

# Razvoj i validacija metode za kvantifikaciju biološki aktivnih tvari UHPLC tehnikom

---

**Topalović, Ines**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:561529>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Ines Topalović**

**Razvoj i validacija metode za kvantifikaciju biološki aktivnih  
tvari UHPLC tehnikom**

**DIPLOMSKI RAD**

**Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić**

**Članovi ispitne komisije: prof. dr. sc. Sandra Babić**

**prof. dr. sc. Irena Škorić**

**dr. sc. Martina Biošić**

**Zagreb, srpanj 2019.**

*Ovaj rad izrađen je u tvrtki PLIVA Hrvatska d.o.o. na odjelu TAPI, R&D,  
Analitika pod stručnim vodstvom Kornelije Lasić, mag. pharm.*

## **Zahvale**

*Mnogi su oni kojima bih voljela zahvaliti, ali vjerojatno bi zahvale bile duže od cijeloga rada. Mnogi su bili uz mene na dosadašnjem putu, hrabрили me, pomagali mi, usmjeravali me, odgajali, podizali, voljeli. Svima od srca hvala, iako neću moći sve napisati.*

*Prije svega, zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Sandri Babić, na njejoj otvorenosti za rad tijekom cijelog mog studija, ažurnosti, trudu, podršci i u drugim projektima, savjetima koje mi je dala te razumijevanju za sve moje aktivnosti,*

*Veliko hvala i mojoj mentorici u PLIVI, mag. pharm. Korneliji Lasić, koja mi je dala priliku za suradnju i zaista me mnogo naučila. Hvala joj što vjeruje u mene i što se uvijek raduje ne samo mojim, nego i uspjesima cijelog tima. A posebna hvala i cijelom timu KL (Andrea, Irena, Iva, Ana, Paula, Valnea, Martin) koji je skupa sa mnom prolazio kroz ovo istraživanje. Hvala Andrei koja mi je bila i serviser i asistent i "rame za plakanje" kad su instrumenti bili neposlušni.*

*Posebno želim zahvaliti dr. sc. Martini Biošić koja me na drugoj godini studija uvela u predivni svijet istraživanja, dala priliku da samostalno radim i često griješim, ali mnogo naučim. Ona je ta koja je gusjenicu pretvorila u leptira koji je kasnije nastavio stvarati. Sve sate provedene u laboratoriju ne bih mijenjala i zauvijek ću pamtiti naše "cyjetiće".*

*Velika hvala svim mojim kolegama, svima s kojima sam prolazila kroz studentske dane. Posebice hvala Dorini, Lani, Mateju (Zlaji) i Filipu (Petricu) bez kojih kava nikad neće biti ista.*

*Hvala i mojim kolegama i dragim prijateljima iz Studentske sekcije HDKI-ja, svim sadašnjim i bivšim članovima, na zaista životnom iskustvu, predivnom druženju i zajedničkom radu. Zahvalna sam na svakoj osobi koju sam upoznala.*

*Iako među zadnjima, ali zapravo njima najveća hvala, a to su moji roditelji Dragica i Ante, moj brat Tomislav, moje tetke Ankica, Mara, Danica, ujak Josip, tetak Zvonko, Nela i Luka, Paula (Ljuba, Nidžo, Stipe)...moja obitelj bez koje ne bih dogurala do ovdje gdje sam danas. Hvala im za sve.*

*Hvala mom Tomi, mom teammateu i najboljem prijatelju, svoj radosti...na svemu...Dovoljno je samo reći: priceless.*

*Na kraju, hvala dragome Bogu na daru života, svima gore navedenima, a posebice onima koji nisu stali na ovaj papir.*

## SAŽETAK

Prirodni spojevi koji najčešće nemaju nutritivnu vrijednost, ali utječu na zdravlje, nazivaju se biološki aktivne tvari. U središtu ovoga istraživanja bili su fitoestrogeni (daidzin, daidzein, genistin, genistein, ononin, sisotrin, formononetin i biohanin A), biološki aktivne tvari sličnih strukturnih i/ili funkcionalnih svojstava kao ženski spolni hormoni estrogene. Fitoestrogeni se najčešće ekstrahiraju iz soje i livadne djeteline, a na tržištu se mogu naći u obliku dodataka za prehranu koji se koriste za menopauzalne tegobe. Cilj ovoga rada bio je razviti i validirati metodu za kvantifikaciju ranije navedenih osam molekula fitoestrogena UHPLC tehnikom. UHPLC tehnika korištena je kako bi se postiglo kraće vrijeme trajanja analize. Za razvoj metode korišten je eksperimentalni dizajn kako bi se skratilo vrijeme razvoja, uštedile kemikalije te pronašli najbolji uvjeti za razdvajanje. Validacijom metode potvrđeno je da je dobivena metoda prihvatljiva za određivanje ranije navedenih molekula fitoestrogena jer su sve ispitivane izvedbene značajke unutar granica prihvatljivosti. Dodatno je provedena i analiza sedamnaest komercijalnih uzoraka, dodataka prehrani u kojima je određen sadržaj fitoestrogena te su dobiveni rezultati uspoređeni s deklaracijama koje navode proizvođači kako bi se ispitala njihova ispravnost.

**Ključne riječi:** *biološki aktivne tvari, fitoestrogeni, eksperimentalni dizajn, validacija, UHPLC*

## **ABSTRACT**

Natural compounds that usually do not have nutritional value but somehow affect human health are called biologically active compounds. At the center of this study were phytoestrogens (daidzin, daidzein, genistin, genistein, ononin, sissotrin, formononetin, biochanin A), biologically active compounds of similar structural and/or functional properties as female sex hormones estrogens. Phytoestrogens are most often extracted from soy and meadow clover and can be found on the market in the form of dietary supplements used for menopausal symptoms. The aim of this paper was to develop and validate the UHPLC method for quantitative determination of the eight previously mentioned phytoestrogens. UHPLC technique was used to achieve a shorter duration of the analysis. The experimental design was used to shorten method development time, save chemicals, and find the best separation conditions. The validation of the method confirmed that the obtained method was acceptable for the determination of previously mentioned phytoestrogen molecules as all tested performance features were within the limits of acceptability. Additionally, an analysis of seventeen commercial samples (dietary supplements) was carried out in which the content of phytoestrogen was determined. The results were compared with the declarations cited by the manufacturers to ascertain their correctness.

**Keywords:** *biologically active compounds, phytoestrogens, experimental design, validation, UHPLC*

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Biološki aktivne tvari.....	2
2.2. Kromatografija.....	14
2.3. Validacija.....	22
2.4. Eksperimentalni dizajn.....	25
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	27
3.1. Materijali.....	27
3.2. Instrumenti .....	31
3.3. Metode rada.....	33
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	38
4.1. Razvoj analitičke metode.....	38
4.2. Eksperimentalni dizajn.....	43
4.3. Validacija metode .....	45
4.4. Analiza komercijalnih uzoraka .....	52
5. ZAKLJUČAK.....	55
6. LITERATURA.....	58
ŽIVOTOPIS.....	62
PRILOZI.....	64

## 1. UVOD

Fitoestrogeni su biološki aktivne tvari, odnosno prirodni, biljni spojevi poznati po tome što njihovi aktivni metaboliti imaju slična strukturalna i/ili funkcionalna svojstva kao i estrogeni, ženski spolni hormoni. Najčešće se mogu naći u mahunarkama, sjemenu, korijenu, bobicama i cvjetovima biljaka. U središtu ovoga istraživanja bilo je osam molekula fitoestrogena: genistin, daidzin, ononin, sisotrin, daidzein, genistein, formononetin i biohanin A. Oni pripadaju izoflavonima, podskupini fitoestrogena. Pozitivno djelovanje fitoestrogena koje se najčešće ističe je upravo ono kod teškoća u menopauzi kod žena, zatim djelovanje fitoestrogena na srce, kosti kod osteoporoze i njihovo antikancerogeno djelovanje. Najčešća mana fitoestrogena koja se ističe jest njihovo narušavanje endokrinog sustava. Stoga su fitoestrogeni već dulji niz godina predmet mnogih rasprava. Ono što je potvrđeno jest da postoji razlika između osoba koje konzumiraju prehranu s više ili manje fitoestrogena. Tako, primjerice, žene na istoku koje jedu više povrća ili čak preferiraju veganski način prehrane, imaju drugačije menopauzalne tegobe od žena sa zapada koje su više mesožderi sa znatno manjim udjelom povrća u svojoj prehrani. Stoga se danas na tržištu fitoestrogeni u velikoj mjeri nalaze u obliku dodataka za prehranu koji se koriste upravo za menopauzalne tegobe ili pak osteoporozi. Problem dodataka za prehranu je taj što se ne kontroliraju dovoljno. Nisu hrana niti lijek, stoga ne prolaze toliko zahtjevne provjere. Zato je bilo važno razviti i validirati metodu koja bi mogla kvantitativno odrediti koliko pojedinih molekula fitoestrogena zaista ima u određenom dodatku za prehranu, premda su deklaracije često oskudne i ne prikazuju pravi sadržaj.



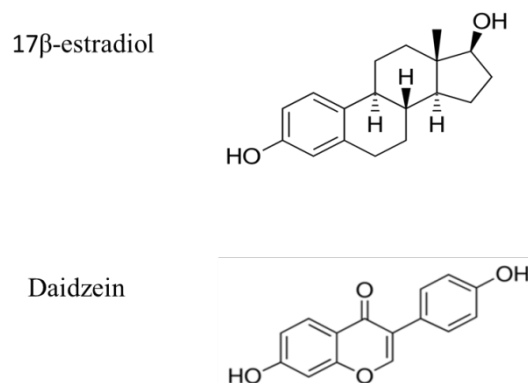
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Biološki aktivne tvari

Priroda je oduvijek bila i jest i danas izvor inspiracije, kako u umjetnosti, tako i u znanosti, razvoju novih tehnologija, a posebice u liječenju i razvoju novih lijekova. Čovjek ne samo da se trudio imitirajući prirodu napraviti nešto što bi mu olakšalo život, primjerice avion, nego je pokušavao i izvući, ekstrahirati iz nje ono najbolje. Kako je rastao u spoznaji o biljnom i životinjskom svijetu, uvidio je da mu oni mogu biti i lijek i hrana i izvor svega onoga što njegovom tijelu nedostaje. Tako su otkrivene i mnoge biološki aktivne tvari, prirodni spojevi koji najčešće nemaju nutritivnu vrijednost, ali na određen način utječu na zdravlje. Hoće li njihov učinak biti pozitivan ili negativan, ovisi o svojstvima i količini tvari koja se unese u organizam te njenoj bioraspodivnosti. Biološki aktivne tvari mogu se podijeliti prema kemijskom sastavu, porijeklu, funkciji djelovanja na određene organe i tkiva u organizmu te prema formi ili farmaceutskom obliku ako se konzumiraju kao dodaci prehrani. No, najčešća podjela je na nutritivne i nenutritivne biološki aktivne tvari. Nutritivnima pripadaju vitamini, minerali, aminokiseline, masne kiseline, ugljikohidrati, a od nenutritivnih najznačajniji su klorofil, izotiocijanati, fitoestrogeni, alkaloidi, steroli i karoteonoidi [1]. Predmet istraživanja u ovome radu bile su nenutritivne biološki aktivne tvari, konkretno fitoestrogeni.

#### 2.1.1. Fitoestrogeni

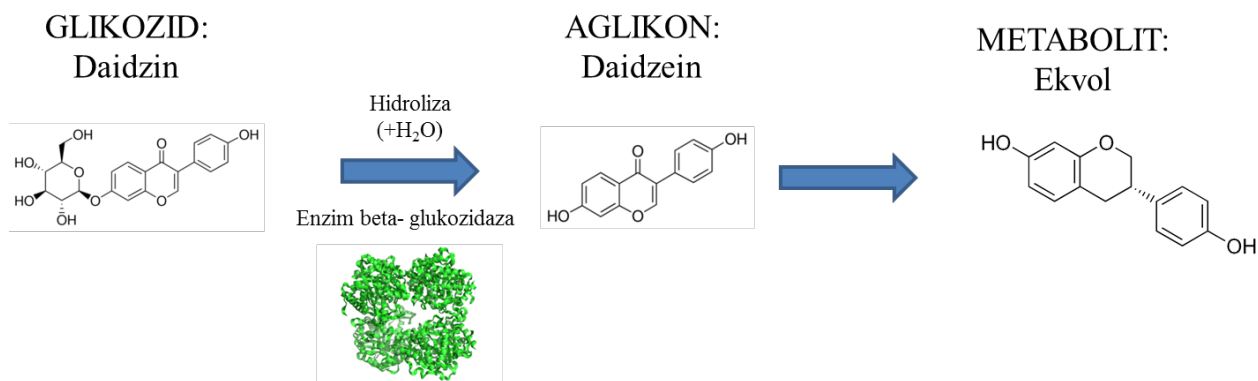
Fitoestrogeni su biološki aktivne tvari, odnosno prirodni, nesteroidni biljni spojevi koji se mogu naći u mahunarkama, sjemenu, korijenu, bobicama i cvjetovima biljaka. Oni štite biljke od različitih mikroorganizama i gljivica. No, najpoznatiji su po tome što njihovi aktivni i metaboliti imaju slična strukturalna i/ili funkcionalna svojstva kao i estrogeni, ženski spolni hormoni, konkretno  $17\beta$ -estradiol (slika 1) [2].



**Slika 1.** Usporedba strukture estrogena  $17\beta$ -estradiola i fitoestrogena daidzeina

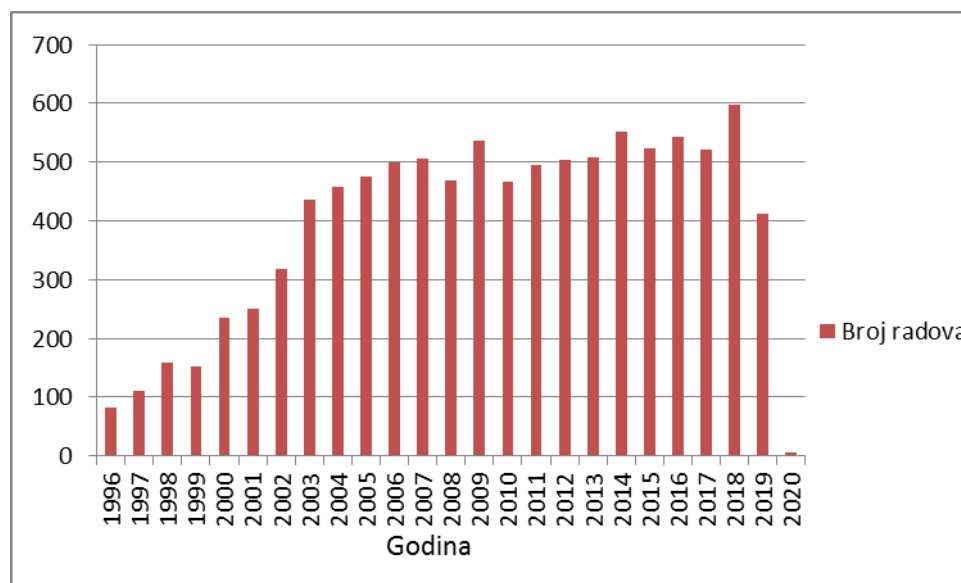
Do pronalaska i pomnijeg istraživanja fitoestrogena, došlo je zbog toga što se već stoljećima uviđaju razlike u zdravlju ljudi koji žive na različitim krajevima svijeta. Ljudi s istoka i zapada drugačije se nose s istim bolestima, s istim životnim fazama, konkretno, velika se razlika vidi u tome kako žene s istoka, odnosno zapada proživljavaju menopauzu. Dok su za žene na istoku karakterističnije češće glavobolje i bolovi u donjem dijelu kralježnice, žene na zapadu proživljavaju velike navale vrućine i noćna znojenja. Nakon brojnih istraživanja, znanstvenici su shvatili da ta razlika jednim dijelom proizlazi iz prehrane i načina života koji je svakako drugačiji ovisno o strani svijeta i kulturi u kojoj se nalazite. Ljudi s istočnog dijela svijeta, konkretno iz Azije, jedu više povrća (soja, sojini proizvodi), često je zastupljen veganski način prehrane, dok na zapadu preferiraju žitarice i meso, uz manje povrća. To je dovelo do zaključka da ljudi s istoka unose u organizam znatno više fitoestrogena i to do 30 puta više nego ljudi na zapadu.

Fitoestrogeni se dijele na lignane i izoflavonoide, koji se dalje dijele na izoflavone i kumestane. Predmet istraživanja ovoga rada su upravo izoflavoni: genistin, daidzin, ononin, sisotrin, daidzein, genistein, formononetin i biohanin A. Najpoznatiji izoflavoni su genistein i daidzein. Genistein je prvi put izoliran iz soje 1899., a 1928. godine je kemijski sintetiziran [2]. Najveći izvor izoflavona su soja (lat. *Glycine max L.*), crvena djetelina (lat. *Trifolium pretense L.*) i bijela djetelina (lat. *Trifolium repens L.*) [3]. Izoflavoni se u prirodi nalaze u obliku glikozida (daidzin, genistin, ononin, sisotrin), a u fermentiranoj hrani u obliku aglikona (daidzein, genistein, formononetin, biohanin A). Nakon što se unesu u organizam, glikozidi se transformiraju u aglikone ili "slobodne izoflavone" tijekom hidrolize djelovanjem enzima beta glukozidaze iz bakterija koje se nalaze u probavnom traktu. Za razliku od glikozida koji prolaze proces transformacije, aglikoni se odmah apsorbiraju iz želuca i tankog crijeva. Istraživanja tvrde da aglikoni imaju veću bioraspoloživost od glikozida jer ne ovise o crijevnoj flori [2]. Aglikon je nešećerni spoj koji ostane nakon što se glikozidna skupina u glikozidu zamijeni atomom vodika i dalje se može transformirati u metabolit ekvol (slika 2), ali za to je potreban specifičan probavni mikrob koji posjeduje 30-50 % svjetske populacije, većinom azijskog podrijetla [4, 5].



**Slika 2.** Proces transformacije od početnog glikozidnog konjugata preko aglikona do metabolita ekvola

Ono po čemu su fitoestrogeni posebno zanimljivi je to što imaju slična funkcionalna svojstva kao ženski spolni hormoni estrogene te vrše estrogenski efekt na središnji živčani i spolni sustav žena, ali i muškaraca, potiču rast spolnog trakta i mliječnih žlijezda kod žena. Fitoestrogeni se vežu na estrogenske receptore, oponašajući 17β-estradiol i mogu se ponašati kao agonisti, djelomični agonisti ili antagonisti, što znači da su fiziološki povezani s ostalim tvarima u tijelu i sudjeluju u određenim procesima. Njihovo sudjelovanje može biti loše ako počnu izazivati metaboličke efekte koji nisu karakteristični za estrogenske receptore [3]. Stoga su fitoestrogeni postali izrazito značajan predmet istraživanja, što potvrđuje i količina radova koji se godišnje objavljuju, pokušavajući istaknuti sve dobre i loše strane fitoestrogena (slika 3).

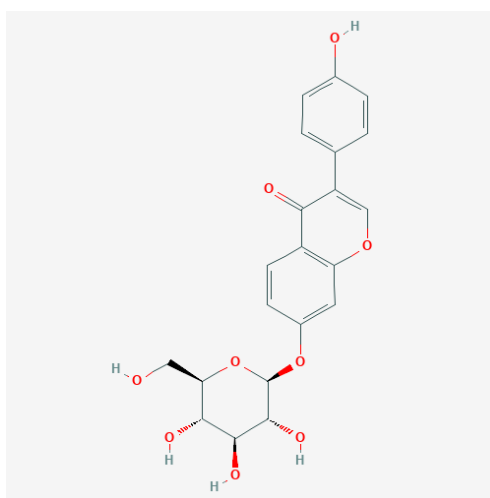


**Slika 3.** Broj objavljenih radova na temu fitoestrogena prema podacima iz baze ScienceDirect [6]

Pozitivno djelovanje fitoestrogena koje se najčešće ističe je upravo ono kod teškoća u menopauzi kod žena, zatim djelovanje fitoestrogena na srce, kosti kod osteoporoze i njihovo antikancerogeno djelovanje. I dalje te tvrdnje znanstvenici potkrepljuju dokazima da drugačiji način prehrane znatno utječe na proživljavanje određenih zdravstvenih tegoba. Primjerice, 25 grama soje smanjuje intenzitet menopauzalnih tegoba, dok veći unos od 50-60 grama dnevno smanjuje učestalost simptoma na 40 %. Nakon menopauze, zbog nedostatka estrogena, česta su i srčana oboljenja, ali prema epidemiološkim podacima, žene koje unose veće količine fitoestrogena rjeđe obole. Jedno od objašnjenja je da hrana na bazi soje sadrži manje kolesterola, stoga je manja mogućnost za pojavu ateroskleroze. Također, povećano konzumiranje hrane na bazi soje koja ima proestrogensko djelovanje, dovodi do smanjenja učestalosti osteoporoze i lomova vrata bedrene kosti, što je dokazano u jugoistočnoj Aziji. Osim toga, smanjena je i učestalost karcinoma dojke i maternice kod žena i karcinoma prostate kod muškaraca koji unose dovoljno fitoestrogena. Mehanizmi djelovanja fitoestrogena na tumorske stanice još nisu dovoljno istraženi, no, ono što se zna jest da određeni izoflavoni povećavaju samoubojstvo stanica, uspoređuju nastanak novih krvnih žila potrebnih za rast karcinoma, smanjuju nastanak slobodnih radikala kisika i aktivaciju pločastih stanica [2]. Najčešća mana fitoestrogena koja se ističe jest njihovo narušavanje endokrinog sustava. Sličnih su molekularnih i staničnih svojstava kao što ih ima sintetski proizveden spoj bisfenol A, spoj za koji je poznato da ometa rad endokrinog sustava jer oponaša hormone tijela i time narušava ljudsko zdravlje. Slično ponašanje fitoestrogena uočeno je 40-ih godina prošlog stoljeća kod ovaca koje su se hranile na pašnjacima bogatima djetelinom koja je jedan od najvećih izvora fitoestrogena. Kod tih ovaca uočen je porast neplodnosti, pobačaja te brojni poremećaji reproduktivnog sustava [5]. Mnogo je toga još nerazjašnjeno i zasigurno će fitoestrogeni još dugi niz godina biti predmet proučavanja u znanstvenim krugovima. Ono što je sigurno jest da hrana obogaćena fitoestrogenima nije nužno loša, samo ju valja konzumirati u određenim količinama. Također, važno je i iz kojeg se dijela biljke dobivaju ekstrakti i u kakvom se obliku nalaze na tržištu. Primjerice, odličan izvor izoflavona jest sojino zrno, protein, brašno i pahuljice, dok ih u sojinom ulju i umaku gotovo i nema [2]. Fitoestrogeni se danas na tržištu u velikoj mjeri nalaze i u obliku dodataka za prehranu od kojih su neki analizirani u ovome radu.

### 2.1.1.1. Daidzin

Daidzin (slika 4) je glikozidni konjugat aglikona daidzeina. Može se pronaći u lišću soje (lat. *Glycine max L.*), korijenu japanske biljke kudzu iz porodice mahunarki (lat. *Pueraria lobata*) te alfalfi (lat. *Medicago sativa*) [7, 8]. Poznat je po tome što je inhibitor ljudskog enzima, mitohondrijskog aldehida dehidrogenaze (ALDH-2) koji je poznat kao onaj koji "probavlja alkohol". Daidzin potiskuje unos etanola u organizam i zato se biljka kudzu, koja je bogata daidzinom, od davnina koristi u liječenju ovisnosti od alkohola. Mehanizam djelovanja i dalje se istražuje [9].



