPH) Pearsonov koeficijent korelacije nije statistički značajan i iznosi  $r = -0,002$  ( $T = -0,01$ ,  $df = 30$ ,  $p = 0,991$ ). Između  $IC_{50}$  vrijednosti dobivenih DPPH metodom i koncentracije ukupnih polifenola dobivenih Folin Ciocalteu metodom nije statistički značaj i iznosi  $r = 0,006$  ( $T = 0,04$ ,  $df = 31$ ,  $p = 0,972$ ) kao ni između  $IC_{50}$  vrijednosti dobivenih DPPH metodom i sadržaja fitoestrogena dobivenog LC-MS/MS metodom  $r = -0,032$  ( $T = -0,18$ ,  $df = 31$ ,  $p = 0,861$ ). Nadalje, između  $IC_{50}$  vrijednosti dobivenih ABTS metodom i sadržaja fitoestrogena dobivenog LC-MS/MS metodom nije statistički značajan i iznosi  $r = 0,129$  ( $T = 0,71$ ,  $df = 30$ ,  $p = 0,481$ ). Između  $IC_{50}$  vrijednosti dobivenih DPPH metodom i vrijednosti reduktivne sposobnosti dobivene RPA metodom Pearsonov koeficijent korelacije nije statistički značajan i iznosi  $r = -0,050$  ( $T = -0,27$ ,  $df = 30$ ,  $p = 0,786$ ) kao ni između  $IC_{50}$  vrijednosti dobivenih ABTS metodom i vrijednosti reduktivne sposobnosti dobivene RPA metodom  $r = 0,005$  ( $T = 0,03$ ,  $df = 29$ ,  $p = 0,978$ ).

Pearsonov koeficijent korelacije između  $IC_{50}$  vrijednosti dobivenih ABTS metodom i koncentracije ukupnih polifenola dobivenih Folin Ciocalteu metodom je statistički značajan i iznosi  $r = 0,838$  ( $T = 8,42$ ,  $df = 30$ ,  $p < 0,001$ ), što ukazuje na linearnu ovisnost između te dvije metode. Grafičkim prikazom rezultata linearna ovisnost nije uočljiva nego se čini da je statistički značajan koeficijent korelacije definiran prisutnošću stršeće vrijednosti (150 mg/g, 120 mg/g) na koje je jako osjetljiv.

Kendallov koeficijent korelacije između ispitanih vrijednosti nije statistički značajan i što ukazuje na nepostojanje monotone zavisnosti između vrijednosti, odnosno veće vrijednosti izmjerene na jednoj metodi ne uvjetuju mjerenje većih vrijednosti na drugoj metodi. Rezultati su prikazani u tablici 23.

---

<sup>4</sup>  $r$  – Pearsonov koeficijent korelacije;  $T$  – test statistika;  $df$  – broj stupnjeva slobode;  $p$  –  $p$  vrijednost

Tablica 23. Kendalovi koeficijenti korelacije

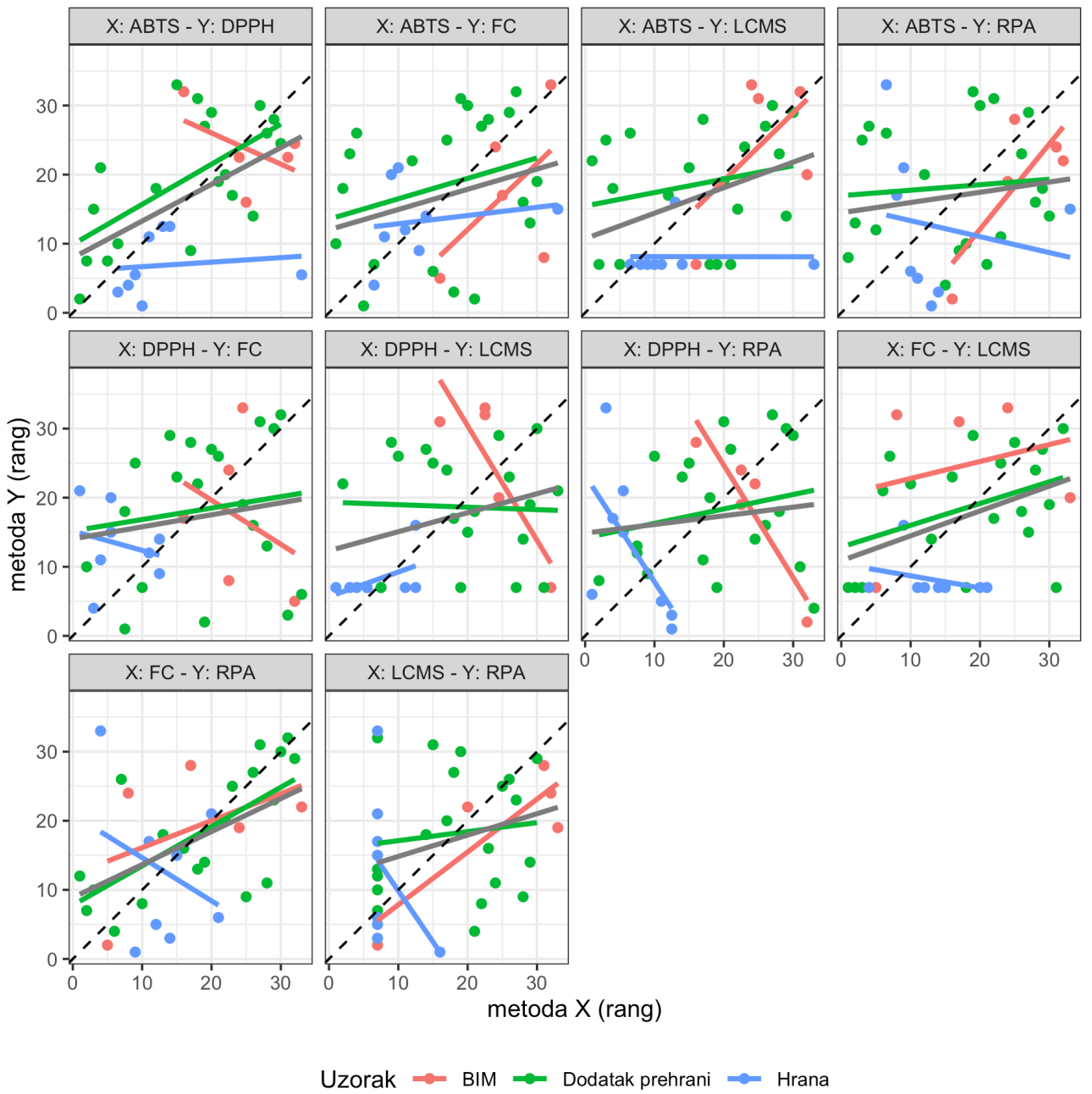
Vrijednosti dobivene metodom 1	Vrijednosti dobivene metodom 2	$\tau^*$	Z*	p*
ABTS	DPPH	0,415	3,33	0,001
ABTS	FC	0,212	1,70	0,089
ABTS	LC-MS/MS	0,327	2,52	0,012
ABTS	RPA	0,148	1,17	0,241
DPPH	FC	0,143	1,16	0,245
DPPH	LC-MS/MS	0,200	1,55	0,120
DPPH	RPA	0,136	1,09	0,277
FC	LC-MS/MS	0,271	2,11	0,034
FC	RPA	0,419	3,37	0,001
LC-MS/MS	RPA	0,269	2,07	0,038

$\tau$  – Kendallov koeficijent korelacije

Z – test statistika

p – p vrijednost

Nadalje, rezultati na slici 9. su prikazani točkastim dijagramom pri čemu su uzorci istog tipa prikazani istom bojom. Sivi pravac prikazuje regresijski pravac neovisan o tipu uzorka. Očekivani položaj regresijskih pravaca je prikazan iscrtanom linijom.