Slika 4. Struktura daidzina [10]

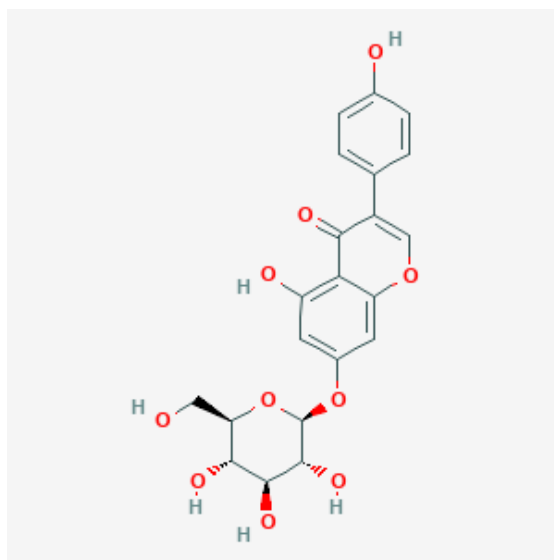
Fizikalno-kemijska svojstva daidzina prikazana su u tablici 1.

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva daidzina

Ime spoja	Daidzin
Vrsta spoja	Izoflavon
Molekulska formula [11]	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>
IUPAC ime [11]	3-(4-hidroksifenil)-7-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksikromen-4-on
CAS broj [11]	552-66-9
Molarna masa [11]	416,3781 g/mol
Topljivost u vodi [11]	0,661 mg/mL
Talište [10]	233-235 °C
p <i>K</i> <sub>k</sub> [11]	8,96

### 2.1.1.2. Genistin

Genistin (slika 5) je glikozid koji pripada skupini izoflavona. On je neaktivni analog aglikona genisteina, jednog od najvažnijih izoflavona. Inhibitor je enzima terminalne deoksinukleotidil transferaze (TdT) koji katalizira polimerizaciju deoksinukleotida na 3' kraju jedno- i dvolančane DNA [12, 13]. Genistin stimulira rast estrogeni ovisnih tumorskih stanica [12].



**Slika 5.** Struktura genistina [14]

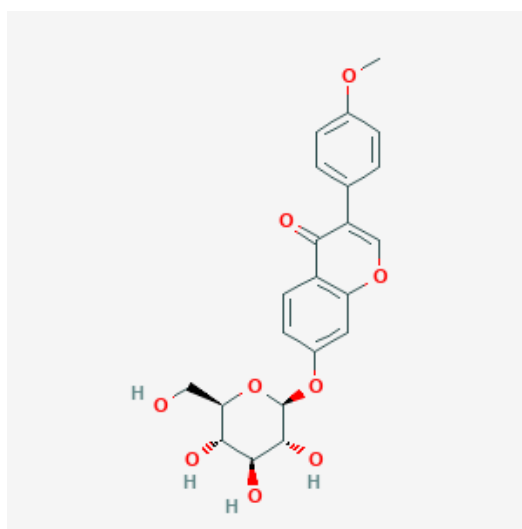
Fizikalno-kemijska svojstva genistina prikazana su u tablici 2.

**Tablica 2.** Fizikalno-kemijska svojstva genistina

Ime spoja	Genistin
Vrsta spoja	Izoflavon
Molekulska formula [14]	$C_{21}H_{20}O_{10}$
IUPAC ime [14]	5-hidroksi-3-(4-hidroksifenil)-7-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksikromen-4-on
CAS broj [14]	529-59-9
Molarna masa [14]	432,381 g/mol
Topljivost u vodi [15]	1,01 mg/mL
Talište [16]	254-256 °C
$pK_k$ [15]	8,36

### 2.1.1.3. Ononin

Ononin (slika 6) je izoflavon kojega se može pronaći u korijenju biljaka *Astragalus membranaceus* (Fischer) Bunge, smilax (lat. *Smilax scobinicaulis*), tuniški ononis (lat. *Ononis angustissima* L. (Fabaceae)) i stabiljci biljke *Millettia* (lat. *Millettia nitida* var. *hirsutissima*). Ovisno o količini ononina u sebi, ove biljke pokazuju protuupalno djelovanje, posebice *Astragalus membranaceus* [17]. Ononin je glikozidni konjugat aglikona formononetina.



Slika 6. Struktura ononina [18]

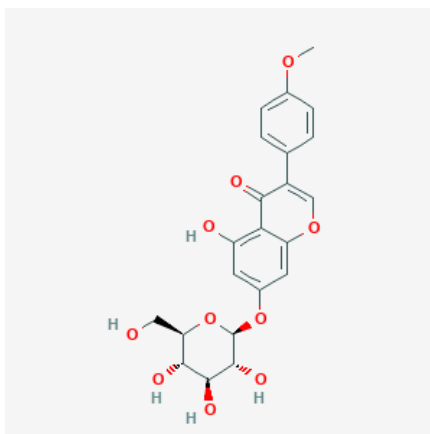
Fizikalno-kemijska svojstva ononina prikazana su u tablici 3.

Tablica 3. Fizikalno-kemijska svojstva ononina

Ime spoja	Ononin
Vrsta spoja	Izoflavon
Molekulska formula [19]	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>
IUPAC ime [19]	3-(4-metoksifenil)-7-{[3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksi}-4H-kromen-4-on
CAS broj [19]	486-62-4
Molarna masa [19]	430,4047 g/mol
Topljivost u vodi [19]	0,42 mg/mL
Talište [19]	218-219 °C
pK <sub>k</sub> [19]	12,2

#### 2.1.1.4. Sisotrin

Sisotrin (slika 7) je glikozidni konjugat biohanina A koji je pronađen u leblebiji, odnosno slanutku (lat. *Cicer arietinum*) [20]. Osim u slanutku, ima ga i u indijskom drvetu *Dalbergia sissoo*, poznatijem u Hrvatskoj kao palisandrovo drvo. *Dalbergia sissoo* se u Bangladešu koristi kao ljekovito bilje, posebice za liječenje krvnih oboljenja kao što je trombocitopenična purpura [21].



Slika 7. Struktura sisotrina [22]

Fizikalno-kemijska svojstva sisotrina prikazana su u tablici 4.

Tablica 4. Fizikalno-kemijska svojstva sisotrina

Ime spoja	Sisotrin
Vrsta spoja	Izoflavon
Molekulska formula [20]	$C_{22}H_{22}O_{10}$
IUPAC ime [20]	5-hidroksi-3-(4-metoksifenil)-7-{{[3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksi}-4H-kromen-4-on
CAS broj [20]	5928-26-7
Molarna masa [20]	446,4041 g/mol
Topljivost u vodi [20]	0,62 mg/mL
Talište [20]	223 – 224,5 °C
$pK_k$ [20]	8,48



### 2.1.1.5. Daidzein

Uz genistein, daidzein (slika 1) je jedan od najvažnijih izoflavona. On je aglikonski konjugat glikozida daidzina. Dominantan je izoflavon u brojnim prehrambenim namirnicama od soje, a njegova koncentracija u pojedinoj namirnici ovisi o procesu proizvodnje određenog proizvoda. Ima tri metabolita: dihidrodaidzein, ekvol i *O*-desmetilangolensin. Istraživanja su dokazala da konzumiranje hrane s većom koncentracijom daidzeina smanjuje rizik od oboljevanja od raka dojke za 34 %. Također, otkriven je da daidzein često ublažava štetno djelovanje genisteina [23].

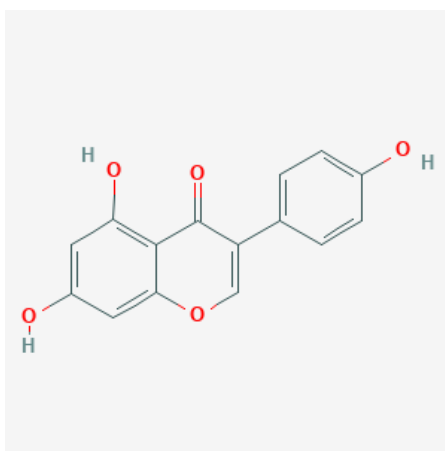
Fizikalno-kemijska svojstva daidzeina prikazana su u tablici 5.

**Tablica 5.** Fizikalno-kemijska svojstva daidzeina

Ime spoja	Daidzein
Vrsta spoja	Izoflavon
Molekulska formula [25]	$C_{15}H_{10}O_4$
IUPAC ime [25]	7-hidroksi-3-(4-hidroksifenil)-4H-kromen-4-on
CAS broj [25]	486-66-8
Molarna masa [25]	254,241 g/mol
Topljivost u vodi [25]	0,0849 mg/mL
Talište [24]	323 °C
$pK_k$ [25]	6,48

### 2.1.1.6. Genistein

Genistein (slika 8) je najistraživaniji izoflavon i aglikonski je konjugat glikozida genistina. Funkcije ugljika 4 i 7 fenolnog prstena na genisteinu slične su onima koje ima hidroksilna skupina na ženskom spolnom hormonu 17 $\beta$ -estradiolu. Zato se on i može vezati na estrogenske receptore u ljudskom organizmu i imitirati pravi estrogen. Te strukturne i funkcionalne sličnosti genisteina i 17 $\beta$ -estradiola razlog su zašto genistein ima potencijalno dobro djelovanje za vrijeme menopauze. Metabolit genisteina je ((-)-(S)-ekvol). On pokazuje potencijalno antikancerogeno djelovanje [26]. Genistein ima sposobnost smanjiti porast tjelesne težine, poboljšati toleranciju tijela na glukozu i razinu lipida u krvi [27].



**Slika 8.** Struktura genisteina [28]

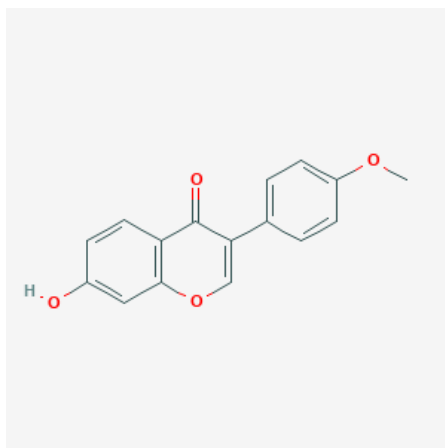
Fizikalno-kemijska svojstva genisteina prikazana su u tablici 6.

**Tablica 6.** Fizikalno-kemijska svojstva genisteina

Ime spoja	Genistein
Vrsta spoja	Izoflavon
Molekulska formula [29]	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
IUPAC ime [29]	5,7-dihidroksi-3-(4-hidroksifenil)-4H-kromen-4-on
CAS broj [29]	446-72-0
Molarna masa [29]	270,2369 g/mol
Topljivost u vodi [29]	0,123 mg/mL
Talište [29]	301,5 °C
pK <sub>k</sub> [29]	6,55

### 2.1.1.7. Formononetin

Formononetin (slika 9) je aglikonski konjugat glikozida ononina. Kao i njegov konjugat ononin, dobiva se iz biljke *Astragalus membranaceus* (Fischer) Bunge koja ima antitumorsko, antioksidativno i protuupalno djelovanje, pozitivno djeluje u liječenju dijabetesa i ateroskleroze. Kao jedna od glavnih komponenti ove biljke, formononetin je zaslužan za antitumorsko djelovanje, što je dokazano smanjenjem vijabilnosti stanica raka jajnika [30].



**Slika 9.** Struktura formononetina [31]

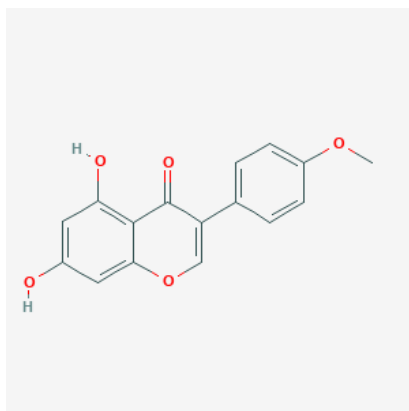
Fizikalno-kemijska svojstva formononetina prikazana su u tablici 7.

**Tablica 7.** Fizikalno-kemijska svojstva formononetina

Ime spoja	Formononetin
Vrsta spoja	Izoflavon
Molekulska formula [32]	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
IUPAC ime [31]	7-hidroksi-3-(4-metoksifenil)kromen-4-on
CAS broj [32]	485-72-3
Molarna masa [32]	268,268 g/mol
Topljivost u vodi [33]	0,04 mg/mL
Talište [31]	256,5 °C
pK <sub>k</sub> [33]	6,48

### 2.1.1.8. Biohanin A

Biohanin A (slika 10) se, kao i ostali fitoestrogeni, najviše nalazi u mahunarkama, konkretno u crvenoj livadnoj djetelini (lat. *Trifolium pratense*). Crvena djetelina je poznata po tome što ima protuupalno i sedativno djelovanje i koristi se protiv grčeva te za iskašljavanje. Osim u njoj, biohanina A ima i u kupusu, soji, kikirikiju i alfalfi. Biohanin A interferira sa signalom potrebnim za rast stanica tako što usporava rad proteina tirozin kinaze. To dovodi do smrti tumorskih stanica. Osim antitumorskog, biohanin A ima i antioksidativno, protuupalno, antialergijsko, antihiperглиkemijsko i razna druga povoljna djelovanja na ljudski organizam. Ono što ometa njegovu veću kliničku primjenu jest loša topljivost u vodi i mala bioraspoloživost [34].



**Slika 10.** Struktura biohanina A [35]

Fizikalno-kemijska svojstva biohanina A prikazana su u tablici 8.

**Tablica 8.** Fizikalno-kemijska svojstva biohanina A

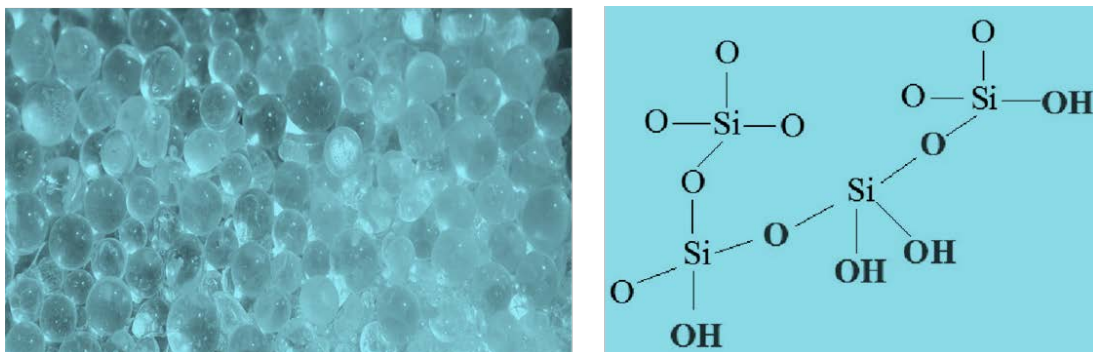
Ime spoja	Biohanin A
Vrsta spoja	Izoflavon
Molekulska formula [36]	$C_{16}H_{12}O_5$
IUPAC ime [35]	5,7-dihidroksi-3-(4-metoksifenil)kromen-4-on
CAS broj [36]	491-80-5
Molarna masa [36]	284,267 g/mol
Topljivost u vodi [37]	0,058 mg/mL
Talište [38]	210-213 °C
$pK_k$ [37]	6,55

## 2.2. Kromatografija

Kromatografija je zacijelo najpoznatija, najrasprostranjenija i najučinkovitija analitička separacijska tehnika. To je fizikalna metoda odjeljivanja komponenata smjese na temelju različite raspodjele između dviju faza (nepokretne i pokretne). Prvi kromatografski eksperiment opisao je ruski botaničar i biokemičar Mihail Semjonovič Cvet 1906. godine kada je razdvojio različito obojene pigmente iz biljnih ekstrakata. Za svoj eksperiment, koristio je staklenu kolonu napunjenu smrvljenim kalcijevim karbonatom i eter [39]. Ta staklena kolona predstavljala je ono što se u današnjem kromatografskom svijetu naziva "nepokretnom fazom", a eter je predstavljao "pokretnu fazu". Dakle, jedan kromatografski sustav čine nepokretna (stacionarna) faza, pokretna (mobilna) faza i ispitivani spoj. O izboru nepokretne i pokretne faze ovisi učinkovitost kromatografskog razdvajanja. Nepokretna faza mora biti takva da je zadržavanje molekula na njoj selektivno kako bi se moglo postići razdvajanje. Izbor nepokretne faze ovisi o prirodi analiziranog uzorka, prirodi ravnoteže kromatografskog procesa i vrsti veze koja nastaje između uzorka i kromatografske podloge. Nepokretna faza može biti čvrsta tvar ili kapljevina na inertnom nosaču, ali najčešće je to porozni zrnasti prah velike specifične površine. S obzirom na kemijsku strukturu i polarnost, nepokretna faza (sorbens) može biti:

1. polarni anorganski (hidrofilni) sorbens – silikagel, aluminijski oksid, magnezijev silikat
2. polarni organski sorbens – celuloza, hitin, poliamid
3. nepolarni anorganski sorbens – aktivni ugljen, grafit
4. polarna vezana faza – aminopropil, cijanopropil, diol
5. nepolarna vezana faza – alkani.

Sorbens koji se najviše upotrebljava jest silikagel, čija je opća formula  $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Silikagel je porozni materijal čija adsorpcijska moć ovisi o broju hidroksilnih skupina u strukturi (slika 11) [40].



**Slika 11.** Struktura silikagela

Hidroksilne skupine s molekulama vode stvaraju vodikove veze. Što se više molekula vode adsorbira na površinu silikagela, slabi njegova adsorpcijska moć. No, zagrijavanjem na temperaturu 100-110 °C može se regenerirati [41]. Silikagelne podloge mogu se modificirati uvođenjem pogodnih funkcionalnih skupina (kemijski način) ili fizikalnom impregnacijom sloja. Time se postiže šira primjena i mogućnost razdvajanja znatno većeg broja molekula. Ako hidroksilne skupine silikagela zamijenimo polarnim funkcionalnim skupinama (npr. cijanopropil, aminopropil) ili nepolarnim funkcionalnim skupinama (ugljikovodični lanci C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>), te funkcionalne skupine postaju adsorpcijska središta. Svojstva takvih kemijski vezanih faza ovise o vrsti i duljini ugljikovodičnih lanaca, pokrivenosti površine vezanom funkcionalnom skupinom, vrsti intermolekulskih interakcija organskog otapala i skupine na površini adsorbensa [40].

Ako se nepokretna faza nalazi gusto pakirana u kromatografskom stupcu, tada je riječ o kromatografiji na stupcu. Nepokretna faza može biti i nanosena kao homogeni film na inertnu podlogu i tada je riječ o plošnoj kromatografiji čije su predstavnice tankoslojna kromatografija i kromatografija na papiru. Kako bi se postiglo što bolje razdvajanje, osim pravilnog izbora nepokretne faze, bitan je izbor i pokretne faze. Izbor otapala ovisi o njegovoj moći eluiranja analita, što ovisi o viskoznosti, dielektričnoj konstanti te proton-akceptorskim/proton-donorskim svojstvima. Priroda veze koja nastaje unutar kromatografskog sustava, odnosno između analiziranog uzorka te nepokretne i pokretne faze, važan je faktor koji utječe na razdvajanje. Faktor razlučivanja (R<sub>s</sub>) mjera je djelotvornosti razdvajanja dviju kromatografskih krivulja.

Pokretna faza s obzirom na sposobnost tvorbe vodikove veze može biti [40]:

1. tekućina čije su molekule međusobno povezane vodikovim vezama – voda, glicerol, etilenglikol
2. tekućina čije su molekule povezane vodikovom vezom i koje mogu tvoriti vodikove veze s molekulama analiziranog uzorka – alkoholi, fenoli, amini
3. tekućina čije molekule sadrže atome kisika, koji mogu imati udjela u vodikovoj vezi, ali ne sadrže atome vodika – ketoni, eteri, esteri
4. tekućina čije molekule sadrže atom vodika, koji može stvarati vodikovu vezu, ali ne sadrže odgovarajuće atome koji bi mogli imati udjela u vezi – kloroform, diklormetan
5. ostale tekućine koje mogu tvoriti vodikovu vezu.

Tijekom kromatografske analize, ispitivani spoj nalazi se u ravnoteži između pokretne i nepokretne faze. Ravnotežno stanje se narušava zbog gibanja molekula u smjeru gibanja pokretne faze [40].

S obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze, kromatografija može biti [40]:

1. razdjelna – ravnoteža se uspostavlja između dvije kapljevine, a nepokretna faza je kapljevina vezana na inertni nosač
2. adsorpcijska – ravnoteža se uspostavlja između kapljevine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrstog adsorbensa, pri čemu se molekule analiziranog uzorka vežu na površinu adsorbensa
3. afinitetna – vezanje nastaje zbog specifičnih interakcija s funkcionalnim skupinama određenog prostornog rasporeda koje se nalaze na površini nepokretne faze
4. kromatografija isključenjem – razdvajanje se zbiva zbog razlike u molekulskoj masi i obujmu na nepokretnoj fazi slabih adsorpcijskih svojstava i porama definiranih dimenzija.

Prema sastavu pokretne faze, kromatografija može biti [40]:

1. plinska – pokretna faza je inertni plin
2. tekućinska – pokretna faza je kapljevina male viskoznosti
3. fluidna kromatografija u superkritičnim uvjetima – pokretna faza je tekućina iznad svoje kritične temperature i tlaka.

### 2.2.1. Tekućinska kromatografija

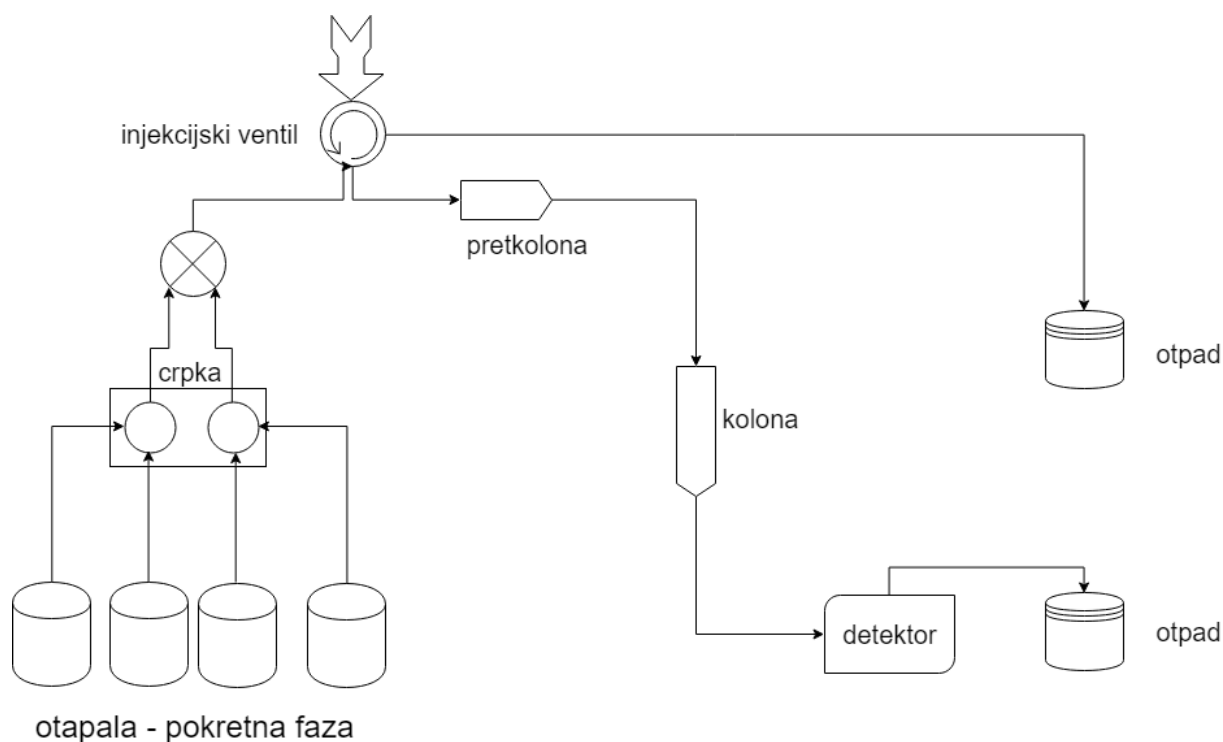
Kao što je prethodno navedeno, u tekućinskoj kromatografiji kao pokretna faza koristi se kapljevina male viskoznosti. Ovo je izrazito bitna kromatografska tehnika jer se oko 85 % spojeva ne može prevesti u plinovito stanje ili pak nije stabilno, što onemogućuje korištenje plinske kromatografije i njihovo razdvajanje u plinovitom obliku [39]. Također, tekućinska kromatografija pogodna je za razdvajanje smjesa niske hlapivosti. Tekućinska kromatografija može biti adsorpcijska (nepokretna faza je adsorbens) i razdjelna (nepokretna faza je kapljevima nanosena na čvrsti nosač). Ovisno o polarnosti pokretne i nepokretne faze, razlikujemo kromatografiju normalnih i obrnutih faza. Kod kromatografije normalnih faza, nepokretna faza je polarna, a pokretna nepolarna. Pri tome, razdvajanje ovisi o interakciji polarnog analita s polarnom nepokretnom fazom. Napolarni spojevi tada vrlo slabo reagiraju s nepokretnom fazom, a izomerni spojevi s istom funkcionalnom skupinom se ni ne mogu razdvojiti. U kromatografiji normalnih faza, najčešća nepokretna faza je silikagel, a pokretna faza organsko otapalo, kojem se može dodati voda ili elektrolit zbog podešavanja polarnosti. U kromatografiji obrnutih faza, nepokretna faza je nepolarna, a pokretna polarna pri čemu se razdvajanje sastojaka smjese temelji na hidrofobnosti analita. Ovdje je nepokretna faza silikagel modificiran amino, cijano, nitro skupinama. Pokretna faza u kromatografiji obrnutih faza jest smjesa vode i polarnog organskog otapala [40].