Slika 9. Kendallovi koeficijenti korelacije

## 6. ZAKLJUČCI

Ovaj je rad obuhvatio analizu: dviju vrsta hrane (soja i lan), pet sirovina biljnih vrsta koje se koriste u proizvodnji dodataka prehrani (soja, crvena djetelina, konopljika, hmelj i lan) te 20 komercijalno dostupnih proizvoda, dodataka prehrani (tablete, kapsule i tekuće ekstrakte) koji se primjenjuju za ublažavanje simptoma menopauze. Analizirano je jedanaest biološki aktivnih tvari: daidzein, genistein, formononetin, biokanin A, apigenin, kasticin, 8-prenilnaringenin, ksantohumol, izoksantohumol, matairezinol i sekoizolaricirezinol.

Identifikacija deset biološki aktivnih tvari provedena je primjenom DI-MS<sup>n</sup> tehnike. Naime, preliminarna istraživanja pokazala su kako izoksantohumol i ksantohumol imaju istovjetne MS spektre te ih u uzorcima koje sadrže nije moguće jasno razlučiti. Navedeno je bilo i za očekivati zbog sličnosti u njihovim strukturama. Zato su uzorci koji sadrže analit s istovjetnim spektrom kao ova dva spoja označeni kao da sadržavaju ksantohumol. To predstavlja ograničenje u primjeni DI-MS<sup>n</sup> tehnike u odnosu na LC-MS/MS tehniku čijom primjenom u uspješno određeni svi fitoestrogeni.

Provedeno istraživanje pokazalo je da se brzom, jednostavnom i ekološki prihvatljivom DI-MS<sup>n</sup> tehnikom mogu identificirati fitoestrogeni prisutni u raznovrsnim uzorcima. Opisana metoda primjenjiva je u rutinskim probirnim analizama velikog broja analita u složenim uzorcima. Nadalje, metoda je pokazala izvrsnu ponovljivost analitičkog postupka budući da je usporedbom intenziteta signala za pojedine analite dobivene ponovljenim mjerenjem kroz tri dana odstupanje bilo manje od 5 %. Međutim, predložena metoda nije pogodna za identifikaciju niskih koncentracija fitoestrogena (manje od 100 mg/kg). Složen sastav ispitivanih uzoraka, posebice onih koji sadržavaju više različitih biljnih vrsta, uzrok je slabe osjetljivosti metode i varijabilnosti u MS<sup>2</sup> spektru analita u standardnoj otopini i u uzorku.

Budući da je DI-MS<sup>n</sup> tehnikom moguće samo identificirati biološke aktivne tvari daljnja, a i tehnika je pokazala ograničenja u jasnoj identifikaciji pojedinih fitoestrogena daljnje istraživanje usmjereno je na razvoj metode za istovremeno određivanje jedanaest biološki aktivnih tvari. Napredna LC-MS/MS tehnike osigurala je i bolju selektivnost i osjetljivost analitičkog postupka u odnosu na DI-MS<sup>n</sup> tehniku. Usporedbom dobivenih vrijednosti i onih navedenih na deklaracijama proizvoda uočeno je da su izmjerene vrijednosti niže od onih navedenih na deklaracijama (manje od 63 % u odnosu prema navedenim vrijednostima). Kako bi se dobila informacija o ujednačenosti proizvodnje uzoraka predložena LC-MS/MS metoda primijenjena je za procjenu odstupanja u sadržaju aktivnih

tvori među različitim proizvodnim serijama. RSD vrijednosti između ispitivanih serija su bile između 1,4 i 24,3 %. Najveća razlika između ispitivanih serija zabilježena je u proizvodima koji su sadržavali konopljiku (RSD od 9,8 do 24,3 %).

Nadalje, uz navedene tehnike u radu je korištena i UV/VIS spektrofotometrija. Folin Ciocalteu metoda primijenjena je za određivanje sadržaja ukupnih polifenola dok je antioksidacijski učinak ispitan primjenom DPPH, ABTS i RPA metoda. Ukupne vrijednosti polifenola bile su najniže u uzorcima hrane, zatim u uzorcima biljnog industrijskog materijala, te na posljetku u uzorcima dodataka prehrani. Ispitivani uzorci koji su u svome sastavu sadržavali veći broj različitih biljnih vrsta imali su i najveće koncentracije ukupnih polifenola. Sukladno tome pokazali su se i rezultati antioksidacijskih testova, uz pojedina odstupanja, gdje su ispitivani uzorci dodataka prehrani imali bolji antioksidativni učinak u odnosu na ispitivane uzorke biljnog industrijskog materijala i uzorke hrane.

Kao zaključak rezultata ovog rada može se naglasiti nužnost razvoja novih analitičkih metoda i njihova provedba za određivanje i aktivnih i štetnih tvari u sirovinama koje se koriste u proizvodnji dodataka prehrani ali i gotovih proizvoda. Dodaci prehrani se danas sve učestalije primjenjuju. Iako su po definiciji proizvodi koji pomažu u održavanju zdravlja, dobivaju se iz koncentriranih hranjivih tvari i u osnovi upotpunjuju svakidašnju prehranu, za sada se od njih ne očekuje dokazivanje djelotvornosti ni standardizacija djelatnih tvari.

Bez obzira na to, rutinskim ispitivanjima njihova sastava, u svakodnevnoj praksi, uvelike bi se doprinijelo njihovoj standardizaciji i učinkovitosti.

## 7. LITERATURA

1. Abram V, Ceh B, Vidmar M, Hercezia M, Lazica N, Bucika V, Smole S, Košir I, Kač M, Demšara L, Poklar Ulrih N. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. *Indr Crop*. 2015;64:124–134.
2. Almeida IM, Rodrigues F, Sarmiento B, Alves RC, Oliveira MB. Isoflavones in food supplements: chemical profile, label accordance and permeability study in Caco-2 cells. *Food Funct*. 2015;6:938–946.
3. Andres S, Hansen U, Niemann B, Palavinskas R, Lampen A. Determination of the isoflavone composition and estrogenic activity of commercial dietary supplements based on soy or red clover. *Food Funct*. 2015;6:2017–2025.
4. Anwar F, Przybylski R. Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*. 2012;11(3): 293–301.
5. Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik SE, Bektaşoğlu B, Berker KI, Özyurt D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*. 2007;12:1496–1547.
6. Arjmandi BH, Khalil DA, Lucas EA. Soy protein may alleviate osteoarthritis symptoms. *Phytomedicine*. 2004;11:567–575.
7. Avila MZ, De Luca e Braccini A, Giatti C, Souza M, Gontijo Mandarino JM, Bazo GL, Cabra YMF. Physiological quality, content and activity of antioxidants in soybean seeds artificially aged. *Rev. Bras. sementes*. 2012;34(3):397–407.
8. Blainski A, Lopes GC, Palazzo de Mello JC. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*. 2013;18:6852–6865.
9. Boniglia C, Carratu B, Gargiulo R, Giammarioli S, Mosca M, Sanzini E. Content of phytoestrogens in soy-based dietary supplements. *Food Chem*. 2009;115:1389–1392.
10. Bowe J, Li XF, Kinsey-Jones J, Heyerick A, Brain S, Milligan S, O'Byrne K. The hop phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, reverses the ovariectomy-induced rise in skin temperature in an animal model of menopausal hot flashes. *J Endocrinol*. 2006;191:399–405.

11. Brodniewicz T, Gryniewicz G. Plant phenolics as drug leads – what is missing?. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 2012;69(6):1203–1217.
12. Bustamante-Rangel M, Delgado-Zamarreño MM, Perez-Martin L, Rodriguez-Gonzalo E, Dominguez-Alvarez J. Analysis of isoflavones in foods. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*. 2018;17:391–411.
13. Campbell SC, Bakhshalian N, Sadaat RL, Lerner MR, Lightfoot SA, Brackett D, Arjmandi BH. Flaxseed reverses atherosclerotic lesion formation and lowers lipoprotein(a) in ovarian hormone deficiency. *Menopause*. 2013;(11):1176–83.
14. Carroll DG. Nonhormonal therapies for hot flashes in menopause. *Am Fam Physician*. 2006;73(3):457–64.
15. Chaiyasut C, Kumar T, Tipduangta P, Rungseevijitprapa W. Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation. *Afr. J. of Biotechnol*. 2011;9(26):4120–4126.
16. Chen LJ, Zhao X, Plummer S, Tang J, Games DE. Quantitative determination and structural characterization of isoflavones in nutrition supplements by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2005;1082:60–70.
17. Chen MN, Lin CC, Liu CF. Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systematic review. *Climacteric*. 2015;18(2):260–9.
18. Clarke DB, Bailey V, Lloyd AS. Determination of phytoestrogens in dietary supplements by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants:Part A*. 2008;25:534–547.
19. Coldham NG, Sauer MJ. Identification, quantitation and biological activity of phytoestrogens in a dietary supplement for breast enhancement. *Food Chem Toxicol*. 2001;39:1211–1224.
20. Colli MC, Bracht A, Soares, AA, de Oliveira AL, Bôer CG, de Souza CG, Peralta RM. Evaluation of the efficacy of flaxseed meal and flaxseed extract in reducing menopausal symptoms. *Journal of Medicinal Food*. 2012;15(9):840–5.
21. Dalais FS, Ebeling PR, Kotsopoulos D, McGrath BP, Teede HJ. The effects of soy protein containing isoflavones on lipids and indices of bone resorption in postmenopausal women. *Clin Endocrinol*. 2003;58:704–709.
22. Del Giorno C, Maggio da Fonseca A, Bagnoli VR, Serrano de Assis J, Soares JM, Baracat EC. Effects of trifolium pratense on climacteric and sexual symptoms in postmenopausal women. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(5):558–62.



23. Delmonte P, Perry J, Rader JI. 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.
24. Demarque DP, Crotti AEM, Vessecchi R, Lopes JLC, Lopes NP. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterisation of synthetic and natural products. *Nat Prod Rep*. 2016;33:432–455.
25. Di Viesti V, Carnevale G, Zavatti M, Benelli A, Zanolini P. Increased sexual motivation in female rats treated with *Humulus lupulus* L. extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;134:514–517.
26. Duffy R, Wiseman H, File SE. Improved cognitive function in postmenopausal women after 12 weeks of consumption of a soya extract containing isoflavones. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003;75:721–729.
27. Esmacili AK, Taha R, Mohajer S, Banisalam B. Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Content of Various Solvent Extracts from In Vivo and In Vitro Grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). *BioMed Research International*. 2015;5:1–11.
28. File SE, Hartley DE, Elsabagh S, Duffy R, Wiseman H. Cognitive improvement after 6 weeks of soy supplements in postmenopausal women is limited to frontal lobe function. *Menopause*. 2005;12:193–201.
29. Fogliatto DK, Barbosa AM, 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.
30. Fukahori M, Kobayashi S, Naraki Y, Sasaki T, Oka H, Seki M, Masada-Atsumi S, Hakamatsuka T, Goda Y. Quality evaluation of medicinal products and health foods containing chaste berry (*Vitex agnus-castus*) in Japanese. European and American markets. *ChemPharm Bull*. 2014;62:379–385.
31. Gallagher JC, Satpathy R, Rafferty K, Haynatzka V. The effect of soy protein isolate on bone metabolism. *Menopause*. 2004;11:290–298.
32. Gencil VB, Benjamin MM, Shafik NB, Khalil RA. Vascular Effects of Phytoestrogens and Alternative Menopausal Hormone Therapy in Cardiovascular Disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2012;12(2):149–174.

33. Georgetti SR, Casagrande R, Verri WA, Borin MF, Rafael JA, Jabor JR, Fonseca MJV. Assessment of the Antioxidant Activity of Two Plant Extracts Containing Isoflavonoids by Different In Vitro Methods. *Lat. Am. J. Pharm.* 2007;26(2):253–8.
34. Ghazanfarpour M. Red Clover for treatment of hot flushes and menopausal symptoms: A systematic review and meta-analysis. *J Obstet Gynaecol.* 2016;36(3):301–11.
35. Gil-Ramirez A, Mendiola JA, Arranza E, Ruiz-Rodriguez A, Regleroa G, Ibanez E, Marina FR. Highly isoxanthohumol enriched hop extract obtained by pressurized hot water extraction (PHWE). Chemical and functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies.* 2012;16:54-60.
36. Gritti F, Guiochon G. The van Deemter equation: Assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatogr A.* 2013;1302:1–13.
37. Ha H, Lee YS, Lee JH, Choi H, Kim C. High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones in medicinal herbs. *Arch Pharm Res.* 2006;29(1):96–101.
38. He FJ, Chen JQ. Consumption of soybeans, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanism. *FSHW.* 2013;2:146–161.
39. Heyerick A, Vervarcke S, Depypere H, Bracke M, Keukeleire DD. A first prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the use of a standardized hop extract to alleviate menopausal discomforts. *Maturitas.* 2006;54: 164–175.
40. [http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013\\_04\\_39\\_722.html](http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_04_39_722.html), pristupljeno 17. svibnja 2021.
41. Hümpel M, Isaksson P, Schaefer O, Kaufmann U, Ciana P, Maggi A, Schleuning W-D. Tissue specificity of 8-prenylnaringenin: protection from ovariectomy induced bone loss with minimal trophic effects on the uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;97:299–305.
42. Indranupakorn R, Sobharaksha P, Luantana M. Antioxidant Activities of The Soybean Extracts Obtained by Classical Extraction. *IJPS.* 2010;6(3):113–121.
43. Karamac M, Kulczyk A, Sulewska K. Antioxidant Activity of Hydrolysates Prepared from Flaxseed Cake Proteins Using Pancreatin. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2014;64(4):227–233.
44. Kargozar R, Azizi H, Salari R. A review of effective herbal medicine in controlling menopausal symptoms. *Electronic Physician.* 2017;9(11):5826–5833.