Tekućinska kromatografija zasniva se na upotrebi kolona relativno velikih promjera kroz koje pokretna faza prolazi samo pod utjecajem gravitacije ili pod povećanim tlakom. Brzina raspodjele molekula ispitivanog spoja između pokretne i nepokretne faze kontrolirana je difuzijom koja je kod tekućina sporija nego kod plinova. Stoga je klasična analiza znala trajati i satima dok nije razvijena tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high-performance liquid chromatography*). Njome je moguće znatno brže provesti analizu (mjereno u minutama), a razlog tome je primjena vrlo sitnih čestica nepokretne faze i visokih tlakova za prolazak pokretne faze kroz kolonu [39].

#### 2.2.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti zbog potrebe bržeg i djelotvornijeg razdvajanja primjenom visokih tlakova, prisutna je složena instrumentacija sastavljena od četiri osnovna dijela: sustav za opskrbu pokretnom fazom, dio za injektiranje uzorka, kolona i detektor (slika 12).





**Slika 12.** Shematski prikaz provedbe tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Postizanje visokih tlakova kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti omogućava crpka. Temperatura kromatografske kolone, također, može utjecati na brzinu eluiranja, ali duži rad kolone pri povišenim temperaturama znatno skraćuje vijek trajanja kolone. Ako se radi pri povišenim temperaturama, nužno je pokretnu fazu prije ulaska u detektor vratiti na sobnu temperaturu. Prije kolone nalazi se zaštitna kolona (pretkolona) koja se periodično zamjenjuje, kraća je od glavne kolone i sadrži isto punilo kao ona te služi za zaštitu glavne kolone od onečišćenja prisutnih u uzroku [39,42].

Nakon eluiranja, komponente koje izlaze iz kolone detektira detektor koji generira električni signal proporcionalan intenzitetu neke karakteristike pokretne faze ili tvari koja se eluira [43]. Detektori mogu pružiti kvalitativan i kvantitativan signal [39]. Uz signal koji proizvodi, najvažnije karakteristike detektora su šum, vremenska konstanta i volumen ćelije. Šum nastaje iz više nasumičnih signala koje detektor proizvodi u odsutnosti uzorka. U kromatografiji se to očituje kao bazna linija na kromatogramu koja se preklapa s kromatografskom krivuljom analita. Mjerne jedinice signala mogu biti milivolti, mikroamperi ili jedinice apsorbancije, što ovisi o detektoru. Vremenska konstanta ( $\tau$ ) mjera je brzine kojom detektor detektira određenu promjenu [44]. Vrste detektora koji se koriste u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti su: UV/Vis, fluorescencijski, elektrokemijski, detektor indeksa loma i spektrometar masa (MS). UV/Vis detektor može snimati jednu ili više odabranih valnih

duljina, odnosno cijeli spektar 190-800 nm. Vrlo dobri detektori su oni s nizom dioda (eng. *diode-array detector* (DAD)) koji omogućavaju snimanje eluiranog sastojka u UV/Vis dijelu spektra, a apsorbancija se mjeri u ovisnosti o vremenu zadržavanja i valnoj duljini. Oni se primjenjuju za analizu uzoraka u kojima spojevi imaju veliku razliku u apsorbanciji te kod uzoraka čije se kromatografske krivulje preklapaju, ali komponente u uzroku imaju različiti UV-spektar. Stoga, ova vrsta detektora služi i za identifikaciju komponenti prema UV-spektru. Jedini nedostatak ovog tipa detektora jest da je njegova rezolucija ograničena brojem dioda koje se nalaze u nizu.

Fluorescencijski detektor mjeri fluorescencijsku emisiju nakon pobuđivanja analita određenom valnom duljinom [42,43]. Granica detekcije ovakvog detektora je 0,001 ng [44]. Elektrokemijski detektori mjere struju koja teče između radne i pomoćne elektrode. Ta struja nastaje zato što se odijeljeni analiti oksidiraju ili reduciraju promjenom potencijala između radne i referentne elektrode. Detektor indeksa loma mjeri promjene u indeksu loma pokretne faze prolaskom analita uz granicu detekcije od 1000 ng.

Za strukturnu karakterizaciju onečišćenja često se koristi tekućinske kromatografija spregnuta sa spektrometrom masa (eng. *liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS)) gdje se analit detektira detektorom masa uz granicu detekcije od 0,01 ng. Danas je LC-MS tehnika posebice važna u području biotehnologije jer omogućava brzo razdvajanje uz visoku rezoluciju i identifikaciju velikih biomolekula [43,44].

#### 2.2.1.2. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (eng. *ultra-high performance liquid chromatography* (UHPLC)) predstavlja novi smjer razvoja tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) s ciljem postizanja veće brzine razdvajanja uz veću rezoluciju i osjetljivost. Samim time što analize znatno kraće traju, ova vrsta kromatografije je i ekološki prihvatljivija zbog smanjene potrošnje otapala. Kraće trajanja analize postignuto je smanjenjem čestica punjenja kolone s 3 – 10  $\mu\text{m}$  (karakteristično za HPLC kolone) na 1,7 – 1,8  $\mu\text{m}$  (karakteristično za UHPLC kolone). Osim toga, dok je HPLC ograničen na 400 bara, UHPLC tehnika postiže tlakove do 1000 bara [42]. Kritičan dio analize kod UHPLC tehnike je injektiranje uzorka. Konvencionalni injekcijski ventili nisu dizajnirani da rade pri visokim tlakovima kakve nalazimo kod UHPLC tehnike. Da bi se kolona zaštitila od ekstremnih promjena tlaka, injektiranje mora biti relativno brzo i bez pulsiranja [45]. Informacija o uspješnosti razdvajanja sadržana je u kromatogramu, zapisku koncentracijskog ili

masenog sastava uzorka nakon razdvajanja. Položaj kromatografskih krivulja koristi se za kvalitativnu analizu sastava uzorka, a površina ispod krivulje i visina krivulje služe za kvantitativnu procjenu sastava.

Parametri kromatografskog razdvajanja su zadržavanje, protok kroz porozni medij i širenje kromatografske zone. Vrijeme zadržavanja otopljene tvari ( $t_R$ ) jest vrijeme od trenutka kad je uzorak injektiran do vremena maksimalnog odziva pojedine komponente. Ono je zbroj prilagođenog vremena zadržavanja ( $t_R''$ ) koje predstavlja vrijeme koje otopljena tvar provede vezana za nepokretnu fazu i zadržanog vremena ( $t_m$ ) koje je jednako vremenu koje prođe od trenutka injektiranja tvari koja se ne veže za nepokretnu fazu do trenutka njene detekcije. Za optimizaciju kromatografskog procesa koristi se faktor zadržavanja ( $k$ ) koji predstavlja omjer prilagođenog vremena zadržavanja i zadržanog vremena. Iz tog faktora može se izračunati vrijeme zadržavanja bilo koje otopljene tvari prema jednadžbi [40]:

$$t_R = \frac{L}{v}(k + 1) \quad (1)$$

pri čemu je  $L$  duljina kolone, a  $v$  prosječna brzina pokretne faze.

U kromatografskim uvjetima, profil brzine je laminaran, stoga vrijedi Darcyjev zakon [40]:

$$v(x) = \left(-\frac{K}{\eta}\right) \frac{dP}{dx} \quad (2)$$

pri čemu je  $v(x)$  brzina pokretne faze u točki  $x$ ,  $K$  propusnost stupca, a  $\eta$  je viskoznost pokretne faze. Mogućnost separacije dvije komponente, odnosno njihovo relativno zadržavanje izražava se separacijskim faktorom ( $\alpha$ ) [40]:

$$\alpha = \frac{k(A)}{k(B)} \quad (3)$$

U brojnik uvijek dolazi vrijednost faktora zadržavanja za komponentu koja ima duže vrijeme zadržavanja [40].

Širenje kromatografske zone ukazuje na učinkovitost kromatografskog razdvajanja, a do njega dolazi zbog prolaska uzorka kroz kolonu. Proporcionalno je duljini putovanja ili vremenu. Označuje se kao broj teoretskih tavana (odsječaka) ( $n$ ) ili kao visina tavana (odsječaka) ( $H$ ). Glavni uzrok širenja kromatografske zone je otpor prijenosu mase u pokretnoj i nepokretnoj fazi koji onemogućuje trenutno uspostavljanje ravnoteže. Osim toga, na širenje zone utječe i brzina protoka koja varira jer neke molekule putuju brže, a druge difundiraju u ograničena

područja i zaostaju iza središta zone, što dovodi do raspršenja zone. Uzdužna, odnosno molekulska difuzija u aksijalnom smjeru uzrokuje širenje zone neovisno o brzini protoka, a povećava se s vremenom koje otopljen tvar provede u stupcu. U konačnici, širenje zone uvjetuju sorpcija i desorpcija molekula na nepokretnu fazu, što se zbiva nepredvidljivo i pri adsorpcijskoj i pri razdjelnoj kromatografiji. Svi ti parametri utječu na visinu odsječka. Ukupna visina odsječka (eng. *height equivalent to theoretical plate* (HETP)) zbroj je pojedinačnih odsječaka [40]:

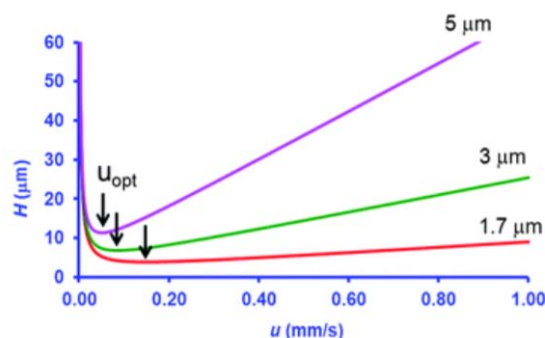
$$HETP = H_E + H_L + H_S + H_M \quad (4)$$

pri čemu je  $H_E$  prinos ukupnoj visini teoretskog odsječka koji ovisi o gustoći i homogenosti punjenja kolone, a proporcionalan je veličini čestica;  $H_L$  je prinos visini odsječka koji je posljedica molekulske difuzije u pokretnoj fazi i potječe od prirodne težnje otopljene tvari da difundira kroz kolonu;  $H_S$  je prinos otpora prijenosu mase u nepokretnoj fazi, a  $H_M$  je prinos otpora prijenosu mase u pokretnoj fazi [40].

Grafički prikaz ovisnosti HETP o brzini pokretne faze jest hiperbola koja se opisuje van Deemterovom jednadžbom [40]:

$$HETP = A + B/v + (C_S + C_M)v \quad (5)$$

Iz gornje jednadžbe mogu se dobiti optimalne vrijednosti brzine protoka pokretne faze i ukupne visine odsječka. Učinkovitost kromatografskog stupca najviša je pri optimalnoj brzini pokretne faze, a može se optimizirati i pravilnim izborom veličine čestica [40].



**Slika 13.** Ovisnost širenja kromatografske zone o brzini pokretne faze za različite veličine zrna nepokretne faze [45]

Učinkovitost kromatografskog stupca može se izraziti i brojem efektivnih odsječaka ( $N$ ) koji pokazuje širenje kromatografske zone samo u nepokretnoj fazi:

$$N = n \left( \frac{k}{1+k} \right)^2 \quad (6)$$

pri čemu je  $n$  broj teoretskih odsječaka, a  $k$  faktor zadržavanja [40].

### 2.3. Validacija

Svrha je svake analize dati pouzdanu informaciju o onome što se analizom želi dokazati, primjerice kvalitativni ili kvantitativni sastav uzorka. U svako mjerenje uključena je određena mjerna nesigurnost zbog mogućih pogrešaka koje mogu nastati u različitim segmentima analize. U svrhu osiguranja kvalitete, važno je te pogreške svesti na prihvatljivu razinu, prihvatljiv minimum pa se iz tog razloga provodi validacija sustava. Da bi se validirao analitički sustav, treba provjeriti i ocijeniti sve njegove bitne korake, od uzorka i uzorkovanja, preko provedbe metode do konačnih podataka. Prema Međunarodnom metrološkom rječniku [54] i normi HRN EN ISO/IEC 17025:2017 [55] validacija je verifikacija da su utvrđeni zahtjevi prikladni za namjeravanu uporabu. Verifikacija je definirana kao osiguranje objektivnih dokaza da promatrani predmet ispunjava utvrđene zahtjeve. Validaciju treba provoditi kada se uvodi nova metoda ili kada se postojeća prenamjenjuje ili modificira, nakon svakog većeg servisa ili promjene instrumenta, u određenim vremenskim razdobljima, ako je metoda razvijena u vlastitom laboratoriju, ako metoda nije normirana ili ako se normirana metoda želi primijeniti izvan normiranog područja, te ako podaci kontrole kvalitete pokazuju promjenu rezultata dobivenih normiranom metodom u vremenu. Validacija se provodi u tri koraka: karakterizacija ispitnog postupka, usporedba sa zahtjevima korisnika i izjava o udovoljavanju zahtjevima. Validacija može biti potpuna, ako se određuju sve izvedbene značajke, ili djelomična. Opseg validacije određuju tehničke mogućnosti, troškovi, rizici, starost metode i učestalost njene uporabe. Za potpunu validaciju važna su međulaboratorijska ispitivanja, što je propisano međunarodnim protokolima. Karakterizacija ispitnog postupka provodi se određivanjem izvedbenih značajki metode: selektivnost i specifičnost, linearnost, osjetljivost metode, točnost, preciznost, granica kvantificiranja i granica dokazivanja, radno područje, otpornost metode te stabilnost analita i standardnih otopina [40].

### 2.3.1. Selektivnost i specifičnost

Selektivnost je svojstvo metode da daje izmjerene vrijednosti veličine za jednu ili više mjernih veličina tako da vrijednosti svake veličine budu neovisne o drugim mjernim veličinama ili drugim veličinama u uzorku koji se ispituje [54]. Pri tome se moraju ukloniti interferencije koje mogu utjecati na rezultat analize. Specifičnost je sposobnost metode da nedvosmisleno odredi analit u složenoj matrici uzorka u kojoj mogu biti prisutne i druge tvari (npr. nečistoće i razgradni produkti). Specifična metoda daje signal koji odgovara samo odzivu analita, a selektivna je ona metoda kojom različite komponente iz analiziranog uzorka daju zasebne signale i međusobno ne utječu na rezultat [40].

### 2.3.2. Linearnost

Linearnost je mogućnost da se metodom unutar radnog područja dobije izravno proporcionalna ovisnost mjernih rezultata o koncentraciji analita, što se određuje umjernim postupcima [40].

### 2.3.3. Osjetljivost metode

Osjetljivost je svojstvo metode da razlikuje male količine analita, odnosno da razlikuje uzorke različitih koncentracija analita uz definiranu razinu pouzdanosti. U kvantitativnoj analizi, osjetljivost je nagib kalibracijskog pravca koji povezuje ovisnost signala s koncentracijom analita [40].

### 2.3.4. Točnost

Točnost (eng. accuracy) je bliskost slaganja između izmjerene i istinite (prave) vrijednosti mjerne veličine. Za ispitivanje točnosti, važno je procijeniti sustavnu i slučajnu pogrešku dobivenih rezultata. Stoga točnost podrazumijeva dvije komponente: istinitost i preciznost. Točnost se često poistovjećuje s pojmom istinitost (eng. *trueness*). Međutim, istinitost je izraz koji opisuje bliskost srednje vrijednosti dobivenih rezultata beskonačnog broja mjerenja i referentne vrijednosti. Premda nije moguće napraviti beskonačan broj mjerenja, istinitost se ne može izmjeriti [56]. Točnost se kvantitativno određuje preko iskoristivosti. Iskoristivost je svojstvo metode da odredi ukupnu količinu analita. Definira se kao postotni udio izmjerenog analita u odnosu prema njegovoj stvarnoj količini. Iskoristivost daje podatak o točnosti određivanja, odnosno o proporcionalnoj sustavnoj pogrešci. Može se odrediti usporedbom

nagiba umjernih pravaca, tj. osjetljivosti za analizirani uzorak i standardnu otopinu, koji se ne smiju statistički signifikantno razlikovati [40].

#### 2.3.5. Preciznost

Preciznost je stupanj podudaranja više nezavisnih ispitnih rezultata dobivenih od istog homogenog uzorka u propisanim uvjetima. Iskazuje se kao standardno odstupanje, relativno standardno odstupanje ili varijancija. Ako u mjerenje nije uključena sustavna pogreška, odnosno ako se prava vrijednost i granična aritmetička sredina podudaraju, raspršenost rezultata posljedica je slučajne pogreške. Prema Youdenu i Steineru [40], preciznost se sastoji od slučajne pogreške unutar laboratorija i sustavne laboratorijske pogreške. Obje su specifične za pojedini laboratorij. Preciznost uključuje tri pojma: ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost rezultata. Ponovljivost podrazumijeva da su rezultati dobiveni istom metodom, u istim uvjetima za isti uzorak u kratkom vremenskom periodu. Obnovljivost podrazumijeva da je ista metoda i isti uzorak, ali su promijenjeni uvjeti, najčešće se mjerenja provode u drugom laboratoriju u okviru međulaboratorijskih usporedbenih ispitivanja. Međupreciznost podrazumijeva mjerenja izvršena unutar istog laboratorija, ali uz promjenu instrumenta, analitičara ili drugih uvjeta u dužem vremenskom periodu [40,46].

#### 2.3.6. Granica kvantifikacije i granica dokazivanja

Granica kvantifikacije jest najmanja moguća koncentracija analita koja se može kvantitativno odrediti uz dopuštenu pogrešku. To je najmanji rezultat koji se može odrediti s dovoljnom preciznošću, odnosno ona koncentracija koja se može odrediti s fiksnim maksimumom relativnog standardnog odstupanja. Granica dokazivanja jest najmanja moguća koncentracija analita koja se može detektirati, ali ne i kvantitativno odrediti. Granica dokazivanja metode temelji se na mogućnosti da se njome dokaže analit u matici uzorka, a ovisi o ukupnoj varijanciji analize uzorka [40].

#### 2.3.7. Radno područje

Radno područje jest interval unutar kojeg analitički postupak ima zadovoljavajuću preciznost, točnost i linearnost, a obično pokriva 80-120 % ispitivane koncentracije analita. To je, zapravo, područje primjene analitičkog postupka ili metode koja se validira [40].

### 2.3.8. Robusnost

Robusnost metode je sposobnost metode da ostane dovoljno pouzdana i dosljedna rezultatima u slučaju malih nenamjernih promjena određenih eksperimentalnih uvjeta (npr. temperatura kolone ili protok pokretne faze) [46].

### 2.3.9. Stabilnost analita i standardnih otopina

Stabilnost analita i standardnih otopina jest sposobnost dobivanja istih rezultata tijekom duljeg vremenskog razdoblja. Prilikom validacije, valja pripaziti na stabilnost standardnih otopina, posebice bioloških otopina kojima stabilnost treba određivati pri različitim temperaturama [40].

## 2.4. Eksperimentalni dizajn

U svijetu u kojem živimo izrazito je bitno uštedjeti što više energije, vremena, financijskih sredstava i voditi brigu o očuvanju okoliša. Stoga se danas koriste mnogi programski paketi, matematički modeli planiranja istraživanja i eksperimenata koji će biti uključeni u istraživanje, tzv. eksperimentalni dizajn. Time se postiže znatna ušteda kemikalija i drugih potrepština, samim time i novca, očuvanje instrumenata, ali i znatno skraćivanje vremena trajanja istraživanja. Izbjegavaju se brojni koraci pokušaja i pogreške i brže se dolazi do rezultata. Eksperimentalni dizajn temelji se na statističkom ocjenjivanju rezultata eksperimenata kako bi se, s određenom razinom sigurnosti, mogli donositi zaključci o bitnim značajkama procesa. Primjerice, koji su najbolji uvjeti za kromatografsko razdvajanje, kao što je bio slučaj i u ovome radu.

Postoje dvije vrste eksperimentalnog dizajna, odnosno dva pristupa planiranju: slijedno planiranje i istodobno planiranje. U slijednom planiranju se pristupa izradi manjeg broja pokusa čiji odzivi postaju osnova za planiranje u sljedećem koraku. Karakteristika istodobnog planiranja jest definiranje eksperimentalnog dizajna prije početka mjerenja, a eksperimenti se, u pravilu, ne izvode naknadno [47]. Primjeri računalnih programa koji se koriste u analitičke svrhe su *DryLab* i *Fusion LC Method Development™ (FMD)*. *DryLab* je programski paket korišten za eksperimentalni dizajn u ovome radu. Kako bi on mogao izvršiti svoje računsko predviđanje, potrebno je prethodno provesti 2-12 eksperimenata, čiji se podaci zatim unose u program. *DryLab*, na temelju rezultata eksperimenata, predlaže rezoluciju i vrijeme zadržavanja pojedinih molekula u određenim uvjetima s točnošću većom od 99 %. Također, *DryLab* nudi mogućnost predviđanja utjecaja pojedinih uvjeta na razdvajanje, npr. protok



pokretne faze, dimenzije kolone, vrsta i trajanje gradijenta [48]. Programski paket *Fusion* odličan je po tome što je povezan s instrumentima različitih proizvođača, kao što su Agilent, Waters i Dionex. To omogućava brzi razvoj metode za sve vrste kromatografije. Osim toga, brzom razvoju doprinosi i činjenica što *Fusion* nudi mogućnost korištenja predložaka metoda te na taj način analitičar brže može pronaći odgovarajuću sličnu metodu za svoj sustav. Poput *DryLab*-a, i *Fusion* je izrazito koristan za određivanje radnog područja metode [49].