45. Kedare SF, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 2011;48(4):412–422.
46. Keiler AM, Zierau O, Kretzschmar G. Hop Extracts and Hop Substances in Treatment of Menopausal Complaints. *Planta Med*. 2013;79:576–579.
47. Klejdus B, Vacek J, Lojková L, Benesová L, Kubán V. Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases. *J Chromatogr A*. 2008;1195(1–2):52–9.
48. Kowalczyk D, Swieca M, Cichočka J, Gawlik-Dziki U. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. *J. Inst. Brew*. 2013;119:103–110.
49. Krenn L, Potsch V. An efficient HPLC method for the quantification of isoflavones in soy extracts and soy dietary supplements in routine quality control. *Pharmazie*. 2005;61:582–585.
50. Kritz-Silverstein D, Von Muhlen D, Barrett-Connor E, Bressel MA. Isoflavones and cognitive function in older women: the SOy and Postmenopausal Health In Aging (SOPHIA) Study. *Menopause*. 2003;10:196–202.
51. Krofta K, Mikyška A, Haškova D. Antioxidant Characteristics of Hops and Hop Products. *Journal of the Institute of Brewing*. 2008;114(2):160–166.
52. Kucukboyaci N, Kadioglu O, Adiguzel N, Tamer U, Guvebc A, Bani B. Determination of isoflavone content by HPLC-UV method and in vitro antioxidant activity of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Turk J Pharm Sci*. 2013;10(3):463–472.
53. Latoui M, Aliakbarian B, Seffen M, Converti A, Perego P. Extraction of phenolic compounds from *Vitex agnus-castus* L. *Food and Bioproducts Processing*. 2012;90(4):748–754.
54. Lucas EA, Wild RD, Hammond LJ, Khalil DA, Juma S, Daggy BP, Stoecker BJ, Arjmandi BH. Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002;87(4):1527–32.
55. Madeira PJ, Borges CM, Florencio MH. Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometric and semi-empirical calculations study of five isoflavone aglycones. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010;24:3432–3440.
56. Magiera S, Baranowska I, Lautenzleger A. UHPLC-UV method for the determination of flavonoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;102:468–475.

57. Malenčić Đ, Popović M, Miladinović J. Phenolic Content and Antioxidant Properties of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Seeds. *Molecules*. 2007;12:576–581.
58. Maltas E, Dageri N, Cingilli H, Yildiz S. Biochemical and molecular analysis of soybean seed from Turkey. *J. Med. Plants Res*. 2011;5(9):1575–1581.
59. Mari A, Montoro P, Pizza C, Piacente S. Liquid chromatography mass spectrometry determination of chemical markers and principal component analysis of *Vitex agnus-castus* L. fruits (Verbenaceae) and derived food supplements. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;70:224–230.
60. Markovitch O, Ottelé J, Veldman O, Sijbren C. Automated device for continuous stirring while sampling in liquid chromatography systems. *Commun Chem*. 2020;3:180.
61. Ming LG, Ge BF, Wang MG, Chen KM. Comparison between 8-prenylnarigenin and narigenin concerning their activities on promotion of rat bone marrowstromal cells' osteogenic differentiation in vitro. *Cell Prolif*. 2012;45:508–515.
62. Mitra K, Uddin N. Total Phenolics, Flavonoids, Proanthocyanidins, Ascorbic Acid Contents and In-Vitro Antioxidant Activities of Newly Developed Isolated Soya Protein. *JAFS*. 2014;2(5):160–168.
63. Moktan B, Saha J, Sarkar PK. Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to kinema. *Food Res Int*. 2008;41:586–593.
64. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 2004;26(2):211–219.
65. Morales P, Carvalho AM, Sanchez-Mata C, Camara M, Molina M, Ferreira I. Tocopherol composition and antioxidant activity of spanish wild vegetables. *Genet Resour Crop Evol*. 2012;59:851–863.
66. Morali G, Polatti F, Metelitsa E, Mascarucci P, Magnani P, Brunenghi Marrè G. Open, non-controlled clinical studies to assess the efficacy and safety of a medical device in form of gel topically and intravaginally used in postmenopausalwomenwith genital atrophy. *Arzneimittelforschung*. 2011;56:230–238.
67. Mornar A, Sertić M, Nigović B. Development of a rapid LC/DAD/FLD/MS<sup>n</sup> method for the simultaneous determination of monacolins and citrinin in red fermented rice products. *J Agric. Food Chem*. 2013;61:1072–1080.
68. Mornar A, Sertić M, Amidžić Klarić D, Klarić I, Stipanović K, Nigović B. Evaluation of alcohol content and metal imprurities in liquid dietary supplements by Shss-GC-FID and GFAAS techniques. *Food Chem*. 2016;211:285–293.

69. Mujčić I, Šertović E, Jokić S, Sarić Z, Alibabić V, Vidović S, Živković J. Isoflavone content and antioxidant properties of soybean seeds. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 2011;3(1):16–20.
70. Nakamura Y, Tsuji S, Tonogai Y. Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in Japanese daily intake. *J AOAC Int.* 2000;83:635-650.
71. Neascu M, Vicas S, Socaciu C. HPLC analysis coupled with diode array detector used in determination of isoflavone aglycones from different Romanian varieties of soybeans. *Bulletin UASVM Agriculture.* 2008;65:310–315.
72. Nguyen DTT, Guillaume D, Rudaz S, Veuthey JC. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *J. Sep. Sci.* 2006;29(12):1836–1848.
73. Niknejad F. Antifungal and antioxidant effects of hops (*Humulus lupulus* L.) flower extracts. *Advances in Environmental Biology.* 2014;50:395–402.
74. Orhan IE, Tosuni F, Tamer U, Duran A, Alani B, Koki AF. Quantification of genistein and daidzein in two endemic *Genista* species and their antioxidant activity. *J. Serb. Chem. Soc.* 2011;76(1):35–42.
75. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction- antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 1986;44(6): 307-315.
76. Patade A, Devareddy L, Lucas EA, Korlagunta K, Daggy BP, Arjmandi BH. Flaxseed reduces total and LDL cholesterol concentrations in Native American postmenopausal women. *J Womens Health (Larchmt).* 2008;3:355–66.
77. Popova IE, Hall C, Kubatova A. Determination of lignans in flax-seed using liquid chromatography with time-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2009;1216:217–229.
78. Prokudina EA, Havliček L, Al-Maharik N, Lapčík O, Strnad M, Gruz J. Rapid UPLC-ESI-MS/MS method for the analysis of isoflavonoids and other phenylpropanoids. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2012;26:36–42.
79. Rashed KN. Antioxidant activity of different extracts of *Vitex agnus-castus* (L.) and phytochemical profile. *Research in Pharmacy.* 2013;3(6):1-5.
80. Rizzo G, Baroni L. Soy, soy foods and their role in vegetarian diets. *Nutrients.* 2018;20:1–51.