#### 2.4.1. DryLab

Kako je istaknuto u poglavlju 2.4., eksperimentalni dizajn ima mnogo pozitivnih strana jer smanjuje vrijeme potrebno za razvoj metode, znatna je ušteda kemikalija te očuvanje kolona i instrumenata, a najbolja strana programa za eksperimentalni dizajn, poput *DryLab*-a, jest što oni predviđaju kromatograme u mnogo širem rasponu eksperimentalnih uvjeta nego što bi to ikada bilo moguće u laboratoriju u nekom razumnom vremenskom periodu. *DryLab* je zaista revolucionaran program za razvoj i optimizaciju HPLC metoda koji može brzo i jednostavno odrediti kakvo će biti razdvajanje ispitivanih analita. Istovremeno se može mijenjati više parametara metode, kao što su pH-vrijednost pokretne faze, temperatura, koncentracija pufera, vrijeme trajanja gradijenta te pratiti kakav utjecaj promjena ovih parametara ima na razdvajanje. To je izuzetno korisna informacija za određivanje robusnosti metode prilikom validacije metode. Nakon izvršenih 2-12 eksperimenata s promjenama prethodno navedenih parametara, dobiveni kromatogrami se unose u *DryLab*. Kromatogrami se unose kao \*.cdf datoteke. To je univerzalni format za sve kromatografske sustave. Važno je na kromatogramima označiti koja kromatografska krivulja pripada određenom analitu. Isto tako, važno je odrediti i jedan kritičan parametar koji će služiti za potvrdu koliko je razdvajanje dobro. To može biti faktor razlučivanja. Osim kritičnog parametra, unose se i eksperimentalni uvjeti pri kojima su dobiveni kromatogrami. Nakon što su uneseni svi podaci, *DryLab* matematički računa uvjete za najbolje razdvajanje te u konačnici prikaže multidimenzijski objekt, najčešće u obliku kocke. Unutar kocke su različito obojena područja. Crveno područje predstavlja područje najboljih uvjeta za razdvajanje, plavom bojom označeno je područje najlošijih uvjeta, a žuto, zeleno i svijetloplavo područje su uvjeti koji su između najboljih i najgorih, ali je bolje ne uzeti ih. Najbolje je odabrati uvjete unutar crvenog područja. Unutar njega je i vrijednost zadanog kritičnog parametra najpovoljnija te će i razdvajanje biti najbolje. Točnost *DryLab*-ovih predviđanja vremena zadržavanja i širine kromatografskih krivulja veća je od 99 % [48].

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

U tablici 9. prikazan je popis kemikalija koje su korištene za izvođenje eksperimentalnog dijela te njihovi proizvođači.

**Tablica 9.** Popis kemikalija i njihovih proizvođača

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Acetonitril	$C_2H_3N$	p.a.	J. T. Baker, SAD
Amonijev acetat	$C_2H_7NO_2$	p.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
Biohanin A	$C_{16}H_{12}O_5$	p.a.	Extrasynthese, Francuska
Daidzein	$C_{15}H_{10}O_4$	p.a.	Extrasynthese, Francuska
Daizdin	$C_{21}H_{20}O_9$	p.a.	Extrasynthese, Francuska
Dimetilsulfoksid	$C_2H_6OS$	p.a.	Biosolve, Francuska
Formononetin	$C_{16}H_{12}O_4$	p.a.	Extrasynthese, Francuska
Fosforna kiselina	$H_3PO_4$	p.a.	J. T. Baker, SAD
Genistein	$C_{15}H_{10}O_5$	p.a.	Extrasynthese, Francuska

Genistin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	p.a.	Extrasynthese, Francuska
Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	p.a.	Merck, Njemačka
Natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Kemika, Hrvatska
Octena kiselina	$C_2H_4O_2$	p.a.	Biosolve, Francuska
Ononin	$C_{22}H_{22}O_9$	p.a.	Extrasynthese, Francuska
Sisotrin	$C_{22}H_{22}O_{10}$	p.a.	Extrasynthese, Francuska
Tetrahidrofurani	$C_4H_8O$	p.a.	Merck, Njemačka
Voda	$H_2O$	ULC/MS-CC/SFC	Biosolve, Francuska

### 3.1.2. Standardne i radne otopine fitoestrogena

Za razvoj i validaciju metode korištene su različite standardne i radne otopine čija je priprema opisana u ovom poglavlju.

#### 3.1.2.1. Priprema rezolucijske otopine

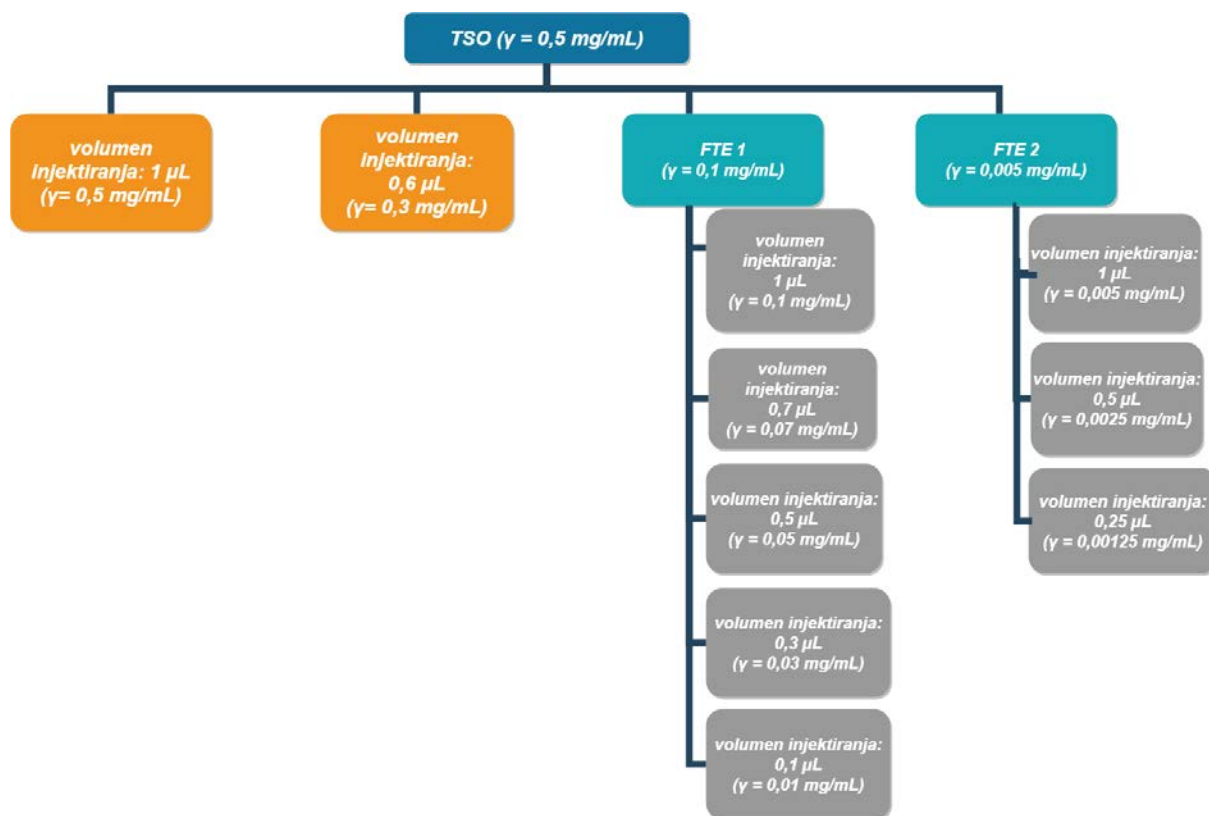
U razvoju metode, za ispitivanje je pripravljena rezolucijska otopina svih osam molekula fitoestrogena. Odvagano je 0,5 mg uzorka svake molekule i otopljeno u 1 mL acetonitrila u vialu za HPLC. Formononetin, genistin, daidzin i ononin nisu se otapili u čistom acetonitrilu pa je dodana kap tetrahidrofurana ( $C_4H_8O$ ), no ni to nije pomoglo u otapanju pa je dodana i kap dimetilsulfoksida ( $C_2H_6OS$ ) te su uzorci uspješno otopljeni. Iz svakog viala uzeto je 200  $\mu$ L otopine pojedinog fitoestrogena i pomiješano zajedno u tzv. rezolucijsku otopinu.

### 3.1.2.2. Priprema temeljne standardne otopine smjese fitoestrogena

Za pripravu temeljne standardne otopine (TSO) fitoestrogena (genistein, daidzein, biohanin A, formononetin, genistin, daidzin, ononin, sisotrin), u istu tikvicu od 5 mL odvagano je 2,5 mg svakog fitoestrogena (koncentracija svakog fitoestrogena = 0,5 mg/mL) te je otopljeno u acetonitrilu uz dodatak nekoliko kapi dimetilsulfoksida.

### 3.1.2.3. Priprema standardnih otopina fitoestrogena za provjeru linearnosti

Iz temeljne standardne otopine, pripravljene su dvije standardne otopine smjese fitoestrogena za provjeru linearnosti. Prva standardna otopina (FTE 1) pripravljena je razrjeđenjem 100  $\mu$ L temeljne standardne otopine s 400  $\mu$ L acetonitrila (koncentracija svake molekule fitoestrogena = 0,1 mg/mL) u vialu. Druga standardna otopina (FTE 2) pripravljena je razrjeđenjem 10  $\mu$ L temeljne standardne otopine s 1000  $\mu$ L acetonitrila (koncentracija svake molekule fitoestrogena = 0,005 mg/mL) u vialu. Za provjeru linearnosti, određene koncentracije otopina dalje su postignute promjenom volumena injektiranja kao što je prikazano na slici 17.



**Slika 17.** Shematski prikaz pripreme standardnih otopina fitoestrogena za provjeru linearnosti

#### 3.1.2.4. Priprema standardnih otopina molekula fitoestrogena za provjeru točnosti

Točnost metode provjerena je na tri koncentracijske razine: 2,5 µg/mL (GK), 30 µg/mL i 70 µg/mL. Iz temeljne standardne otopine (priprava opisana u odlomku 3.1.2.2.), pripravljene su dvije standardne otopine. Otopina FTE 1 pripravljena je razrjeđenjem 100 µL temeljne standardne otopine s 400 µL acetonitrila (koncentracija svakog fitoestrogena = 0,1 mg/mL) u vialu. Otopina FTE 2 pripravljena je razrjeđenjem 10 µL temeljne standardne otopine sa 1000 µL acetonitrila (koncentracija svakog fitoestrogena = 0,005 mg/mL) u vialu.

#### 3.1.2.5. Priprema otopina za provjeru preciznosti

Za procjenu preciznosti metode, eksperimentalno su provjereni kriteriji ponovljivost i međupreciznost.

Za provjeru ponovljivosti, pripravljena je temeljna standardna otopina sa svih osam fitoestrogena tako da je u tikvicu od 5 mL odvagano 2,5 mg svake molekule i otopljeno dodatkom kapi dimetisulfoksida i nadopunjeno acetonitriplom do vrha. Zatim je uzeto 100 µL te otopine i razrijeđeno u vialu s 400 µL acetonitrila. S volumenom injektiranja od 0,3 µL postignuta je koncentracija otopine od 30 µg/mL. Nakon toga, pripravljeno je 6 otopina jednake koncentracije komercijalnog uzorka C u kojem nije pronađeno osam molekula fitoestrogena koje su predmet ovoga istraživanja (genistein, daidzein, biohanin A, formononetin, genistin, daidzin, ononin, sisotrin). Otopine su pripravljene tako da je 2 mg uzorka A otopljeno dodatkom nekoliko kapi vode i nadopunjeno do vrha tikvice od 5 mL s acetonitriplom. U svaku tu otopinu dodano je 10 µL temeljne standardne otopine u vial i otopina iz svakog viala injektirana je tri puta uz volumen injektiranja od 0,3 µL.

Međupreciznost je provjerena s istim otopinama koje su korištene za provjeru ponovljivosti i na isti način na koji je provjerena ponovljivost, ali je analiza provedena drugi dan i na drugom instrumentu istog proizvođača i jednakih karakteristika. Usporedbom rezultata oba dana, provjerena je međupreciznost.

#### 3.1.3. Pokretna faza

Za vodenu mobilnu pokretnu fazu (A) odabran je fosfatni pufer koncentracije 10 mmol/L, a pripremljen je otapanjem 1,38 g natrijeva dihidrogenfosfata monohidrata ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) u 1 L destilirane vode. Korištena je voda je ultra visoke čistoće (Milli-Q® Advantage A10 Water Purification System, Merck). pH- vrijednosti pufera bile su 3, 4, 5 i 9, a podešavane su

s razrijeđenom otopinom fosforne kiseline ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (vrijedi za otopine pH vrijednosti 3 i 4) te otopinom natrijeva hidroksida ( $\text{NaOH}$ ) koncentracije 0,1 mol/L (vrijedi za otopine pH vrijednosti 5 i 9). Organska mobilna pokretna faza (B) bio je acetonitril ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ).

## 3.2. Instrumenti

### 3.2.1 Vaga

Za vaganje uzoraka korištena je analitička vaga *Balance XPE205* (Mettler Toledo International Inc., SAD) (slika 14). Maksimalni kapacitet vage je 220 g, uz očitavanje od 0,01 mg. Minimalna odvaga (USP, 0,1 % tipično) je 14 mg, a ponovljivost (testna težina) je 0,015 mg (10 g). Vaga automatski detektira svaki relevantni statički naboj prisutan u komori za vaganje koji bi mogao narušiti točnost i preciznost vaganja [50].



**Slika 14.** Analitička vaga Balance XPE205 (Mettler Toledo International Inc., SAD)

### 3.2.2. pH-metar

Za određivanje pH-vrijednosti fosfatnog pufera koji je korišten kao vodena pokretna faza u kromatografiji obrnutih faza, upotrijebljen je je *pH-metar Seven Excellence S400-osnovni, stolni mjerač za pH/mV* (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska) (slika 15). Specifikacije korištenog pH-metra su [51]:

1. raspon vrijednosti: -2 – 20
2. pH-rezolucija: 0,001; 0,01; 0,1
3. pH-točnost ( $\pm$ ): 0,002
4. temperaturni raspon: -30 °C – 130 °C
5. rezolucija temperature: 0,1 °C
6. temperaturna točnost ( $\pm$ ): 0,1 °C



**Slika 15.** pH-metar Seven Excellence S400-osnovni (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)

### 3.2.3. Tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti (UHPLC)

Za razdvajanje osam molekula fitoestrogena, korištena je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti. Provedena je kromatografija obrnutih faza koja koristi nepolarnu nepokretnu fazu i polarnu pokretnu fazu. Kromatografska analiza provedena je na tekućinskom kromatografu *Waters UHPLC H-Class* (Miliford, MA, SAD) (slika 16) koji se sastoji od dodavača uzoraka, binarne pumpe te PDA detektor (detektor s nizom dioda) korištenog za detekciju molekula fitoestrogena. Instrument sadrži dva integrirana ventila za pristup maksimalno četiri otapala. Mogući volumen injektiranja uzorka je od 0,1  $\mu$ L do 1 mL,

a sustav može podržati tlakove do 15,000 psi. Temperaturno radno područje je 4-90 °C [52]. Za rad na instrumentu, provođenje kromatografske analize i obradu dobivenih kromatograma, korišten je programski paket *Empower* (Waters, Velika Britanija).



**Slika 16.** Waters UHPLC H-Class (Miliford, MA, USA) [53]

### 3.3. Metode rada

#### 3.3.1. Razvoj metode za kvantifikaciju biološki aktivnih tvari

Kako bi se odredili najbolji uvjeti za razdvajanje osam molekula fitoestrogena (genistein, daidzein, biohanin A, formononetin, genistin, daidzin, ononin, sisotrin), kreirano je nekoliko različitih metoda pri čemu su mijenjani sljedeći parametri: pH-vrijednosti vodene pokretne faze, temperature kolone i vremena trajanja gradijenta. Za temperaturu kolone odabrano je 30 °C i 60 °C, a dodatno je odabrana i temperatura od 45 °C za potvrdu eksperimentalnog dizajna u računalnom programu *DryLab4 HPLC Modeling Software*. Korišteno je gradijentno eluiranje (tablice 10. i 11.) s vremenima trajanja gradijenta od 5 i 23 minuta. Za potrebe eksperimentalnog dizajna, isprobano je i vrijeme trajanja gradijenta od 13 minuta (tablica 12). U ovome radu, vrijeme trajanja gradijenta označeno je kao " $t_G$ ". U DryLab se unosi samo linearni gradijent.



**Tablica 10.** Sastav pokretne faze tijekom kromatografske analize  
(vrijeme trajanja gradijenta = 5 min)

<b>t/min</b>	<b>A/%</b>	<b>B/%</b>
0	95	5
3,00	10	90
3,01	95	5
5,00	95	5

**Tablica 11.** Sastav pokretne faze tijekom kromatografske analize  
(vrijeme trajanja gradijenta = 23 min)

<b>t/min</b>	<b>A/%</b>	<b>B/%</b>
0	95	5
20,00	10	90
20,01	95	5
23,00	95	5

**Tablica 12.** Sastav pokretne faze tijekom kromatografske analize  
(vrijeme trajanja gradijenta = 13 min)

<b>t/min</b>	<b>A/%</b>	<b>B/%</b>
0	95	5
10,00	5	95
10,01	95	5
13,00	95	5

Protok pokretne faze bio je 0,5 mL/min, a volumen injektiranja 0,5  $\mu$ L. Fitoestrogeni su detektirani pri 210, 230 i 250 nm.

Za potrebe razvoja metode i eksperimentalnog dizajna, kromatografija obrnutih faza provedena je na tri različite kolone:

1. kolona *Zorbax Bonus-RP* tvrtke *Agilent* dimenzija 50 mm x 2,1 mm, veličine čestica 1,8  $\mu\text{m}$
2. kolona *Zorbax EclipsePlus C18 RRHD* tvrtke *Agilent* dimenzija 50 mm x 2,1 mm, veličine čestica 1,8  $\mu\text{m}$
3. kolona *CORTECS<sup>TM</sup> UPLC C18+* tvrtke *Waters* dimenzija 50 mm x 2,1 mm, veličine čestica 1,6  $\mu\text{m}$ .

Kolona *CORTECS<sup>TM</sup> UPLC C18+* tvrtke *Waters* nije napravljena za rad na temperaturi od 60 °C, tako da je maksimalna temperatura koja je na nju primijenjena bila 45°C.

#### 3.3.1.1. Eksperimentalni dizajn

U program *DryLab4 HPLC Modeling Software* unesene su vrijednosti temperature kolone (30 °C i 60 °C), vremena trajanja gradijenta (3 min i 20 min) te pH-vrijednosti vodene pokretne faze (A), odnosno fosfatnog pufera pH= 3, 4 i 5. Uz to, u program su preneseni kromatogrami dobiveni tijekom prve faze razvoja metode kada su mijenjani ovi parametri u metodi i analizirana rezolucijska otopina osam molekula fitoestrogena (genistein, daidzein, biohanin A, formononetin, genistin, daidzin, ononin, sisotrin). Kritični parametar koji je praćen bio je faktor razlučivanja ( $R_s$ ) u iznosu 1,5. Na temelju unesenih podataka, program je dao predviđanja najboljih uvjeta razdvajanja ispitivanih fitoestrogena su odabrani najbolji uvjeti za razdvajanje molekula fitoestrogena i prema njima je složena nova metoda za kromatografiju obrnutih faza koja je i provedena. Odabrana je kolona *Zorbax EclipsePlus C18 RRHD* tvrtke *Agilent* dimenzija 50 mm x 2,1 mm, veličine čestica 1,8  $\mu\text{m}$ . Temperatura kolone bila je 45 °C. pH-vrijednost vodene pokretne faze (A), odnosno fosfatnog pufera bila je 3,5. Valna duljina određivanja bila je 230 nm. Protok pokretne faze ostao je i dalje 0,5 mL/min. I dalje je korišteno gradijentno eluiranje uz vrijeme trajanja gradijenta od 3 minute (tablica 13.)

**Tablica 13.** Sastav pokretne faze tijekom kromatografske analize

(vrijeme trajanja gradijenta = 3 min)

<b>t/min</b>	<b>A/%</b>	<b>B/%</b>
0	95	5
2,00	5	95
2,01	95	5
3,00	95	5

### 3.3.2. Validacija metode za kvantifikaciju biološki aktivnih tvari

Nakon što je kreirana metoda prema parametrima dobivenim proračunima u programu *DryLab4 HPLC Modeling Software* i provedeno je njeno testiranje s rezolucijskom otopinom osam molekula fitoestrogena, ponovno je analizirana rezolucijska otopina uz manji volumen injektiranja (0,1  $\mu\text{L}$ ) čime je smanjena koncentracija pojedinih fitoestrogena. Praćen je omjer signala i šuma pojedine molekule, posebice za ononin čija je površina kromatografske krivulje bila najmanja. Na taj način određena je najmanja koncentracije pojedinih fitoestrogena, a da omjer signala i šuma bude 10:1.

#### 3.3.2.1. Linearnost

Priprema otopina za ispitivanje linearnosti opisana je u odlomku 3.1.2.3. Linearnost je ispitana za svih osam molekula fitoestrogena u području koncentracija 2,5-500  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 3.3.2.2. Točnost

Priprema otopina za ispitivanje točnosti opisana je u odlomku 3.1.2.4. Iz otopine FTE 1, variranjem volumena injektiranja, postignute su koncentracije otopina za provjeru točnosti od 30  $\mu\text{g/mL}$  (volumen injektiranja: 0,3  $\mu\text{L}$ ) i 70  $\mu\text{g/mL}$  (volumen injektiranja: 0,7  $\mu\text{L}$ ). Volumen injektiranja otopine FTE 2 bio je 0,5  $\mu\text{L}$  i tako je postignuta koncentracija otopine od 2,5  $\mu\text{g/mL}$ . Svaka ova otopina injektirana je tri puta. Osim toga, u posebne viala dodane su ove otopine u otopinu komercijalnog uzorka C (priprema opisana u odlomku 3.1.2.5.). I te otopine su injektirane po tri puta s različitim volumenima injektiranja da se postignu željene koncentracije za provjeru točnosti.

### 3.3.2.3. Preciznost

Za ispitivanje preciznosti metode, određena su dva parametra: ponovljivost i međupreciznost. Priprema otopina opisana je u odlomku 3.1.2.5.

### 3.3.2.4. Robusnost

Robusnost metode provjerena je promjenom sljedećih parametara u metodi:

- a) temperatura kolone je s 45 °C promijenjena na 40 °C i 50 °C
- b) pH-vrijednost fosfatnog pufera koji je korišten kao vodena pokretna faza promijenjena je s 3,5 na 3,25 i 3,75
- c) protok pokretne faze promijenjen je s 0,5 mL/min na 0,4 mL/min i 0,6 mL/min.

Tako je od početne metode kreirano novih šest metoda promjenom pojedinog parametra i prema novim uvjetima analizirane su otopine korištene za provjeru preciznosti (priprava opisana u odlomku 3.1.2.5.).

### 3.3.2.5. Stabilnost otopine

Za provjeru stabilnosti otopine korištena je otopina FTE 1 . Volumen injektiranja bio je 0,3 µL. Stabilnost je praćena u vremenskom periodu od tjedan dana kromatografskom analizom otopine prvi, peti, šesti i sedmi dan.

### 3.3.3. Analiza komercijalnih uzoraka

Nakon razvoja, optimizacije i validacije metode, uslijedila je analiza 17 komercijalnih uzoraka (A-R) koji se na tržištu nalaze kao dodaci za prehranu namijenjeni ženama u menopauzi i oboljelima od osteoporoze. Uzorci su pripremljeni tako da je odvagano 1,0 mg sadržaja kapsule u tikvicu od 5 mL i otopljeno u 1 mL destilirane vode i 4 mL acetonitrila. Prilikom otapanja, prvo je dodana voda zbog različitih aditiva koji se nalaze u kapsuli.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

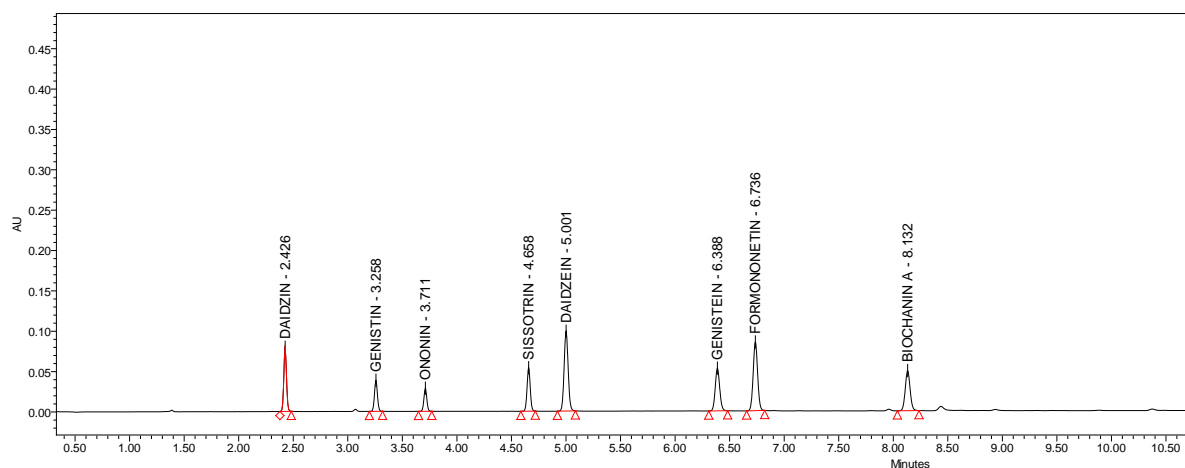
Cilj ovoga rada bio je razviti, optimirati i validirati metodu za kvantitativno određivanje biološki aktivnih tvari UHPLC tehnikom. Metoda je namijenjena za kvantitativno određivanje osam fitoestrogena: daidzin, daidzein, genistin, genistein, ononin, sisotrin, formononetin, biohanin A koji se najčešće ekstrahiraju iz soje te crvene i bijele djeteline i na tržištu se nalaze u obliku dodataka za prehranu. Validiranom metodom analizirano 18 komercijalnih uzoraka dodataka za prehranu te je određen udio navedenih molekula fitoestrogena u njima.

### 4.1. Razvoj analitičke metode

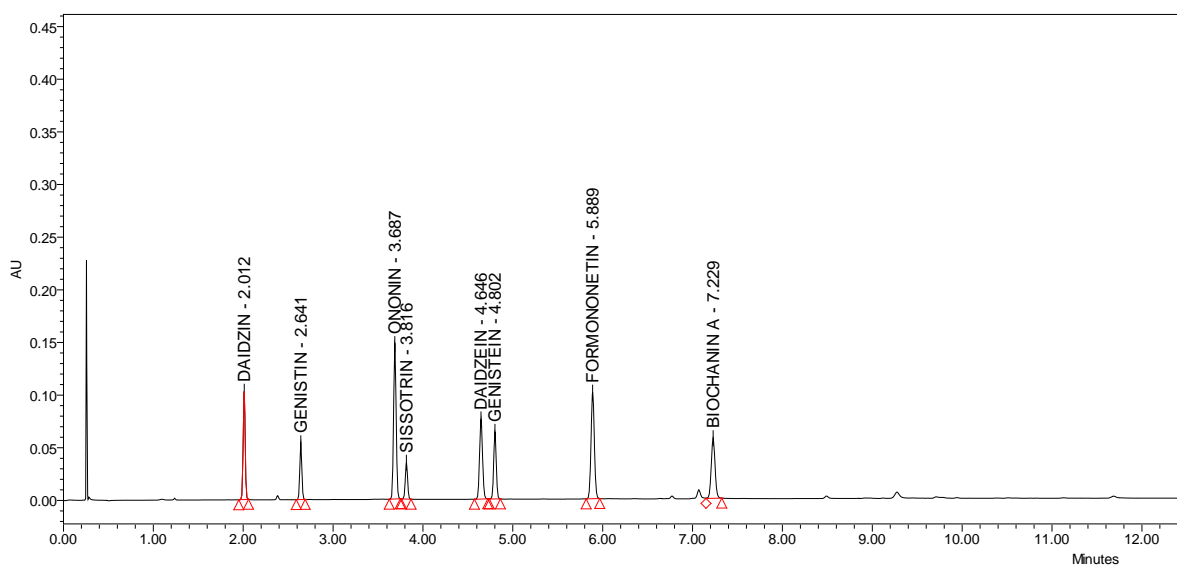
U razvoju i optimizaciji metode, kako bi se pronašli najbolji uvjeti za razdvajanje osam molekula fitoestrogena i prikupilo što više podataka potrebnih za izradu eksperimentalnog dizajna u programu *DryLab4 HPLC Modeling Software*, mijenjana su četiri parametra: kolona, temperatura kolone, vrijeme trajanja gradijenta i pH-vrijednost fosfatnog pufera koji je korišten kao vodena pokretna faza. Korištene su tri kolone:

1. AGILENT Zorbax BONUS RP RRHD 1,8  $\mu\text{m}$ ; 2,1 x 50 mm
2. AGILENT Zorbax EclipsePlusC18 RRHD 1,8  $\mu\text{m}$ ; 2,1 x 50 mm
3. CORTECS<sup>TM</sup> UPLC C18+ 1,6  $\mu\text{m}$ ; 2,1 x 50 mm.

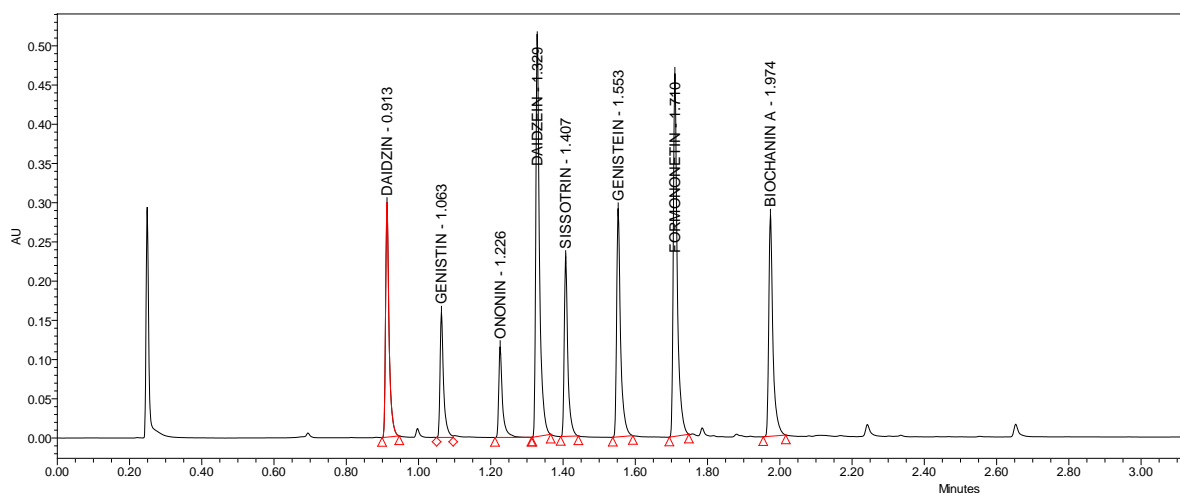
Kolone se razlikuju prema nekoliko karakteristika kao što je punilo (BONUS RP kolona ima punilo C14-alkilni lanac, a kolone EclipsePlus i CORTECS imaju C18-alkilni lanac) i veličina zrna punila (BONUS i EclipsePlus kolona imaju veličinu zrna 1,8  $\mu\text{m}$ , a CORTECS kolona ima veličinu zrna 1,6  $\mu\text{m}$ ). Na svim je kolonama uspješno postignuto razdvajanje svih osam fitoestrogena uz zadovoljavajuće razlučivanje kromatografskih krivulja (slike 18, 19 i 20). U poglavlju "PRILOZI", od P.17. do P.28., nalaze se kromatogrami fitoestrogena pri svim ispitanim uvjetima na sve tri kolone.



**Slika 18.** Kromatogram rezolucijske otopine (pH(pokretne faze)=4,  $t_G=20$  min,  $T=60$  °C, kolona: AGILENT Zorbax BONUS RP RRHD 1,8  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm)

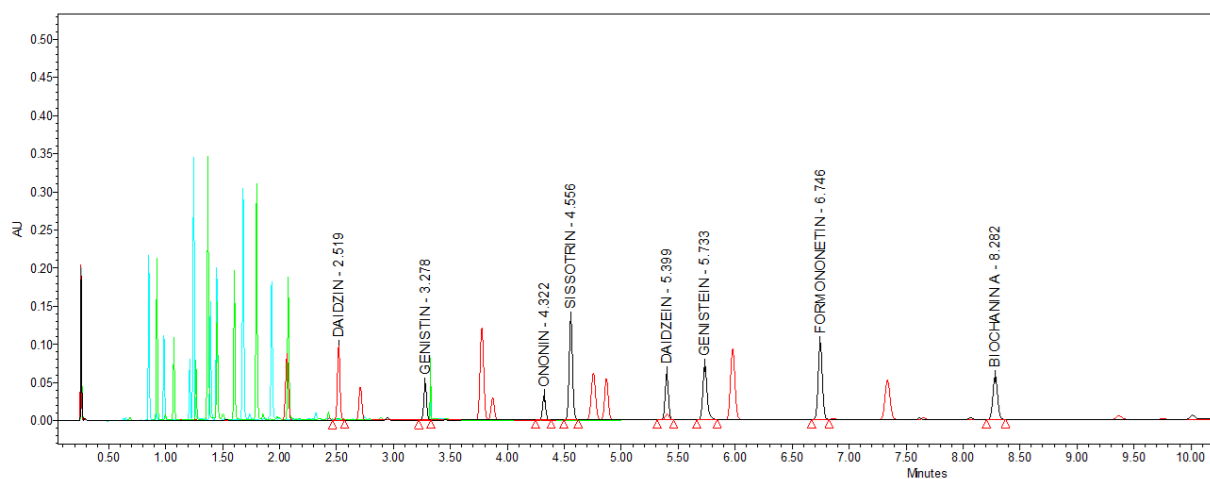


**Slika 19.** Kromatogram rezolucijske otopine ( pH(pokretne faze)=4,  $t_G=20$  min,  $T=60$  °C, kolona: AGILENT Zorbax EclipsePlusC18 RRHD 1,8  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm)



**Slika 20.** Kromatogram rezolucijske otopine svih osam molekula fitoestrogena (Uvjeti: pH(pokretne faze)=4,  $t_G$  =5 min,  $T$ =30 °C, kolona: CORTECS™ UPLC C18+ 1,6  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm)

Ispitivane temperature kolone bile su 30 °C i 60 °C, a za potvrdu eksperimentalnog dizajna trebalo je ispitati razdvajanje na jednoj temperaturi između ove dvije pa je izabrana temperatura od 45 °C. Korišteno je gradijentno eluiranje. Vrijeme trajanja gradijenta iznosilo je 5 minuta i 23 minuta (tablice 10. i 11.). Također, za potrebe eksperimentalnog dizajna, bilo je potrebno ispitati razdvajanje i na jednom vremenu između ova dva, te je izabrano vrijeme trajanja gradijenta od 10 minuta (tablica 12.). Kraće trajanje gradijenta i viša temperatura rezultiraju kraćim vremenom zadržavanja molekula na koloni, što se na kromatogramu vidi tako da su kromatografske krivulje pojedinih molekula pomaknute prema početku kromatograma. Prema dobivenim rezultatima, pri vremenu trajanja gradijenta od 5 minuta i temperaturi od 60 °C najkraće je vrijeme zadržavanja, a pri vremenu trajanja gradijenta od 23 minute i temperaturi od 30 °C najduže je trajanja gradijenta. Zbirni kromatogram na slici 21. prikazuje rezultate analiza rezolucijske otopine pri pH-vrijednosti 3 fosfatnog pufera koji je korišten kao vodena pokretna faza s različitim trajanjima gradijenta ( $t_G$ =3, 10, 20 min) i temperaturama kromatografske kolone ( $T$ =30, 45, 60 °C).



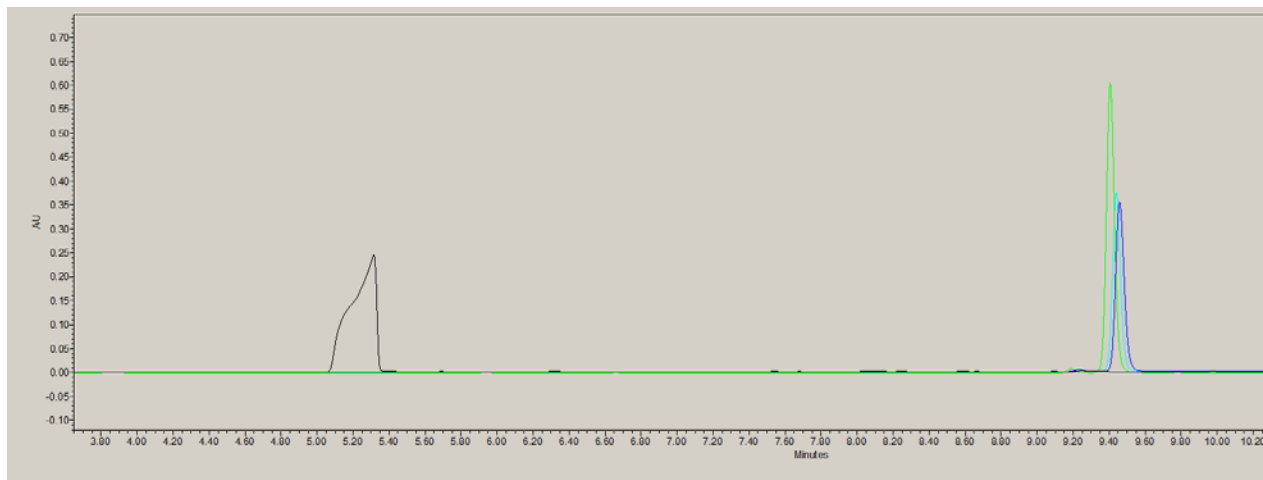
- RS tG5T60
- RS tG5T30
- RS tG23T60
- RS tG23T30

**Slika 21.** Preklopljeni kromatogrami pri različitim trajanjima gradijenta i temperaturama kolone (pH=3)

U svrhu razvoja metode i pronalaska najboljih uvjeta za razdvajanje osam molekula fitoestrogena, ispitan je i utjecaj pH-vrijednosti fosfatnog pufera korištenog kao vodena pokretna faza na kromatografsko razlučivanje. Ispitane su pH-vrijednosti pufera 3, 4, 5 i 9. Pri nižim pH-vrijednostima (3, 4 i 5) kromatografske krivulje pojedinih molekula imaju pravilan izgled, dok pri pH-vrijednosti 9 kromatografske krivulje svih aglikona (daidzein, genistein, formononetin, biohanin A) imaju nepravilan izgled i znatno kraće vrijeme zadržavanja na koloni nego što imaju glikozidi (daidzin, genistin, ononin, sisotrin). Na slikama 22. i 23. vidljiva je razlika u izgledu kromatograma jednog aglikona (biohanin A) i njegovog glikozidnog konjugata (sisotrin) pri različitim pH-vrijednostima. Kod biohanina A, pri pH-vrijednosti 9, znatno je kraće vrijeme zadržavanja, a pri pH-vrijednostima 3, 4 i 5 razlika u vremenima zadržavanja je mala. Pri pH-vrijednosti 3 nešto je kraće vrijeme zadržavanje nego pri pH-vrijednostima 4 i 5, pri čemu je vrijeme zadržavanja pri pH-vrijednosti 4 nešto kraće od vremena zadržavanja pri pH-vrijednosti 5. Kod sisotrina nema tako značajne razlike u vremenima zadržavanja pri različitim pH-vrijednostima. Najkraće vrijeme zadržavanja je pri pH-vrijednosti 9, zatim 5, a za pH-vrijednosti 3 i 4 nema značajnije razlike u vremenu zadržavanja, već u intenzitetu odziva. U poglavlju "PRILOZI", od P1. do P16., nalaze se

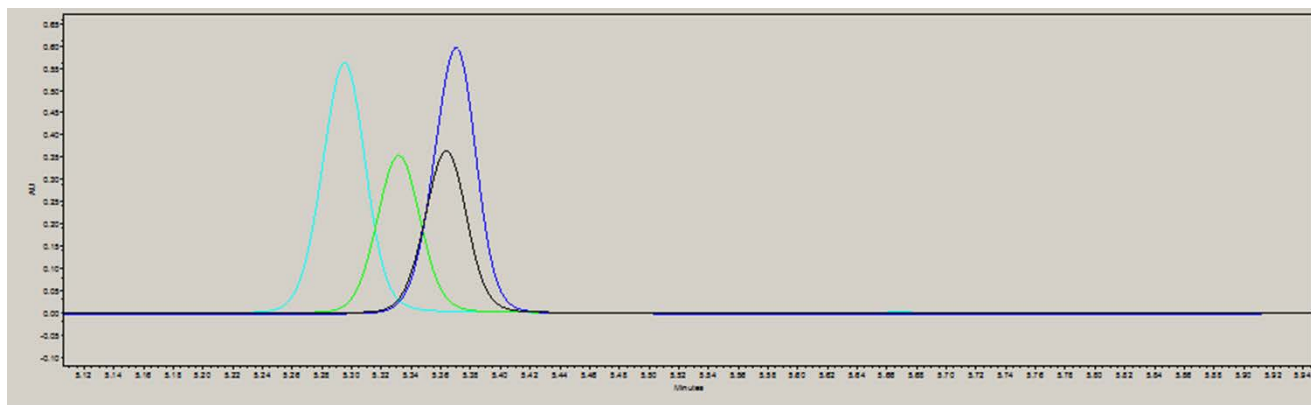


kromatogrami svih osam molekula fitoestrogena pri različitim pH-vrijednostima pokretne faze.



- pH 3
- pH 4
- pH 5
- pH 9

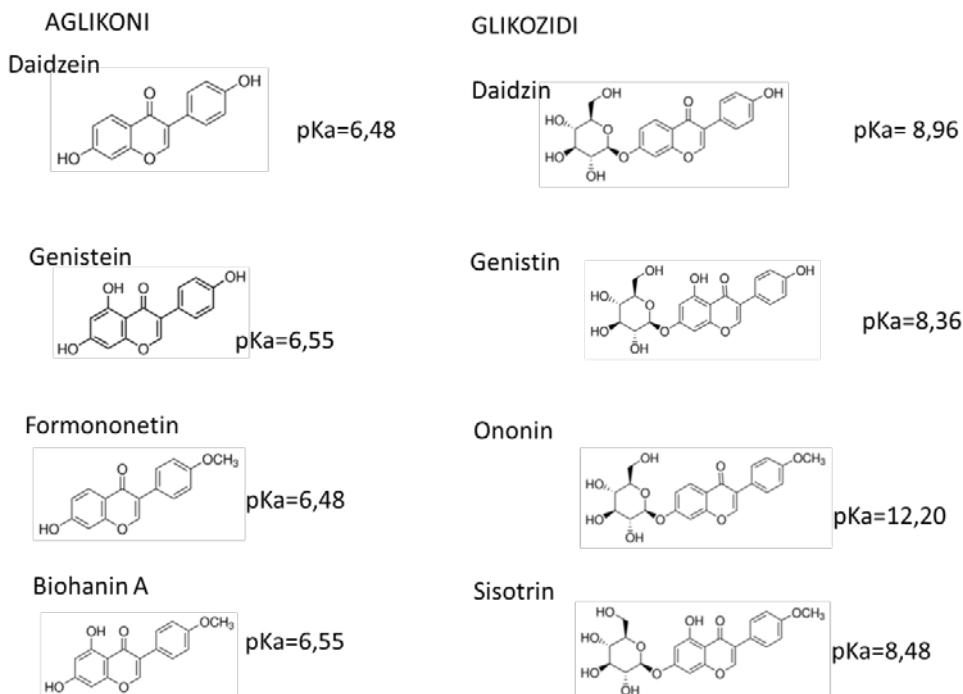
**Slika 22.** Preklopljeni kromatogrami biohanina A pri različitim pH-vrijednostima



- pH 9
- pH 5
- pH 4
- pH 3

**Slika 23.** Preklopljeni kromatogrami isoflavona A pri različitim pH-vrijednostima

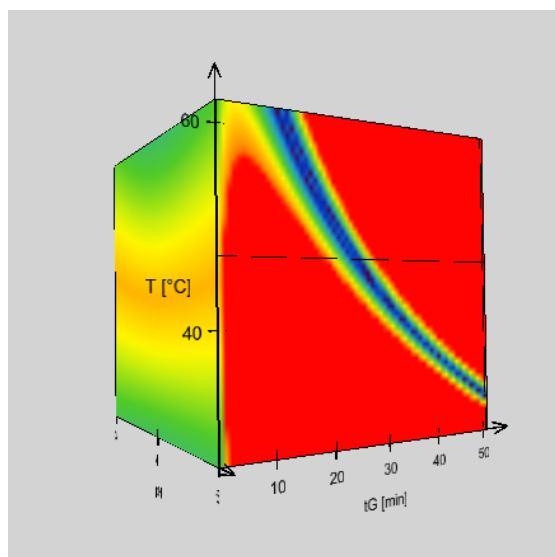
Gore navedeni aglikoni imaju niže  $pK_k$  vrijednosti od glikozida (slika 24.) te im zbog toga i odgovara područje nižih pH-vrijednosti, a pri višim pH-vrijednostima izgled kromatografskih krivulja im nije pravilan.



**Slika 24.** Razlika  $pK_k$  vrijednosti aglikona i glikozida

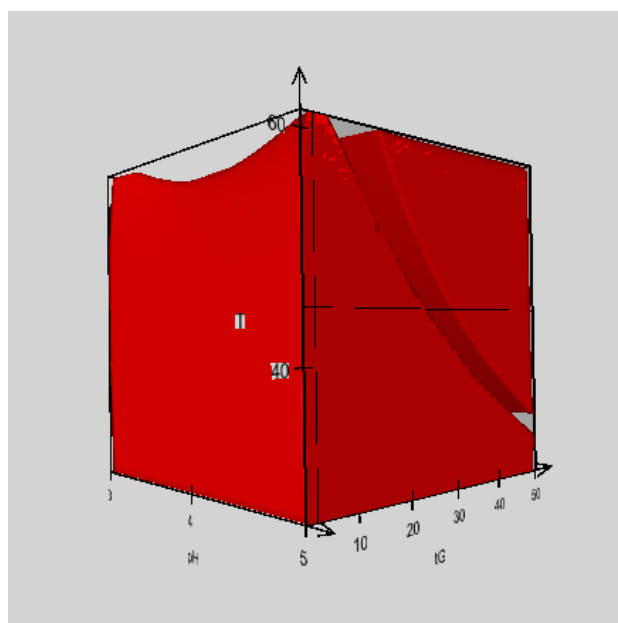
#### 4.2. Eksperimentalni dizajn

Nakon što su u DryLab uneseni kromatogrami dobiveni tijekom razvoja metode, svi korišteni uvjeti (pH-vrijednosti pokretne faze, vrijeme trajanja gradijenta ( $t_G$ ), temperatura i tip kolone) te kritični parametar ( $R_s = 1,5$ ), dobiven je grafički prikaz u kojem crvena boja predstavlja područje najboljeg razdvajanja, a plava boja područje najlošijeg razdvajanja (slika 25).