81. Romani A, Vignolin P, Tanini A, Pampaloni B, Heimler D. HPLC/DAD/MS and antioxidant activity of isoflavone-based food supplements. *Natural Products Communications*. 2010;5:1775–1780.
82. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321–33.
83. Rybak ME, Parker DL, Pfeiffer CM. Determination of urinary phytoestrogens by HPLC-MS/MS: a comparison of atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (ESI). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008;861:145–150.
84. Saglam H, Pabuccuoglu A, Kivcak B. Antioxidant activity of *Vitex agnus-castus* L. extracts. *Phytother Res*. 2007;21(11):1059–60.
85. Salinas CM, Lopez-Sobaler AM. Benefits of soy in women`s health. *Nutr Hosp*. 2017;34(4):36–40.
86. Sarikurkcü C, Arısoy K, Tepe B, Cakir A, Abalı G, Mete E. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2009;47:2479–2483.
87. Sargi SC, Silva BC, Santos HMC, Montanher PF, Boeing JS, Santos OO, Souza NE, Visentainer JV. Antioxidant capacity and chemical composition in seeds rich in omega-3: chia, flax, and perilla. *Food Sci. Technol, Campinas*. 2013;33(3):541–548.
88. Sertić M, Mornar A, 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.
89. Seeley VY. Recent advances in flow-controlled multidimensional gas chromatography. *J Chromatogr A*. 2012;1255:24–37.
90. Shaikh A, Makhmoor T, Choudhary MI. Radical scavenging potential of compounds isolated from *Vitex agnus-castus*. *Turk J Chem*. 2010;34:119.
91. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16:144-158.
92. Sochor J, Ryvolova M, Krystofova O, Salas P, Hubalek J, Adam V, Trnkova L, Havel L, Beklova M, Zehnalek J, Provaznik I, Kizek R. Fully Automated Spectrometric

- Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules*. 2010;15:8618–8640.
93. Sowa I, Wójciak-Kosior M, Strzemski M, Rokicka K, Blicharski T, Kocjan R. Analysis of compounds with phytoestrogenic activity in dietary supplements with use of HPTLC-densitometry method. *Acta Pol Pharm*. 2014;71:265–269.
  94. Thompson LU, Boucher BA, Cotterchio M, Kreiger N, Liu Z. Dietary phytoestrogens, including isoflavones, lignans, and coumestrol, in nonvitamin, nonmineral supplements commonly consumed by women in Canada. *Nutr Cancer*. 2007;59:176–184.
  95. Uesugi T, Fukui Y, Yamori Y. Beneficial effects of soybean isoflavone supplementation on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal Japanese women: a four-week study. *J Am Coll Nutr*. 2002;21:97–102.
  96. Uifăelan A, Farkaș A, Ilieș M, Hegheș SC, Ionescu C, Iuga CA. Assessment of isoflavone aglycones variability in soy food supplements using a validated HPLC-UV method. *Clujul Med*. 2015;88:373–380.
  97. Vaclavik L, Krynitsky AJ, Rader JJ. Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: a review. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406:6767–6790.
  98. Vaya J, Mahmood S. Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *Biofactors*. 2006;28(4):169–75.
  99. Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. 2007;105:940–949.
  100. Wongputtisin P, Khanognuch C, Pongpiachan P, Lumyong S. Antioxidant Activity Improvement of Soybean Meal by Microbial Fermentation. *Research Journal of Microbiology*. 2007;2(7):577-583.
  101. Yanaka K, Takebayashi J, Matsumoto T, Ishimi Y. Determination of 12 isoflavone isomers in soy foods and supplements by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 2012;60:4012–4016.
  102. Yilmazer M, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR. In vitro biotransformation of xanthohumol, a flavonoid from hops (*Humulus lupulus*), by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 2001;29:223–231.

103. Zhang XL, Zhang YD, Wang T, Guo HY, Liu QM, Su HX. Evaluation on Antioxidant Effect of Xanthohumol by Different Antioxidant Capacity Analytical Methods. *Journal of Chemistry*. 2014;53:135–141.



## 8. PRILOZI

Prilog 8.1. Popis ispitivanih uzoraka hrane

NAZIV PROIZVODA	PROIZVOĐAČ	VRSTA UZORKA	BILJNA VRSTA	GLAVNA DJELATNA TVAR	OPIS	GODINA PROIZVODNJE
Soja	Bio&bio, Zagreb, Hrvatska	zrno	soja - <i>Glycine max</i> (L.)Merr.	daidzein, genistein	organski uzgojena soja	2013.
Soja	Podravka, Koprivnica, Hrvatska	zrno	soja - <i>Glycine max</i> (L.)Merr.	daidzein, genistein	organski uzgojena soja	2013.
Lan sjeme	Bio&bio, Zagreb, Hrvatska	sjeme	lan - <i>Linum usitatissimum</i> (L.)	matairezinol, sekoizolaricirezinol	organski uzgojeni lan	2012.
Lan sjeme	Garden, Zagreb, Hrvatska	sjeme	lan - <i>Linum usitatissimum</i> (L.)	matairezinol, sekoizolaricirezinol	organski uzgojeni lan	2013.

Prilog 8.2. Popis ispitivanih uzoraka biljnoga industrijskog materijala

NAZIV PROIZVODA	PROIZVOĐAČ	VRSTA UZORKA	BILJNA VRSTA	GLAVNA DJELATNA TVAR	OPIS
ekstrakt soje	Specchiasol S.r.l., Bussolengo, Italija	biljni industrijski materijal	soja - <i>Glycine max</i> (L.)Merr.	daidzein, genistein	suhi ekstrakt zrna soje koji sadržava 40 % izoflavona
ekstrakt konopljike	Specchiasol S.r.l., Bussolengo, Italija	biljni industrijski materijal	konopljika - <i>Vitex agnus castus</i> (L.)	apigenin, kasticin	suhi ekstrakt konopljike koji sadržava 0,5 % agnuzida
ekstrakt crvena djeteline	Specchiasol S.r.l., Bussolengo, Italija	biljni industrijski materijal	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> (L.)	daidzein, genistein, formononetin, biokanin A	suhi ekstrakt crvene djeteline koji sadržava 8 % izoflavona
ekstrakt hmelja	Specchiasol S.r.l., Bussolengo, Italija	biljni industrijski materijal	hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (L.)	8-prenilnaringenin, ksantohumol, izoksantohumol	suhi ekstrakt hmelja koji sadržava 0,1 % flavonoida
ekstrakt lana	Specchiasol S.r.l., Bussolengo, Italija	biljni industrijski materijal	lan - <i>Linum usitatissimum</i> (L.)	matairezinol, sekozolaricirezinol	suhi ekstrakt lana koji sadržava 40 % lignana