**Slika 25.** Grafički prikaz iz programa DryLab na temelju prvotno postavljenih parametara

Nakon prvotnih izračuna, namješten je gradijent dodatno da ide do 95% organske pokretne faze do treće minute. Ponovno je izvršeno računanje uz nove uvjete i dobiveni rezultat bio je znatno bolji. Dobivena kocka gotovo cijela je crvene boje što upućuje na to da je novodobivena metoda robusna u širokom području i da promjena pojedinih eksperimentalnih uvjeta neće značajnije negativno utjecati na razdvajanje molekula.



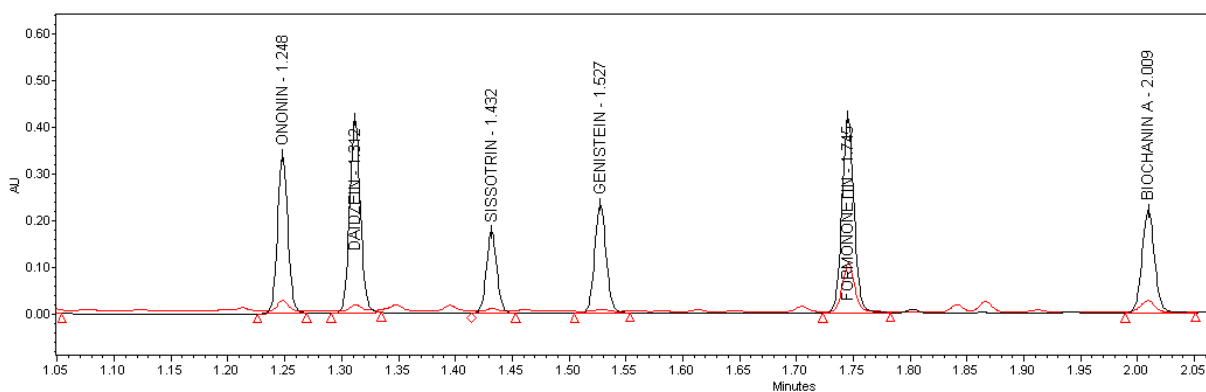
**Slika 26.** Grafički prikaz iz programa DryLab nakon promijenjenog vremena trajanja gradijenta

### 4.3. Validacija metode

Nakon što su dobiveni najbolji uvjeti za razdvajanje ispitivanih fitoestrogena primjenom eksperimentalnog dizajna primjenom programa *DryLab4 HPLC Modeling Software* sastavljena je nova metoda sa sljedećim eksperimentalnim uvjetima: pH-vrijednost fosfatnog pufera korištenog kao vodena pokretna faza 3,5, kolona AGILENT Zorbax EclipsePlusC18 RRHD 1,8  $\mu\text{m}$ ; 2,1 x 50 mm, temperatura kolone 45  $^{\circ}\text{C}$ , vrijeme trajanja gradijenta 3 minute (tablica 13.). Ta metoda je validirana kako je opisano u poglavlju 3.3.2.

#### 4.3.1. Specifičnost/selektivnost metode

Metoda razvijena u ovome radu jest selektivna metoda jer se može dobro razlučiti svih osam ispitivanih fitoestrogena, što je potvrđeno usporedbom kromatograma komercijalnog uzorka *N* s kromatogramom standardnih otopina pojedinih fitoestrogena (slika 27).



**Slika 27.** Preklapljeni kromatogram pojedinačnih standarada fitoestrogena (crno) s komercijalnim uzorkom *N* (crveno)

Dobro kromatografsko razlučivanje fitoestrogena potvrđuje i velika vrijednost faktora razlučivanja između dvije kromatografske krivulje što je vidljivo u tablici 14. Podaci su preuzeti iz programskog paketa *Empower* uz pomoć kojega su analizirani dobiveni kromatogrami.

**Tablica 14.** Pregled kromatografskih parametara

<b>Analit</b>	<b>Vrijeme zadržavanja (min)</b>	<b>Faktor razlučivanja (<math>R_s</math>)</b>
Daidzin	0,668	-
Genistin	0,778	5,91
Ononin	0,938	8,29
Daidzein	0,994	2,81
Sisotrin	1,070	3,78
Genistein	1,151	3,93
Formononetin	1,310	7,48
Biohanin A	1,500	8,93

#### 4.3.2. Linearnost

Linearnost je ispitana na način kako je opisano u poglavlju 3.3.2.1.. Nakon provedenih analiza, za svaki ispitivni fitoestrogeni (daidzin, genistin, ononin, daidzein, sisotrin, genistein, formononetin, biohanin A) izrađen je umjerni pravac. Za sve ispitivane fitoestrogene iz njihovih umjernih pravaca određen je nagib i odsječak pravca te koeficijent determinacije ( $r^2$ ), što je prikazano u tablici 15. Za sve fitoestrogene zadovoljen je zahtjev prihvatljivosti jer je koeficijent determinacije je veći od 0,9990 što znači da je uspješno potvrđena linearna ovisnost površine ispod kromatografske krivulje o koncentraciji fitoestrogena. U poglavlju prilozi, od P.29. do P.46., prikazani su kromatogrami pri svim ispitivanim koncentracijama fitoestrogena (2,5-500  $\mu\text{g/mL}$ ) te umjerni pravci za sve ispitivane molekule.

**Tablica 15.** Podaci dobiveni ispitivanjem linearnosti metode

<b>Analit</b>	<b>Linearno područje (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Koeficijent determinacije <math>r^2</math></b>	<b>Odsječak</b>	<b>Nagib</b>
Daidzin	2,45-70	0,9997	3043,6	$4,4 \cdot 10^6$
Genistin	2,50-70	1,0000	1134,8	$3,8 \cdot 10^6$
Ononin	3,0-86	0,9999	1062,6	$4,5 \cdot 10^6$
Daidzein	2,36-67	0,9999	1137,5	$9,6 \cdot 10^6$
Sisotrin	2,50-70	0,9999	763,9	$3,5 \cdot 10^6$
Genistein	2,50-70	0,9999	1069,0	$6,5 \cdot 10^6$
Formononetin	2,51-71	0,9999	1223,7	$8,8 \cdot 10^6$
Biohanin A	2,54-72	0,9995	3448,0	$5,2 \cdot 10^6$

Najmanja koncentracija u linearnom području odabrana je kao granica kvantifikacije (GK) uz uvjet da je omjer signala i šuma manji od 10. Za granicu dokazivanja (GD) uzeta je koncentracija upola manja od granice kvantifikacije uz uvjet da je omjer signala i šuma manji od 3. U tablici 16. prikazane su granice dokazivanja i kvantifikacije ispitivanih fitoestrogena.

**Tablica 16.** Granice dokazivanja i kvantifikacije ispitivanih fitoestrogena

<b>Analit</b>	<b>GD (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>GK (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
Daidzin	1,225	2,45
Genistin	1,25	2,50
Ononin	1,50	3,0
Daidzein	1,18	2,36
Sisotrin	1,25	2,50
Genistein	1,25	2,50
Formononetin	1,255	2,51
Biohanin A	1,27	2,54

#### 4.3.3. Preciznost

U okviru ispitivanja preciznosti ispitana je ponovljivost i međupreciznost u skladu s opisanim u poglavlju 3.3.2.3.

##### 4.3.3.1. Ponovljivost

Svih šest pripremljenih otopina komercijalnog uzorka C u koji je dodano 10  $\mu\text{L}$  temeljne standardne otopine injektirano je tri puta. Za svako injektiranje u programu *Empower* iz dobivenog kromatograma određene su vrijednosti vremena zadržavanja ( $t_R/\text{min}$ ) i površine kromatografske krivulje pojedinog fitoestrogena. Iz dobivenih podataka izračunato je relativno standardno odstupanje (RSD/%) kao omjer standardnog odstupanja i srednje vrijednosti vremena zadržavanja, koncentracije fitoestrogena za tri injektiranja pojedine otopine.

##### 4.3.3.2. Međupreciznost

Međupreciznost je ispitana dan nakon ispitivanja ponovljivosti i na drugom instrumentu jednakih karakteristika. Ispitivanje i analiza rezultata provedeni su na jednak način kao i kod određivanja ponovljivosti. Konačne vrijednosti dobivene kod ispitivanja ponovljivosti i

mjerenja drugog dana provedenog za ispitivanje međupreciznosti uspoređene su međusobno i između njih je određeno relativno standardno odstupanje (RSD/%).

U tablici 17. prikazani su dobiveni rezultati ispitivanja ponovljivosti i međupreciznosti. Za oba kriterija određena za svaki fitoestrogena, relativno standardno odstupanje manje je od 10 % što znači da su i ponovljivost i međupreciznost uspješno potvrđeni.

**Tablica 17.** Rezultati ispitivanja ponovljivosti i međupreciznosti

<b>Analit</b>	<b>Ponovljivost (RSD, %)</b>	<b>Međupreciznost (RSD, %)</b>
Daidzin	1,51	0,18
Genistin	1,25	0,52
Ononin	1,12	0,41
Daidzein	1,50	0,43
Sisotrin	1,84	0,63
Genistein	2,01	0,20
Formononetin	1,32	0,47
Biohanin A	1,02	0,53

#### 4.3.4. Točnost

U poglavlju 3.3.2.2. opisan je način ispitivanja točnosti metode. Nakon provedene kromatografske analize, iz dobivenih kromatograma standardnih otopina koncentracija 2,5 (GK), 30 i 70  $\mu\text{g/mL}$  te otopina komercijalnog uzorka C u koje su dodane prethodno navedene koncentracije otopina fitoestrogena očitane su vrijednosti površine kromatografskih krivulja pojedinih molekula fitoestrogena. Svaka otopina injektirana je tri puta tako da je u konačnici izračunato relativno standardno odstupanje (RSD, %) između površina kromatografskih krivulja te iskorištenje između standardne otopine određene koncentracije i otopine komercijalnog uzorka u koju je dodana standardna otopina iste koncentracije. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 18. Za sve fitoestrogene, pri svim ispitanim koncentracijskim iskorištenje je između 80 i 120 % uz RSD manji od 1 %, što znači da je točnost uspješno potvrđena.

**Tablica 18.** Rezultati ispitivanja točnosti metode

<b>Analit</b>	<b>Koncentracija (µg/mL)</b>	<b>Iskorištenje (%) ± RSD (%)</b>
Daidzin	2,45 (GK)	97,5 ± 0,4
	30	100,6 ± 0,3
	70	101,5 ± 0,3
Genistin	2,50 (GK)	97,3 ± 0,4
	30	100,7 ± 0,1
	70	101,5 ± 0,3
Ononin	3,0 (GK)	97,2 ± 0,4
	30	100,7 ± 0,2
	70	101,6 ± 0,3
Daidzein	2,36 (GK)	97,5 ± 0,5
	30	100,5 ± 0,3
	70	101,6 ± 0,2
Sisotrin	2,50 (GK)	98,1 ± 0,4
	30	100,6 ± 0,2
	70	101,5 ± 0,3
Genistein	2,50 (GK)	98,2 ± 0,9
	30	100,5 ± 0,1
	70	101,5 ± 0,3
Formononetin	2,51 (GK)	90,7 ± 0,2
	30	100,4 ± 0,2
	70	101,4 ± 0,2
Biohanin A	2,54 (GK)	99,1 ± 0,3
	30	100,5 ± 0,2
	70	101,4 ± 0,2

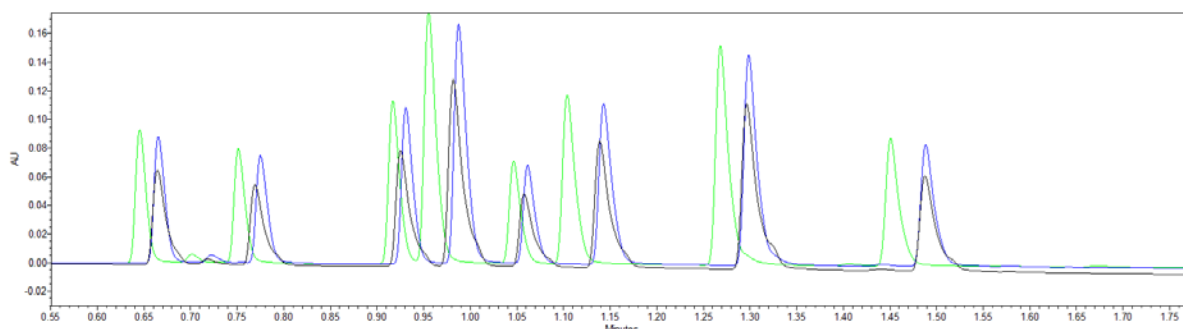
#### 4.3.5. Robusnost

U svrhu ispitivanja robusnosti, u skladu s opisom u poglavlju 3.3.2.4., ispitan je utjecaj promjene sljedećih parametri: temperatura kolone, protok pokretne faze i pH-vrijednost fosfatnog pufera korištenog kao vodena pokretna faza. Analizirana je ista otopina u svim uvjetima. Metoda je robusna jer je na svim kromatogramima, pri svim ispitivanim uvjetima, kritični parametar, faktor razlučivanja, veći od 1,5.

##### 4.3.5.1. Promjena temperature kolone

U optimalnoj metodi, temperatura kolone je 45 °C, a za potrebe ispitivanja robusnosti ispitane su temperature kolone od 40 °C i 50 °C. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se smanjenjem temperature od 50 °C do 40 °C povećava vrijeme zadržavanja (slika 28).

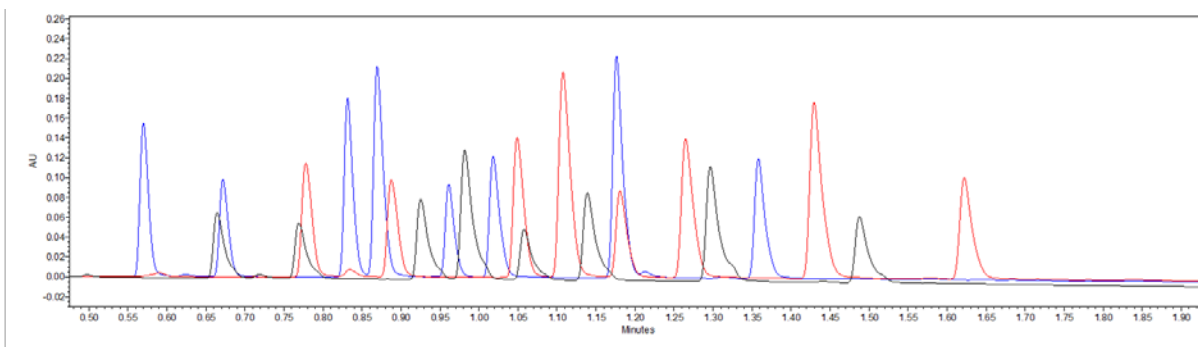




**Slika 28.** Preklopljeni kromatogram rezolucijske otopine ( $\gamma = 30 \mu\text{g/mL}$ ) pri različitim temperaturama kolone (zeleno:  $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$ , plavo:  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ , crno:  $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$ )

#### 4.3.5.2. Promjena protoka pokretne faze

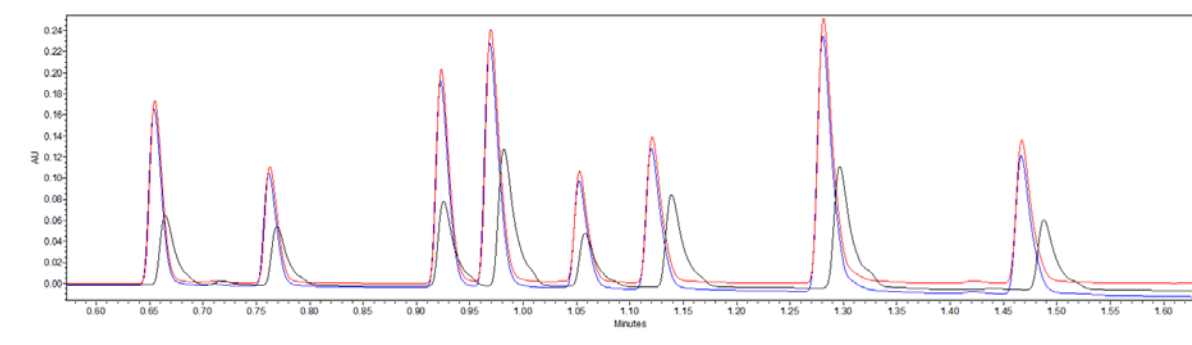
Protok pokretne faze prema optimalnoj metodi iznosi  $0,5 \text{ mL/min}$ , a za potrebe ispitivanja robusnosti korišteni su protoci  $0,4 \text{ mL/min}$  i  $0,6 \text{ mL/min}$ . Smanjenjem protoka pokretne faze od  $0,6 \text{ mL/min}$  do  $0,4 \text{ mL/min}$ , povećava se vrijeme zadržavanja pojedinih fitoestrogena na koloni, što je vidljivo na slici 29.



**Slika 29.** Preklopljeni kromatogram rezolucijske otopine ( $\gamma = 30 \mu\text{g/mL}$ ) pri različitim protocima pokretne faze (crveno: protok =  $0,4 \text{ mL/min}$ , plavo: protok =  $0,6 \text{ mL/min}$ , crno: protok =  $0,5 \text{ mL/min}$ )

#### 4.3.5.3. Promjena pH-vrijednosti pokretne faze

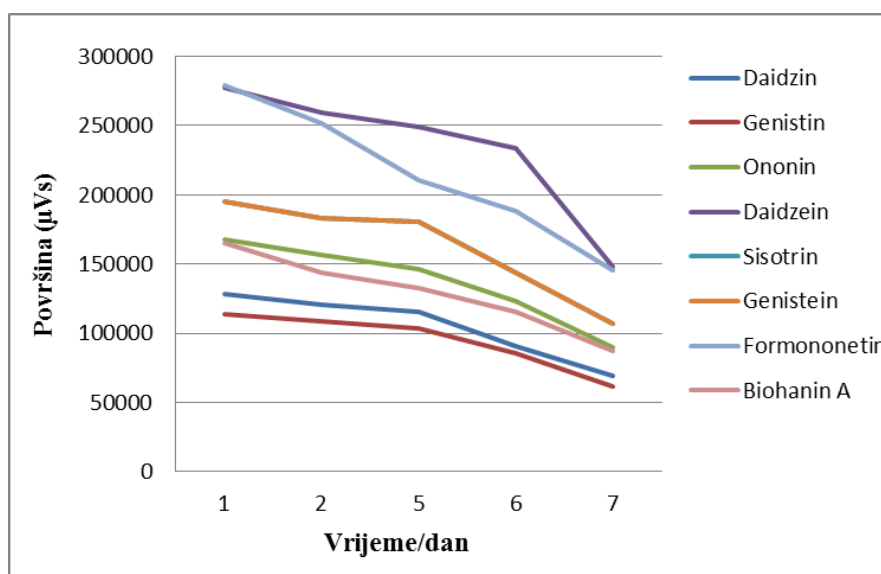
pH-vrijednost fosfatnog pufera korištenog kao vodena pokretna faza iznosi  $3,50$ , a za potrebe ispitivanja robusnosti ispitane su vrijednosti  $3,25$  i  $3,75$ . Prema dobivenim rezultatima, pri pH-vrijednostima  $3,25$  i  $3,75$  vrijeme zadržavanja pojedinih fitoestrogena na koloni je kraće nego pri pH-vrijednosti  $3,50$  (slika 30).



**Slika 30.** Preklapljeni kromatogram rezolucijske otopine ( $\gamma= 30 \mu\text{g/mL}$ ) pri različitim pH vrijednostima pokretne faze (crveno: pH=3,75, plavo: pH=3,25, crno: pH=3,50)

#### 4.3.6. Stabilnost otopine fitoestrogena

Stabilnost otopine fitoestrogena praćena je u vremenskom periodu od tjedan dana kako je opisano u poglavlju 3.3.2.5. Prema dobivenim rezultatima (slika 31), vidljivo je da se površina ispod kromatografskih krivulja pojedinih molekula smanjuje s vremenom, što upućuje na to da dolazi do razgradnje molekula fitoestrogena u otopini. Svakog dana izvršeno je samo jedno mjerenje te se ne može s valjanom preciznošću odrediti unutar kojeg vremenskog razdoblja je stabilna standardna otopina pojedinog fitoestrogena. Stabilnost bi valjalo ispitati pri različitim temperaturama te vršiti mjerenja u kraćim vremenskim intervalima (npr. svakih nekoliko sati).



**Slika 31.** Rezultati ispitivanja stabilnosti otopine fitoestrogena

#### 4.4. Analiza komercijalnih uzoraka

U tablici 19. prikazani su rezultati analize 17 komercijalnih uzoraka koji se na tržištu nalaze u obliku dodataka za prehranu namijenjenih ženama u menopauzi i oboljelima od osteoporoze. U tim dodacima nalaze se ekstrakti različitih biljaka među kojima su soja i livadna djetelina koje posjeduju molekule fitoestrogena (daidzin, genistin, ononin, daidzein, sisotrin, genistein, formononetin, biohanin A) a koje su bile predmet ovoga istraživanja. Dobiveni rezultati ispitivanja masenih udjela ispitivanih fitoestrogena u komercijalnim uzorcima uspoređeni su s deklaracijama na omotima komercijalnih uzoraka (tablici 19).

**Tablica 19.** Rezultati analize sadržaja komercijalnih uzoraka

Simbol komercijalnog uzorka	Deklaracija	Rezultati analize (w/%)
<b>A</b>	100g sadrži: 6,7g suhog ekstrakta listova s cvijetom ( <i>Trifolium pratense L.</i> ) (8 % izoflavona) + 8,7 g suhog ekstrakta sjemenki soje ( <i>Soia hispida Moench.</i> ) koja nije genetski modificirana: 40 % izoflavona	Daidzin 0,19 % Daidzein 3,32 % Genistein 0,90 % Formononetin 0,35 %
<b>B</b>	100g sadrži: 6,7g suhog ekstrakta listova s cvijetom ( <i>Trifolium pratense L.</i> ) (8 % izoflavona) + 8,7 g suhog ekstrakta sjemenki soje ( <i>Soia hispida Moench.</i> ) koja nije genetski modificirana: 40 % izoflavona	Daidzein 1,29 % Genistein 0,40 % Formononetin 0,40 % Biohanin A 0,19 %
<b>C</b>	suhi ekstrakt podanka cimicifuge ( <i>Cimicifuga racemosa</i> ): u 1 kapsuli 7,5 mg	Ne sadrži nijednu od istraživanih molekula.
<b>D</b>	1 kapsula: 200 mg ekstrakta zrna soje: 40 % izoflavona (20 % genisteina + 15,5 % daidzina)	Daidzin 3,49 % Genistin 4,35 % Daidzein 0,10 %
<b>E</b>	ekstrakt soje ( <i>Glycine max</i> ): garantirano 40 % izoflavona (22 % genistin + 17 % daidzin)	Daidzin 2,94 % Genistin 4,75 % Daidzein 0,45 % Genistein 0,08 %
<b>F</b>	750 mg koncentrata genetski nemodificirane soje: 3 % izoflavona (daidzin & daidzein = 1,6 % + genistin & genistein = 0,33 %)	Daidzin 0,80 % Genistin 0,18 % Ononin 0,02 % Daidzein 0,02 %

<b>G</b>	1 tableta: 52,3 mg koncentrata soje: 40 % izoflavona	Daidzin 0,76 % Genistin 0,93 %
<b>H</b>	1 kapsula: 750 mg koncentrata genetski nemodificirane soje -> 3 % izoflavona -14,5mg (daidzin & daidzein = 1,6 %-12mg + genistin & genistein = 0,33 %- 2,5mg)	Daidzin 0,37 % Genistin 0,12 %
<b>I</b>	1 tableta: 52,3 mg koncentrata soje: 40 % izoflavona	Daidzin 0,80 % Genistin 1,12 %
<b>J</b>	soy bean extract (7 mg izoflavona: 6 mg genisteina (36 %))	Daidzin 0,97 % Genistin 0,21 % Daidzein 0,06 %
<b>K</b>	100 g suhog ekstrakta crvene (livadne) djeteline ( <i>Trifolium pratense L.</i> ): 40 % izoflavona	Sisotrin 0,84 % Formononetin 2,62 % Biohanin A 2,24 %
<b>L</b>	1 kapsula: 41 mg suhog ekstrakta ploda soje ( <i>Glycine max</i> ): 39 % izoflavona	Daidzin 1,27 % Genistin 1,43 % Daidzein 0,05 %
<b>M</b>	cvijet crvene (livadne) djeteline ( ( <i>Trifolium pratense</i> ): genistein i daidzein	Genistin 0,10 % Ononin 0,04 % Sisotrin 0,12 % Genistein 0,02 % Formononetin 0,06 % Biohanin A 0,08 %
<b>N</b>	cvijet crvene (livadne) djeteline ( ( <i>Trifolium pratense</i> ): genistein i daidzein	Daidzin 0,01 % Genistin 0,01 % Ononin 0,04 % Daidzein 0,02 % Sisotrin 0,02 % Genistein 0,01 % Formononetin 0,15 % Biohanin A 0,07 %
<b>O</b>	1 kapsula: 200 mg ekstrakta zrna soje: 40 % izoflavona (20 % genisteina + 15,5 % daidzina)	Daidzin 4,10 % Genistin 5,35 %
<b>P</b>	ekstrakt soje ( <i>Glycine max</i> ): garantirano 40 % izoflavona (22 % genistin + 17 % daidzin)	Daidzin 2,25 % Genistin 3,67 % Daidzein 0,42 %
<b>R</b>	1 tableta: 50 mg ekstrakta livadne djeteline: najmanje 20 % izoflavona	Daidzein 0,07 % Genistein 0,06 % Formononetin 0,84 % Biohanin A 0,15 %

Prema dobivenim rezultatima analize sadržaja komercijalnih uzoraka (A-S), vidljivo je da je maseni udio ispitivanih molekula fitoestrogena u komercijalnim uzorcima izrazito nizak te da varira ovisno o tome iz koje biljke i kojeg dijela biljke su dobiveni ekstrakti koji su dalje

prevedeni u dodatke za prehranu. Sadržaj ovisi i o tome koliki je ukupni maseni udio ekstrakta u cijeloj kapsuli. Također, jedini uzorak koji je pokazao da ne sadrži molekule fitoestrogena jest komercijalni uzorak C. To svakako ima smisla jer je to jedini uzorak čiji je suhi ekstrakt iz podanka biljke cimicifuge (*Cimicifuga racemosa*) za koju se zna da ne sadrži molekule fitoestrogena [57,58]. Usporedbom deklaracija i eksperimentalno dobivenog sadržaja pojedinog uzorka, vidljivo je da su deklaracije oskudne i neprecizne.

## 5. ZAKLJUČAK

Uspješno je razvijena UHPLC metoda za kvantifikaciju osam fitoestrogena (daidzin, daidzein, genistin, genistein, sisotrin, ononin, biohanin A, formononetin). Korištenjem računalnog programa DryLab određeni su optimalni eksperimentalni uvjeti:

1. vodena pokretna faza: 10 mmol/L fosfatni pufer (pH-vrijednost = 3,50)  
organska pokretna faza: acetonitril
2. kolona: AGILENT Zorbax EclipsePlusC18 RRHD 1,8  $\mu\text{m}$ ; 2,1 x 50 mm
3. temperatura kolone: 45 °C
4. protok pokretne faze: 0,5 mL/min
5. eluiranje: gradijentno
6. vrijeme trajanja gradijenta: 3 minute.

Razvijena metoda uspješno je validirana jer su sve izvedbene značajke unutar granica prihvatljivosti:

1. Metoda razvijena u ovome radu jest selektivna jer se može dobro razlučiti svih osam ispitivanih fitoestrogena, što je potvrđeno usporedbom kromatograma komercijalnog uzorka *N* s kromatogramom standardnih otopina pojedinih fitoestrogena.
2. Dobro kromatografsko razlučivanje fitoestrogena potvrđuje i velika vrijednost faktora razlučivanja između dvije kromatografske krivulje. Premda je vrijednost faktora razlučivanja bila kritičan parametar za eksperimentalni dizajn u DryLab-u, ovime je potvrđeno poklapanje predviđanja DryLab-a i eksperimentalno dobivenih vrijednosti jer su veće od 1,5.
3. Za sve fitoestrogene, koeficijent determinacije veći je od 0,9990 što znači da je uspješno potvrđena linearna ovisnost površine ispod kromatografske krivulje o koncentraciji fitoestrogena. Metoda je linearna u području 2,5-70  $\mu\text{g/mL}$  za sve fitoestrogene, osim za ononin i daidzin. Za ononin je linearnost potvrđena u koncentracijskom području od 3,0-86  $\mu\text{g/mL}$ , a za daidzin 2,45-70  $\mu\text{g/mL}$ .
4. Granice kvantifikacije i granice dokazivanja za ispitivane fitoestrogene određene su na temelju omjera signala i šuma i iznose. Granica kvantifikacije daidzina je 1,225  $\mu\text{g/mL}$ , a granica dokazivanja mu je 2,45  $\mu\text{g/mL}$ . Granica kvantifikacije genistina je 1,25  $\mu\text{g/mL}$ , a granica dokazivanja mu je 2,50  $\mu\text{g/mL}$ . Granica kvantifikacije ononina je 1,50  $\mu\text{g/mL}$ , a granica dokazivanja mu je 3,0  $\mu\text{g/mL}$ . Granica kvantifikacije daidzeina je 1,18  $\mu\text{g/mL}$ , a granica dokazivanja mu je 2,36  $\mu\text{g/mL}$ . Granica

kvantifikacije sisotrina je 1,25 µg/mL , a granica dokazivanja mu je 2,50 µg/mL. Granica kvantifikacije genisteina je 1,25 µg/mL , a granica dokazivanja mu je 2,50 µg/mL. Granica kvantifikacije formononetina je 1,255 µg/mL , a granica dokazivanja mu je 2,51 µg/mL. Granica kvantifikacije biohanina A je 1,27 µg/mL , a granica dokazivanja mu je 2,54 µg/mL.

5. Preciznost metode ispitana je pomoću dva kriterija: ponovljivost i međupreciznost. Za oba kriterija ispitana za svaki fitoestrogen, relativno standardno odstupanje manje je od 10 % što znači da su ponovljivost i međupreciznost uspješno potvrđeni.
6. Točnost metode ispitana je pri tri koncentracije: 2,5 (GK), 30 i 70 µg/mL. Za sve fitoestrogene, pri svim ispitanim koncentracijama postignuto je iskorištenje između 80 % i 120 % uz RSD manji od 1 %, što znači da je točnost uspješno potvrđena.
7. Robusnost metode ispitana je promjenom sljedećih parametara: temperatura kolone, protok pokretne faze i pH-vrijednost fosfatnog pufera korištenog kao pokretna faza. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da:
  - a) smanjenjem temperature od 50 °C do 40 °C, povećava se vrijeme zadržavanja
  - b) smanjenjem protoka pokretne faze od 0,6 mL/min do 0,4 mL/min, povećava se vrijeme zadržavanja pojedinih fitoestrogena na koloni
  - c) pri pH-vrijednostima 3,25 i 3,75 vrijeme zadržavanja pojedinih fitoestrogena na koloni kraće je nego pri pH-vrijednosti 3,50Metoda je robusna jer je na svim kromatogramima, pri svim ispitivanim uvjetima, kritični parametar, faktor razlučivanja, veći od 1,5.

8. Stabilnost otopine fitoestrogena praćena je u vremenskom periodu od tjedan dana. Prema dobivenim rezultatima, vidljivo je da se površina ispod kromatografskih krivulja pojedinih analita smanjuje s vremenom, što upućuje na to da dolazi do razgradnje molekula fitoestrogena u otopini.

Prema dobivenim rezultatima analize sadržaja komercijalnih uzoraka (A-R), da je maseni udio ispitivanih molekula fitoestrogena u komercijalnim uzorcima izrazito nizak te da varira ovisno o tome iz koje biljke i kojeg dijela biljke su dobiveni ekstrakti koji su dalje prevedeni u dodatke za prehranu. Sadržaj ovisi i o tome koliki je ukupni maseni udio ekstrakta u cijeloj kapsuli. Također, jedini uzorak koji je pokazao da ne sadrži molekule fitoestrogena jest komercijalni uzorak C. To svakako ima smisla jer je to jedini uzorak čiji je suhi ekstrakt iz podanka biljke cimicifuge (*Cimicifuga racemosa*) za koju se zna da ne sadrži molekule

fitoestrogena. Usporedbom deklaracija i eksperimentalno dobivenog sadržaja pojedinog uzorka, vidljivo je da su deklaracije oskudne i neprecizne.



## 6. LITERATURA

1. L. Nikolić, Uloga mikroorganizama pri izolaciji biološki aktivnih tvari, završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet, 2016.
2. V. Gašparević-Ivanek, Fitoestrogeni, *Medix: specijalizirani medicinski dvomjesečnik*, 9 (2003) 90-94.
3. M. Mostrom, T. J. Evans, Phytoestrogens, *Veterinary Toxicology*, 3. izdanje, Elsevier, Amsterdam, (2018). 817-833.
4. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=aglikon> (pristup:15. lipnja 2019.)
5. H. B. Patisaul, W. Jefferson, The pros and cons of phytoestrogens, *Frontiers in Neuroendocrinology* , 31 (2010) 400-419.
6. <https://www.sciencedirect.com/search?q=phytoestrogen&show=25&sortBy=relevance&origin=home&zone=qSearch> (pristup: 15. lipnja 2019.)
7. J.P. Fan, D. Yang, X.K. Xu, X.J. Guo, X.H. Zhang, Solubility of daidzin in different organic solvents and (ethyl alcohol + water) mixed solvents, *J. Chem. Thermodynamics* 88(2015) 85.–89.
8. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0033991> (pristup: 15. lipnja 2019.)
9. W.M. Keung, B.L. Vallee, Daidzin and its antidipsotropic analogs inhibit serotonin and dopamine metabolism in isolated mitochondria, *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 95(5)(1998) 2198.–2203.
10. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Daidzin> (pristup: 15. lipnja 2019.)
11. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB02115> (pristup: 15. lipnja 2019.)
12. <https://www.abcam.com/genistin-isoflavone-glycoside-ab141395.html> (pristup: 15. lipnja 2019.)
13. N. Slade, Metode u molekularnoj biologiji: *Enzimatski test za utvrđivanje apoptoze u pojedinačnoj stanici (TUNEL)*, Institut Ruđer Bošković(2007) 787.-789.
14. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Genistin> (pristup: 15. lipnja 2019.)
15. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0033988> (pristup: 15. lipnja 2019.)
16. <https://lktlabs.com/product/genistin/> (pristup: 15. lipnja 2019.)
17. L. Dong , L. Yin , Y. Zhang, X. Fu, J. Lu, Anti-inflammatory effects of ononin on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells, *Molecular Immunology* 83(2017) 46.–51.
18. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ononin> (pristup: 15. lipnja 2019.)

19. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0033987> (pristup: 15. lipnja 2019.)
20. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0033990> (pristup: 15. lipnja 2019.)
21. Z. Aubhishek, S. Farhana, Prediction of molecular target of sissotrin using docking techniques, *Global J Res. Med. Plants & Indigen. Med.* (vol. 1, br. 11) (2012)583.–598.
22. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sissotrin#section=2D-Structure> (pristup: 15. lipnja 2019.)
23. G. Huang, J. Xu, T.L. Guo, Isoflavone daidzein regulates immune responses in the B6C3F1 and nonobese diabetic (NOD) mice, *International Immunopharmacology* 71 (2019) 277.–284.
24. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/daidzein> (pristup: 15. lipnja 2019.)
25. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB13182> (pristup: 15. lipnja 2019.)
26. V. Mukund, D. Mukund, V. Sharma, M. Mannarapu, A. Alam, Genistein: its role in metabolic diseases and cancer, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 119(2017) 13.–22.
27. B. Palacios-González, A. Vargas-Castillo, L.A. Velázquez-Villegas, S. Vasquez-Reyes, P. López, L.G. Noriega, G. Aleman, C. Tovar-Palacio, I. Torre-Villalvazo, L.J. Yang, A. Zarain-Herzberg, N. Torres, A.R. Tovar, Genistein increases the thermogenic program of subcutaneous WAT and increases energy expenditure in mice, *The Journal of Nutritional Biochemistry* (vol. 68)(2019) 59.-68.
28. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Genistein#section=2D-Structure> (pristup: 15. lipnja 2019.)
29. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01645> (pristup: 15. lipnja 2019.)
30. J. Zhang, L. Liu., J. Wang, B. Ren, L. Zhang, W. Li, Formononetin, an isoflavone from *Astragalus membranaceus* inhibits proliferation and metastasis of ovarian cancer cells, *Journal of Ethnopharmacology* 221, 2018., 91.–99.
31. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/formononetin> (pristup: 15. lipnja 2019.)
32. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB15335> (pristup: 15. lipnja 2019.)
33. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0002338> (pristup: 15. lipnja 2019.)
34. S. Raheja, A. Girdhar, V. Lather, D. Pandita, Biochanin A: A phytoestrogen with therapeutic potential, *Trends in Food Science & Technology* 79(2018) 55.–66.
35. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Biochanin-A> (pristup: 15. lipnja 2019.)
36. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB15334> (pristup: 15. lipnja 2019.)
37. <http://www.t3db.ca/toxins/T3D4886> (pristup: 15. lipnja 2019.)

38. <https://www.lktlabs.com/product/biochanin-a/> (pristup: 15. lipnja 2019.)
39. NJ. Radić, L. Kukoč, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb(2016)
40. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, (2003)
41. [https://www.chemicalbook.com/ProductCatalog\\_EN/1217.htm](https://www.chemicalbook.com/ProductCatalog_EN/1217.htm) (pristup: 15. lipnja 2019.)
42. T. Milekić, Razvoj UPLC metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za višekomponentne sustave ljekovitih supstancija anthelmintika, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet (2015)
43. I. Topalović, Hidrolitička i fotolitička razgradnja hidroksiklorokina u okolišu, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (2017)
44. J.M. Miller, *Chromatography: Concepts and Contrasts* (SECOND EDITION), John Wiley & Sons, Inc. (2005)
45. T. Škrinjar, Karakterizacija nepokretnih faza u kromatografiji reverznih faza ultravisoke djelotvornosti, , diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (2015)
46. E. Pek, Razvoj i validacija kromatografske metode za određivanje hidroksiklorokina, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (2017)
47. F. Car, Eksperimentalni dizajn i optimizacija analitičkog postupka, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (2016)
48. <http://molnar-institute.com/drylab/> (pristup: 16. lipnja 2019.)
49. [http://www.smatrix.com/fusion\\_lc\\_method\\_dev.html](http://www.smatrix.com/fusion_lc_method_dev.html) (pristup: 16. lipnja 2019.)
50. [https://www.mt.com/hr/hr/home/products/Laboratory\\_Weighing\\_Solutions/Analytical/Excellence/XPE\\_Analytical\\_Balance/XPE\\_205.html](https://www.mt.com/hr/hr/home/products/Laboratory_Weighing_Solutions/Analytical/Excellence/XPE_Analytical_Balance/XPE_205.html) ([pristup: 15. lipnja 2019.)
51. [https://www.mt.com/hr/hr/home/products/Laboratory\\_Analytics\\_Browse/pH-meter/benchtop-pH-meter/sevenexcellence/S400-Meter.html](https://www.mt.com/hr/hr/home/products/Laboratory_Analytics_Browse/pH-meter/benchtop-pH-meter/sevenexcellence/S400-Meter.html) (pristup 11. lipnja 2019.)
52. [https://www.waters.com/waters/en\\_HR/UPLC-UHPLC-system-with-quaternary-or-binary-solvent-management-for-methoddevelopment/nav.htm?cid=10138533&locale=en\\_HR](https://www.waters.com/waters/en_HR/UPLC-UHPLC-system-with-quaternary-or-binary-solvent-management-for-methoddevelopment/nav.htm?cid=10138533&locale=en_HR) (pristup 11. lipnja 2019.)
53. <http://www.directindustry.com/prod/waters/product-36060-602778.html> (pristup 11. lipnja 2019.)
54. International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM), 3. izdanje, JCGM 200:2012 (JCGM 200:2008 s manjim ispravkama)

55. Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija (ISO/IEC 17025:2017; EN ISO/IEC 17025:2017)
56. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: Second edition (2014)
57. <http://www.inpharma.hr/index.php/news/145/22/Cimicifuga-racemosa-i-menopauza> (pristup:24. lipnja 2019.)
58. <https://www.vasezdravlje.com/biljna-ljekarna/cimicifuga-ljekovita-biljka-bez-fitoestrogena> (pristup: 24. lipnja 2019.)

## ŽIVOTOPIS

Ines Topalović [REDACTED] je završila osnovnu i srednju školu. Godine 2017. završila je preddiplomski studij "Kemija i inženjerstvo materijala" na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu i te iste godine upisuje istoimeni diplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Tema završnog rada bila joj je "Hidrolitička i fotolitička razgradnja hidroksiklorokina u okolišu". Od listopada 2015. do siječnja 2016. radila je kao demonstrator u laboratoriju na Zavodu za opću i anorgansku kemiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Stručnu praksu odradila je u tvrtki PLIVA Hrvatska d.o.o. na odjelu TAPI, R&D, Analitika gdje je i godinu dana radila kao student. U sklopu stručne prakse izradila je rad *Analiza metala* (mentor: mag. ing. oecoinq. Valentino Sambolek, PLIVA Hrvatska d.o.o.). Tijekom svog studija, sudjelovala je u znanstveno-istraživačkom radu na Zavodu za analitičku kemiju (mentorica: dr. sc. Martina Biošić), Zavodu za tehnologiju nafte i petrokemiju (mentorica: prof. dr. sc. Elvira Vidović) te Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo (mentor: izv. prof. dr. sc. Krunoslav Žižek). Sudjelovala je na 12 stručnih konferencija i festivala:

- M. Biošić, I. Topalović, D. Dabić, F. Varga, M. Grdiša, Extraction of pyrethrins from dalmatian pyrethrum (*Tanacetum Cinerariifolium* /Trevir./Sch. Bip.) by matrix-solid phase dispersion, 10<sup>th</sup> CMAPSEEC:Book of Abstracts (2018.) 175-175. (postersko izlaganje)
- I. Topalović, R. Blažić, F. Faraguna, E. Vidović, Utjecaj molekulske mase na toplinsku stabilnost polilaktida, XII. Susret mladih kemijskih inženjera (SMLKI), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2018.) (postersko izlaganje)
- 50. simpozij Maziva & bazna ulja, Hotel Esplanade, Zagreb (pasivno)
- 1. ZORH Susret (Susret znanstvenika, stručnih djelatnika i studenata na temu zaštite okoliša u RH), Kemijsko-tehnološki fakultet, Split (2018.) (usmeno izlaganje)
- 4. Simpozij studenata kemičara, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (2017.) (pasivno)
- 5. Simpozij studenata kemičara, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (2018.) (pasivno)
- Festival znanosti, Tehnički muzej Nikola Tesla, Zagreb (2017.) (radionica)
- Festival znanosti, Tehnički muzej Nikola Tesla, Zagreb (2018.) (radionica)
- 1. Studentski kongres o inženjerstvu materijala, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2019.) (pasivno)
- LEAP Summit, Zagreb (2019.) (pasivno)
- 26. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Šibenik (2019.) (radionica)
- I. Topalović, D. Vidović, J. Barbarić, K. Žižek, Preparation and characterization of solid dispersions of a drug, Solid-State Science & Research Meeting, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (2019.)

Od dodatne edukacije pohodila je 8 stručnih radionica i seminara te školu kromatografije:

- 18<sup>th</sup> International Chromatography School, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (2018.)
- Budućnost ugodnost stanovanja, Arhitektonski i Građevinski fakultet, Zagreb (2018.)
- Budućnost ugodnost stanovanja, Arhitektonski i Građevinski fakultet, Zagreb (2019.)
- Polimeri iz perspektive kemičara i strojarara, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb (2018.)

- Radionica o NMR tehnici, Institut Ruđer Bošković (voditelj: doc. dr. sc. Tomislav Portada) (2018.)
- Ciklus radionica i predavanja o 3D printanju, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2018.)
- Prva radionica HDKI-HKD, Intelektualno vlasništvo i komercijalni nastup za novo eksperimentalno i tehnološko rješenje u organskoj kemiji, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (2017.)
- Primjena matematičkog modeliranja i numeričkih simulacija u kemijskoj procesnoj industriji, PLIVA Hrvatska d.o.o. (2017.)
- Moć scenskog govora i afektivna snaga rečenice, Bjelovar, 2014.

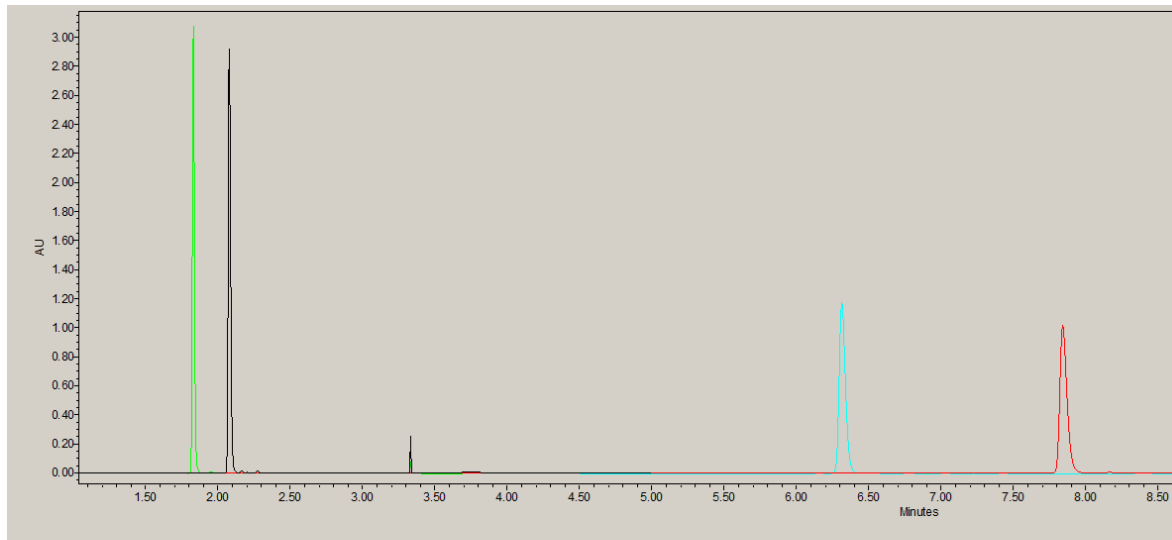
Tri akademske godine bila je članica Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI) gdje je sudjelovala na 10 projekata popularizacije znanosti:

- "Daj PET za naš planet!", Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2018.) (članica organizacijskog odbora)
- Business week – tjedan samozapošljavanja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2018.) (voditeljica projekta)
- 5. Sajam ideja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2018.) (voditeljica projekta)
- radionica "Otkrijmo tajne kemije" , Dan otvorenih vrata FKIT-a, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2018.) (voditelj organizacije radionice)
- Buddy projekt, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2018.) (članica organizacijskog odbora)
- Međusmjerovske igre, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2018.) (članica organizacijskog odbora)
- 2. ZORH (Susret znanstvenika, stručnih djelatnika i studenata na temu zaštite okoliša u RH, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split (2019.) (članica organizacijskog odbora)
- CSI: FKIT, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2019.) (članica organizacijskog odbora)
- Business week – Znanost počinje s tobom, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2019.) (članica organizacijskog odbora)
- Kemija svuda oko nas, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2019.) (voditeljica projekta)
- Boje inženjerstva (održane radionice u Bjelovaru, Brezovici, X. gimnaziji u Zagrebu, Virovitici, OŠ Ive Andrića u Zagrebu)

Bila je i glavna urednica časopisa "Reaktor ideja", službenog glasila Studentske sekcije HDKI-ja, od ožujka 2017. do lipnja 2018., za koji je 2019. godine dobila posebnu Rektorovu nagradu (*Rektorova Nagrada za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici za 2019. godinu u području tehničkih znanosti: Ines Topalović, Iva Pavičić, Kristina Kezerić, Tina Posedi, Nikolina Nascimento Mrakovčić, Igor Kultan, Tatjana Baković, Sandra Trstenjak, Mislav Matić, Matej Kadić, Marina Bekavac, Raphaela Mokrović, Paola Klonkay, Irena Milardović, Leo Bolješić, Aleksandra Brenko, Karla Ribičić, Helena Prpić, Časopis Reaktor ideja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije*). Od lipnja 2018. do lipnja 2019. godine bila je i predsjednica Studentske sekcije HDKI-ja. Od siječnja 2018. metrološka je urednica časopisa "Kemija u industriji". Sudjelovala je na državnom natjecanju LiDraNo 2014. te na tri županijska natjecanja LiDraNo 2014., LiDraNo 2013. i LIK 2010. Posjeduje certifikat o poznavanju njemačkog jezika (Deutsche Sprachdiplom).

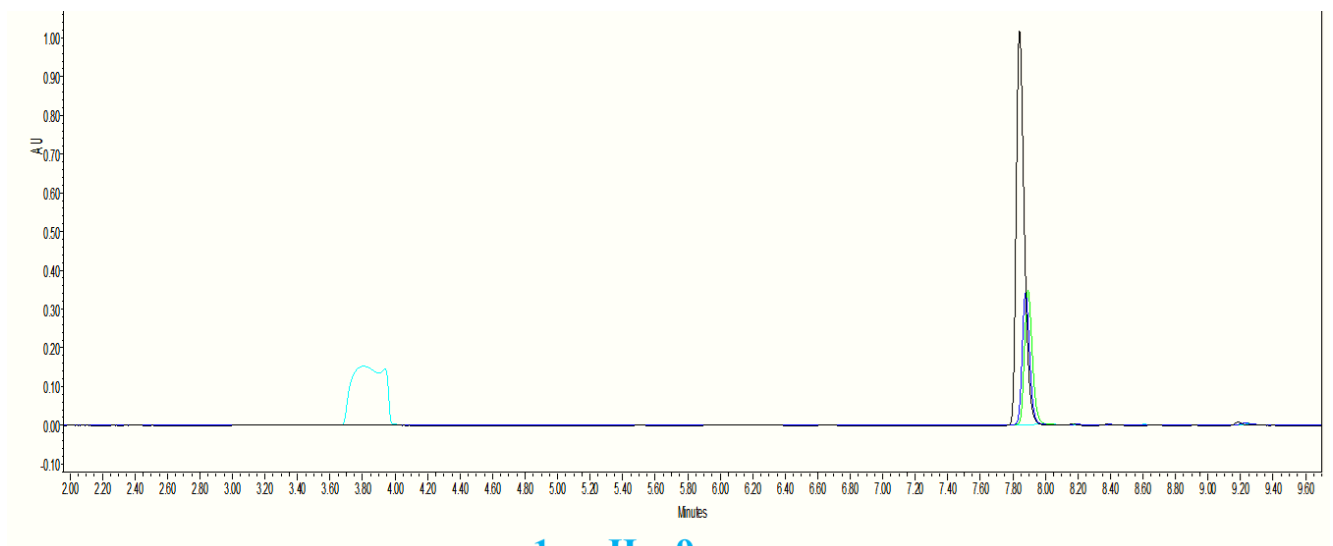
## PRILOZI

### P.1. Preklopljeni kromatogram genisteina pri različitim vremenima trajanja gradijenta (5 min, 23 min) i različitim temperaturama kolone (30 °C, 60 °C)



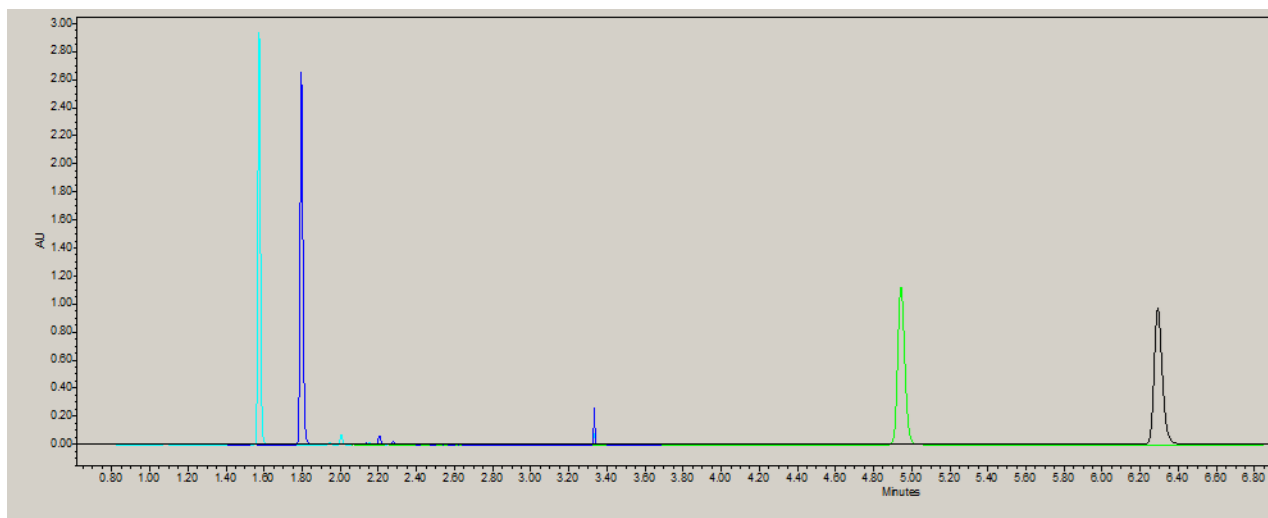
1. tg5T60
2. tgT30
3. tg23T60
4. tg23T30

### P.2. Preklopljeni kromatogram genisteina pri različitim pH-vrijednostima pokretne faze



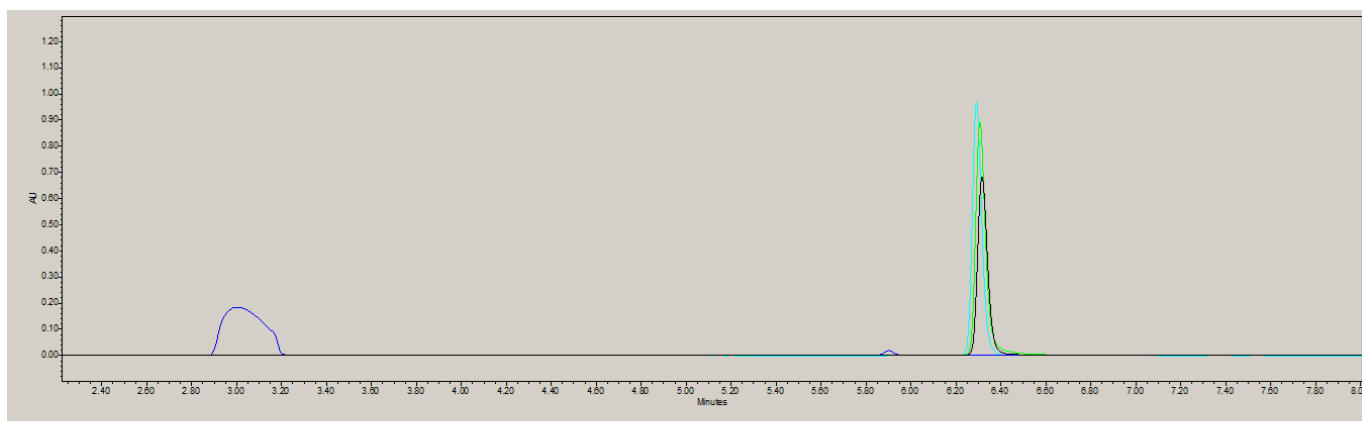
1. pH = 9
2. pH = 3
3. pH = 4
4. pH = 5

**P.3. Preklopljeni kromatogram daidzeina pri različitim vremenima trajanja gradijenta (5 min, 23 min) i različitim temperaturama kolone (30 °C, 60 °C)**



1. tg5T60
2. tg5T30
3. Tg23T60
4. tg23T30

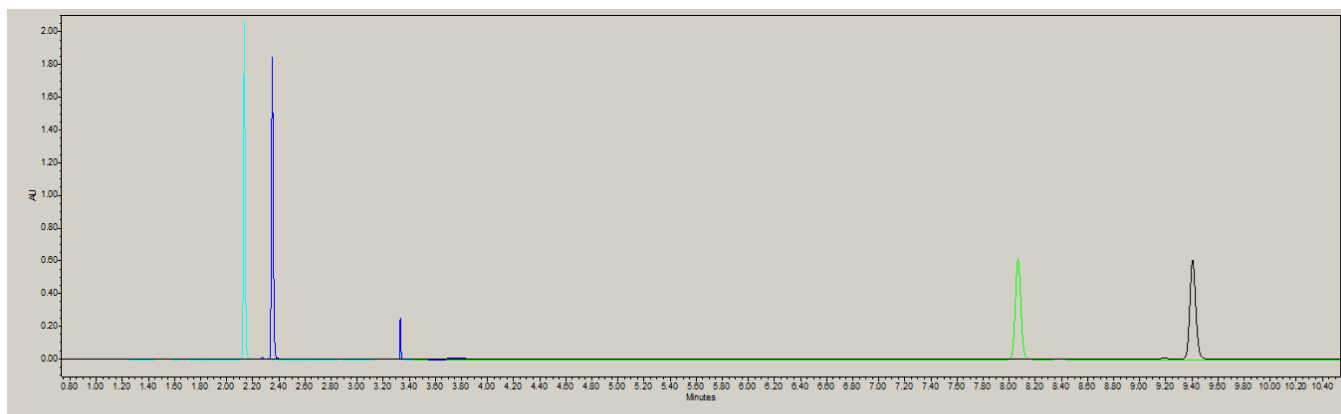
**P.4. Preklopljeni kromatogram daidzeina pri različitim pH-vrijednostima pokretne faze**



1. pH = 9
2. pH = 3
3. pH = 4
4. pH = 5

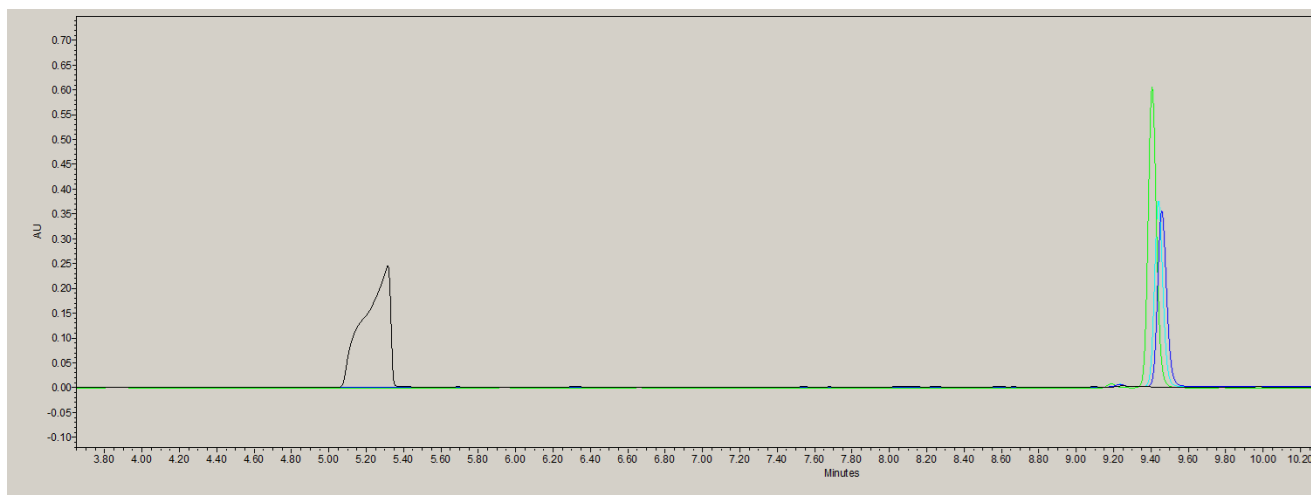


**P.5. Preklopljeni kromatogram biohanina A pri različitim vremenima trajanja gradijenta (3 min, 23 min) i različitim temperaturama kolone (30 °C, 60 °C)**



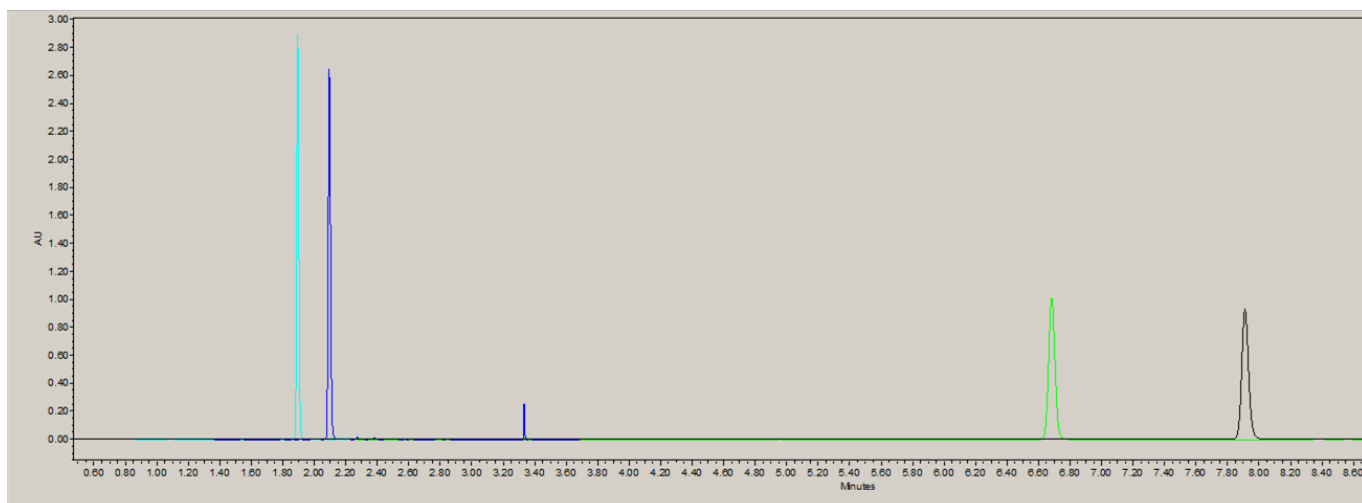
1. tg5T60
2. tg5T30
3. tg23T60
4. tg23T30

**P.6. Preklopljeni kromatogram biohanina A pri različitim pH-vrijednostima pokretne faze**



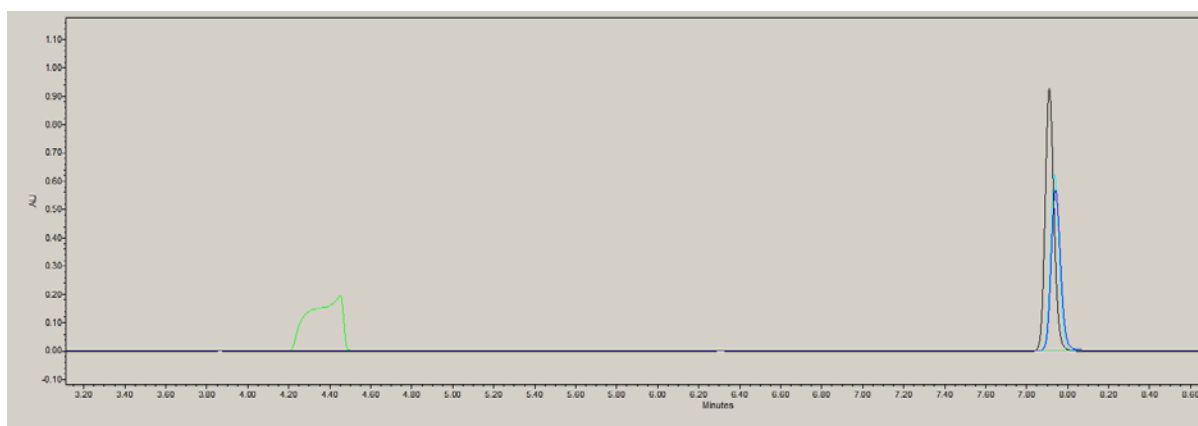
- pH3
- pH 4
- pH 5
- pH 9

**P.7. Preklopljeni kromatogram formononetina pri različitim vremenima trajanja gradijenta (5 min, 23 min) i različitim temperaturama kolone (30 °C, 60 °C)**



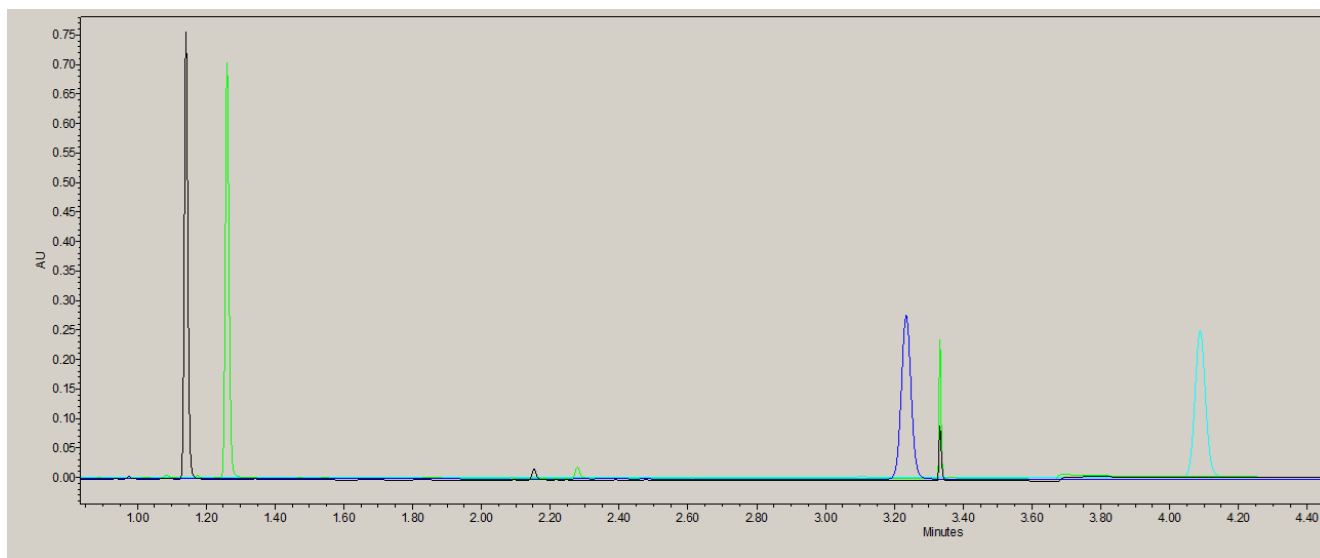
1. tg5T60
2. tg5T30
3. tg23T60
4. tg23T30

**P.8. Preklopljeni kromatogram formononetina pri različitim pH-vrijednostima pokretne faze**



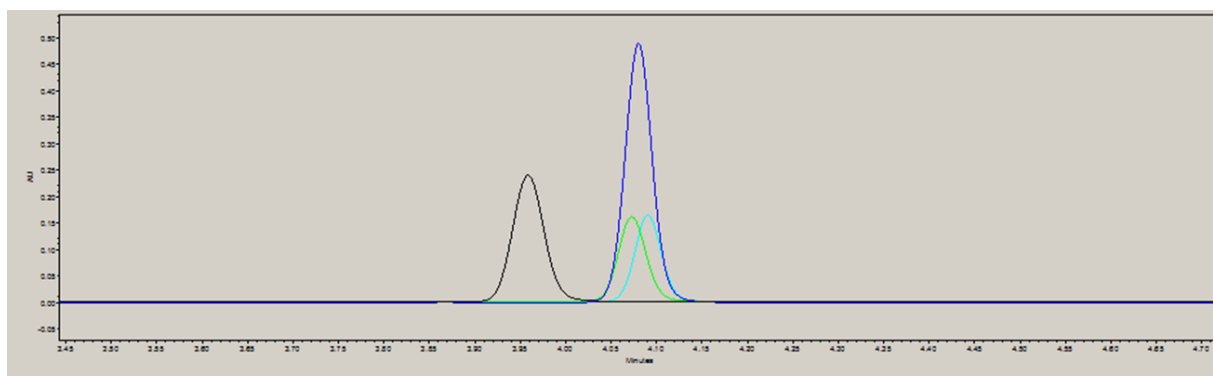
- pH 9
- pH 3
- pH 4
- pH 5

**P.9. Preklopljeni kromatogram genistina pri različitim vremenima trajanja gradijenta (5 min, 23 min) i različitim temperaturama kolone (30 °C, 60 °C)**



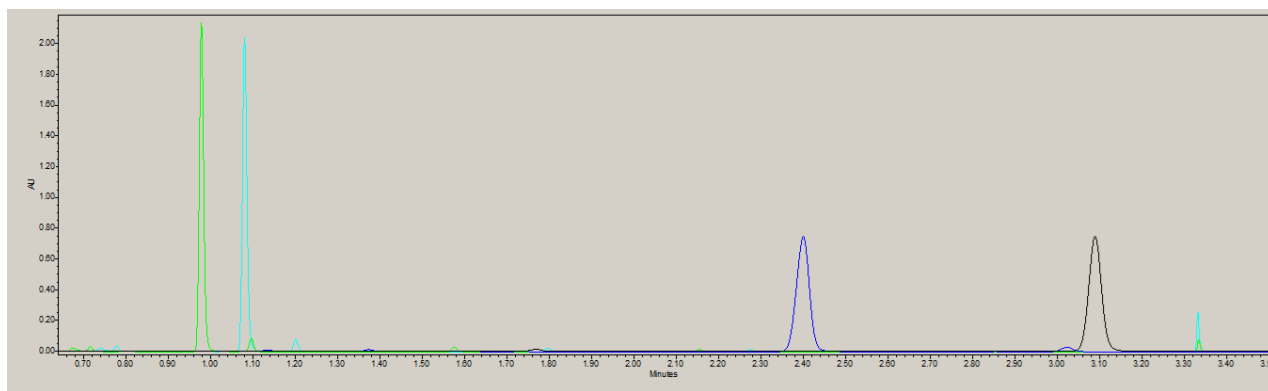
1. **tg5T60**
2. **tg5T30**
3. **tg23T60**
4. **tg23T30**

**P.10. Preklopljeni kromatogram genstina pri različitim pH-vrijednostima pokretne faze**