### Prilog 8.3. Popis ispitivanih uzoraka dodataka prehrani

NAZIV PROIZVODA	PROIZVOĐAČ	VRSTA UZORKA	BILJNA VRSTA	BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI	OPIS
Belmiran san	Belupo d.d., Koprivnica, Hrvatska	obložene tablet	hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (L.)	8-prenilnaringenin, ksantohumol, izoksantohumol	suhi ekstrakt cvijeta hmelja ( <i>Humulus lupulus</i> L.), 30 mg
Bonisan	Dietpharm, Rakitje, Hrvatska	kapsule	hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (L.)	8-prenilnaringenin, ksantohumol, izoksantohumol	ekstrakt sasušenih cvjetova hmelja ( <i>Humulus lupulus</i> ), 50 mg
Cirkulin valerijana	Roha Arzneimittel GmbH, Bremen, Njemačka	obložene tablet	hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (L.)	8-prenilnaringenin, ksantohumol, izoksantohumol	ekstrakt (kao suhi ekstrakt) <i>Valeriana officinalis</i> korjen (4-6:1, voda) 160 mg, ekstrakt (kao suhi ekstrakt) <i>Humulus lupulus</i> cvijet (3-6:1, voda) 40 mg
Evine kapi	Suban ljekovito bilje, Strmec Samoborski, Hrvatska	etanolni ekstrakt	konopljika - <i>Vitex agnus- castus</i> (L.)	matairezinol, sekoizolaricirezinol	vodenoalkoholni ekstrakt vrkute ( <i>Alchemilla vulgaris</i> , nadzemni dio) 90%, plod konopljike ( <i>Vitex agnus castus</i> , plod) 10%
Fem flax	Cool Products LLC, Belgija	kapsule	lan - <i>Linum usitatissimu m</i> (L.)	matairezinol, sekoizolaricirezinol	99,9% 27 različitih lignana lana 700 mg
Feminal	Jadran Galenski Laboratorij d.d., Rijeka, Hrvatska	kapsule	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> (L.)	daidzein, genistein, f ormononetin, biokanin A	100 mg ekstrakta crvene djeteline koji sadrži 40% izoflavona
Herbal Female Complex	Solgar Inc, NJ, SAD	biljne kapsule	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 divljeg jama (korijen) 75 mg, ekstrakt sojinih klica †† (2% Izoflavona) 100 mg, standardizirani ekstrakt sikavice (sjeme) (silimarin 40 mg [80%]) 50 mg, ekstrakt <i>cimicifuga racemosa</i> (korijen) (4:1) 100 mg, ekstrakt srčenicice (nadzemni dio) (5:1) 75 mg, <i>Astragalus</i> prah (korijen) 75 mg, prah kineske andelike (korijen) 50 mg
Maxi Life Mega Soy	Twinlab, Michigan, SAD	kapsule	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	daidzein, genistein, formononetin, biokanin A	ekstrakt soje (Novasoy†) 200 mg (sadrži 40% izoflavona [80 mg of izoflavona uključujući 40 mg genistina, 31 mg diadzina, i 9 mg glicitina])
Meno-guide	Erba Vita, New York, SAD	biljne želatinske VCAPS	lan - <i>Linum usitatissimu m</i> (L.); soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	matairezinol, sekoizolaricirezinol, daidzein, genistein	vitamin D (kao kolekalciferol) 100 IU, kalcij (kao kalcij fosfat) 5,9 mg, fosfor (kao kalcij fosfat) 4,6 mg, magnezij (kao magnezij oksid) 29 mg, Kudzu ekstrakt ( <i>Pueraria lobata</i> ) (korijen) [standardiziran na 40% (20 mg) izoflavona izraženih kao puerarin (18 mg), kao daidzein (3 mg)] 50,0 mg, lan ekstrakt ( <i>Linum usitatissimum</i> ) (sjeme) [standardiziran na 20% (10 mg) lignana] 49 mg, Caygua ( <i>Cyclanthera pedata</i> ) (plod) 41 mg, lan mikrokapsulirano ulje ( <i>Linum usitatissimum</i> ) (sjeme) [standardiziran na a-linoleičnu kiselinu (>13 mg), linoleičnu kiselinu (>4 mg), oleična kiselina (>4 mg)] 34 mg, ( <i>Angelica sinensis</i> ) ekstrakt (korijen) [standardiziran na 2,5% (1 mg) Triterpenskih glikozida (17-deoksiacetin)] 34 mg, ( <i>Angelica sinensis</i> ) ekstrakt (korijen) [standardiziran na 1% (0,3 mg) ligustilida] 30 mg, srčenicica ( <i>Leonurus cardiaca</i> ) (nadzemni cvjetni dijelovi) 29 mg, crnoglavac ( <i>Ballota nigra</i> ) (nadzemni cvjetni dijelovi) 29 mg, ekstrakt soje ( <i>Glycine max</i> ) (sjeme) [standardiziran na 40% (7 mg) izoflavona, kao genistein=>36% (6 mg)] 17 mg, ekstrakt preslice ( <i>Equisetum arvense</i> ) (nadzemni dio) [standardiziran na 1% (0,2 mg) silikon] 16 mg

Menopause	Helvetia Apotheke,Zurich, Švicarska	tablete	hmelj - Humulus lupulus (L.), crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> L.	8-prenilnaringenin, ksantohumol, izoksantohumol, daidzein, genistein, formononetin, biochanin A	ekstrakt hmelja (sadrži najmanje 50 µg 8PN) 375,0 mg, ekstrakt crvene djeteline (sadrži najmanje 20% izoflavona) 50,0 mg, ekstrakt kadulje 20,0 mg, vitamin B6 (piridoksin) 0,7 mg, vitamin B9 (folna kiselina) 100,0 µg, vitamin B12 (cijanokobalamin) 1,25 µg
Menopause Relief	NBTY group, New York, SAD	tablete	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr., konopljika - <i>Vitex agnus- castus</i> (L.)	daidzein, genistein, apigenin, kasticin	koncentrat soje (sadrži 21 mg izoflavona) 700 mg, standardizirani ekstrakt korijena <i>Cimicifuga racemosa</i> radix (sadrži 2,5% triterpenskih glikozida) 53,34 mg, angelica korijen ( <i>Angelica sinensis</i> , radix) 50,0 mg, korijen sladića ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> , radix) 50,0 mg, plod konopljike ( <i>Vitex agnus castus</i> ,fructus) 33,34 mg, kalcij (kalcij karbonat) 128,7 mg
Natural Max, Premenstru al Solution	InterHealth Nutraceuticals Inc., CA, SAD	Fast- caps®ka psule	konopljika - <i>Vitex agnus- castus</i> (L.)	apigenin, kasticin	Vitamin B6 (kao piridoksin HCl) 10 mg, vitamin B12 (kao cijanokobalamin) 100 mcg, folna kiselina 400 mcg, rusomača( <i>Capsella bursa- pastoris</i> ) (nadzemni dio) 250 mg, crvena hudika ( <i>Viburnum opulus</i> ) (kora) 250 mg, divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ) (korijen) 100 mg, konopljika ( <i>Vitex agnus-castus</i> ) (ekstrakt ploda) 100 mg, kineska anđelika ( <i>Angelica sinensis</i> ) (ekstrakt korijena) 100 mg, blaženi čkalj ( <i>Cnicus benedictus</i> ) (nadzemni dio) 100 mg, <i>Passiflora</i> ( <i>Passiflora incarnata</i> ) (ekstrakt nadzemnog dijela) 50 mg, kamilica ( <i>Matricaria recutita</i> ) (cvatući vršci) 50 mg, maslačak ( <i>Taraxacum officinale</i> ) (korijen) 50 mg, komorač ( <i>Foeniculum vulgare</i> ) (sjeme) 50 mg, Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> ) (list) 50 mg
Pausa	Specchiasol s.r.l, Bussolengo, Italija	kapsule	soja - <i>Glycine max</i> (L.)Merr.; crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> (L.)	daidzein, genistein, formononetin, biochanin A	divlji jam ( <i>Dioscorea villosa</i> ) ekstrakt suhog korijena sadrži 16% diosgenina (60 mg) 375 mg,suhi ekstrakt soje ( <i>Soya hispida</i> ) sadrži 40% izoflavona (34,5 mg) 86 mg, suhi ekstrakt crvene djeteline ( <i>Trifolium pratense</i> ) sadrži 8% izoflavona (6 mg) 75 mg, ekstrakt gloja ( <i>Crataegus oxyacantha</i> ) 60 mg, cink glukonat 11,25 mg, vitamin B6 hidroklorid 2 mg
PhytoEstro gen one daily	Solaray, Utah, SAD	želatinsk e kapsule	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	daidzein, genistein	ukupni ugljikohidrati 2 Gm, dijetetska vlakna 2 Gm, ne-gmo soja ( <i>Glycine max</i> ) (ekstrakt ploda) (garantirano 60 mg {3%} Izoflavona) 2 Gm, divlji jam ( <i>Dioscorea composita</i> ) (korijen) (garantirano 7,4 mg {3,7%} diosgenina) 200 mg, ( <i>Cimicifuga Racemosa</i> ) (korijen)(garantirano sadrži 27- deoksiaktein) 40 mg, kineska anđelika ( <i>Angelica Sinensis</i> ) (korijen) 40 mg

Red Clover Blossom	Solaray,Utah, SAD	želatinske kapsule	crvena djetelina - <i>Trifolium pratense</i> (L.)	daidzein, genistein, formononetin, biokanin A	crvena djetelina ( <i>Trifolium Pratense</i> ) (pupoljci) 375 mg
Soy Flavon®	Dietpharm, Rakitje, Hrvatska	kapsule	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	daidzein, genistein	Novasoy® suhi ekstrakt soje ( <i>Glycine max</i> ) 41 mg sadrži 16 mg izoflavona, vitamin E (DL-alfa-tokoferol-acetat) 6,3 mg $\alpha$ -TE
Sojini Izoflavoni	NBTY group, New York, SAD	kapsule	soja - <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	daidzein, genistein	750 mg ne GMO koncentrata soje (izdanci ploda) s 3% izoflavona i 3% saponina: daidzin & daidzein 12 mg, glicitin & glicitein 7 mg, genistin & genistein 2,5 mg ukupni ugljikohidrati 1g, dijetetska vlakna 1g, vitamin A (Dunaliella Salina) kao prirodni beta karoten 5000 IU, Vitamin C (kao askorbinska kiselina) 250 mg, Vitamin D (kao kolekalciferol) 400 IU, Vitamin E (kao prirodni izvor D-Alfa Tokoferil Sukcinat) 200 IU, tiamin (kao Tiamin HCl) 50 mg, vVitamin B2 (kao Riboflavin) 50 mg, vitamin B3 (25 mg [50%] kao niacin i 25 mg [50%] kao Niacinamid) 50 mg, folna kiselina 400 mcg, vitamin B12 (kao Cijanokobalamin) 200 mcg, biotin 300 mcg, pantotenska kiselina 100 mg, kalcij (kao kalcij karbonat) 150 mg, željezo 18 mg, jod (iz Kelpa) (kao kalij jodid) 150 mcg, magnezij (kao magnezij oksid) 75 mg, cink 15 mg, selen (kao l-selenometionin) 25 mcg, bakar 1 mg, mangan 2 mg, krom (kao krom arginat) 25 mcg, molibden 25 mcg, kalij 50 mg, PABA (kao para-aminobenzojeva kiselina) 50 mg, kolin bitartat 50 mg, inozitol 50 mg, hesperidin koncentrat (iz citrus ploda) 25 mg, rutin koncentrat 25 mg, betain HCl 25 mg, konopljika ( <i>Vitex Angus Castus</i> ) (plod) 50 mg, p čelinji polen 50 mg, Eleuthero ( <i>Elutherococcus Senticosus</i> ) (korijen) 50 mg, Damiana ( <i>Tumera Diffusa</i> ) (list) 25 mg, ekstrakt ružmarina ( <i>Rosmariuns Officinalis</i> ) (list) 25 mg, kineska anđelika ( <i>Angelica Sinensis</i> ) (korijen) 25 mg, koncentrat matične mliječi 3,5X (ekvivalentno 52.5mg svježe matične mliječi) 15 mg, bioflavonoid koncentrat 25 mg, ekstrakt francuskog crnog vina (sadrži 12,5mg [50%] polifenola & proantocijanidina i 1,25mg [5%] trans-resveratrola) 25 mg, ekstrakt zelenog čaja ( <i>camellia sinensis</i> ) (list) (sadrži 24,5mg [98%] polifenola, 20 mg [80%] katehina i 12,5mg [50%] egcg) 25 mg, alfa lipoična kiselina 10 mg, CoQ10 (kao koenzim q-10) 10 mg, brusnica ( <i>vaccinium macrocarpon</i> ) (plod) 10 mg, silica (kao bamboo [ <i>bambusa vulgaris</i> ]) (ekstrakt stabljike) 5 mg, actisorb™ baza (bioperin™ [ekstrakt crnog papra], ekstrakt korijena đumbira, ekstrakt lista ružmarina, ekstrakt korijena kurkume i ekstrakt paprike) 10 mg
Vitality for Women	Kal, California, SAD	tablete	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	apigenin, kasticin	
Vitex	Solaray, Utah, SAD	želatinske kapsule	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	apigenin, kasticin	konopljika ( <i>Vitex agnus castus</i> ) plod 400 mg
Vitex Solutio	Specchiasol s.r.l, Bussolengo, Italija	etanolni ekstrakt	konopljika - <i>Vitex agnus-castus</i> (L.)	apigenin, kasticin	vodenoalkoholni ekstrakt konopljike ( <i>Vitex agnus castus</i> L.) plod

## 9. ŽIVOTOPIS

Tajana Buhač rođena je 20. srpnja 1977. u Zagrebu gdje je završila osnovni i srednju školu. Studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu upisuje 1998. godine.

Diplomirala je 2002. godine, odradila je staž te 2003. položila stručni ispit za magistru farmacije pri Ministarstvu zdravstva Republike Hrvatske.

Poslijediplomski specijalistički studij „Fitofarmacija s dijetoterapijom” upisuje 2011. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu, koji uspješno završava 2012.

Iste godine upisuje doktorski studij farmaceutskih znanosti na istom fakultetu. Član je Hrvatske ljekarničke komore te Hrvatskoga farmaceutskog društva.

Dobitnica je Diplome Hrvatskog farmaceutskog društva za aktivnosti u stručnom radu u farmaciji.

Objavljeni znanstveni radovi citirani u bazi Current Contents:

1. Mornar, Ana; **Buhač, Tajana**; Amidžić Klarić, Daniela; Klarić, Ilija; Sertić, Miranda; Nigović, Biljana  
Multi-targeted Screening of Phytoestrogens in Food, Raw Material, and Dietary Supplements by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. // Food Analytical Methods, 13 (2020), 2: 482–495.
2. **Buhač, Tajana**; Amidžić Klarić, Daniela; Klarić, Ilija; Nigović, Biljana; Brusac, Edvin; Jeličić, Mario-Livio; Mornar, Ana  
Assessment of active ingredients and metal impurities in phytoestrogen-containing food and dietary supplements. // Journal of food and nutrition research, 59 (2020), 2: 87–97.

Stručni radovi:

1. Sertić, Miranda; **Buhač, Tajana**; Gašpar, Kristina  
Peludne alergije. // Farmaceutski glasnik : glasilo Hrvatskoga farmaceutskog društva, 68 (2012), 7–8: 467–482.
2. Sertić, Miranda; **Buhač, Tajana**; Gašpar, Kristina  
Prehlada i gripa - simptomi, prevencija i liječenje. // Farmaceutski glasnik : glasilo Hrvatskoga farmaceutskog društva, 68 (2012), 1: 17–30

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

### NOVE METODE U ANALITICI DODATAKA PREHRANI ZA UBLAŽAVANJE SIMPTOMA MENOPAUZE

**Tajana Buhač**

Menopauza, odnosno klimakterij, sastavni je dio procesa starenja svake žene. S obzirom na sve učestaliju primjenu dodataka prehrani koji sadržavaju fitoestrogene te sve veći broj prisutnih proizvoda na tržištu, raste i interes znanstvene zajednice za ove proizvode. Rastuću uporabu dodataka prehrani koji sadrže fitoestrogene prati i otkrivanje novih biljnih vrsta koje sadrže spomenute biološki aktivne tvari. S obzirom na navedeno, jasna je potreba za razvojem novih analitičkih metoda za određivanje i aktivnih i štetnih tvari u sirovinama koje se koriste u proizvodnji te u gotovim komercijalno dostupnim proizvodima.

Ovaj je rad obuhvatio ispitivanja uzoraka hrane, biljnog industrijskog materijala te gotovih proizvoda koji sadržavaju soju i crvenu djetelinu, kao predstavnike dobro poznatih biljnih vrsta koje sadržavaju fitoestrogene te hmelja, konopljike i lana, kao predstavnike novije generacije biljnih vrsta koje sadržavaju fitoestrogene.

Glavni je cilj ovog rada razviti nove, pouzdane analitičke metode namijenjene identifikaciji i određivanju sadržaja aktivnih tvari u sirovinama i dodatcima prehrani koji se koriste u ublažavanju simptoma menopauze. U radu su korištene napredne analitičke tehnike: masena spektrometrija s neposrednim unosom uzorka u sustav (engl. *Direct Injection Mass Spectrometry*, DI-MS<sup>n</sup>) te vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije (engl. *Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS). Identifikacija deset biološki aktivnih tvari provedena je primjenom DI-MS<sup>n</sup> tehnike, dok je istodobno određivanje jedanaest biološki aktivnih tvari osigurano primjenom LC-MS/MS tehnike. Nadalje, uz navedene tehnike u radu je korištena i UV/VIS spektrofotometrija. Folin–Ciocalteu metoda primijenjena je za određivanje sadržaja ukupnih polifenola dok je antioksidacijski učinak ispitan primjenom DPPH, ABTS i RPA metoda.

Analizom ispitanih uzoraka utvrđene su velike razlike u sadržaju bioloških aktivnih tvari između uzorka te su kod pojedinih uzoraka nađene i razlike u sadržaju bioloških aktivnih tvari između različitih proizvodnih serija.

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

Rad sadrži: 98 stranica, 9 slika, 23 tablica i 103 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: menopauza, analitička metoda, hrana, biljni industrijski materijal, dodatak prehrani, DI-MS<sup>n</sup>, LC-MS/MS, antioksidacijski test

Mentor: **dr.sc. Ana Mornar Turk**, *red.prof.*

Ocjenjivači: **dr.sc. Biljana Nigović**, *red.prof.*

**dr.sc. Željko Maleš**, *red.prof.*

**dr.sc. Josipa Cvek**

Rad prihvaćen:



## BASIC DOCUMENTARY CARD

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

### NEW ANALYTICAL METHODS FOR DIETARY SUPPLEMENTS USED TO TREAT MENOPAUSAL SYMPTOMS

**Tajana Buhač**

Menopause is an integral part of every woman's aging process. Given the increasing use of phytoestrogen-containing dietary supplements and the growing number of products available on the market, the interest of the scientific community for these products is growing. Moreover, the growing interest is accompanied by the research of new plant species that contain these biologically active substances. In the light of the above mentioned, new analytical methods for the determination of both active and toxic substances in raw materials and finished products are essential.

This work includes analysis of food samples, dietary supplement raw materials and dietary supplements containing soybean and red clover, as representatives of the well-known species containing phytoestrogens and hops, chaste tree and flax, as representatives of the new generation of species containing phytoestrogens.

The main goal of this thesis was to develop new, reliable analytical methods for the identification and determination of active substances in raw material and finished dietary supplement products used in the alleviation of menopausal symptoms. For this purpose, sophisticated analytical techniques were used: Direct Injection Mass Spectrometry (DI-MS<sup>n</sup>) and Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). Identification of ten biologically active substances was performed using the DI-MS<sup>n</sup> technique, while the simultaneous determination of eleven biologically active substances will be achieved using the LC-MS/MS technique. Furthermore, UV/VIS spectrometry was used in this work. Folin–Ciocalteu method was applied for determination of total polyphenol content, while antioxidant efficacy was evaluated using DPPH, ABTS and RPA methods.

According to our results high variability in biologically active compound content was found among investigated products as well as high batch-to-batch variability for several products.

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

The thesis includes: 98 pages, 9 figures, 23 tables and 103 references; original in Croatian

Key words: menopause, analytical method, food, dietary supplement raw material, dietary supplement, DI-MS<sup>n</sup>, LC-MS/MS, antioxidant test

Mentor: **Ana Mornar Turk, Ph.D.**, *Full Professor*

Reviewers: **Biljana Nigović, Ph.D.**, *Full Professor*

**Željko Maleš, Ph.D.**, *Full Professor*

**Josipa Cvek, Ph.D.**

The thesis accepted: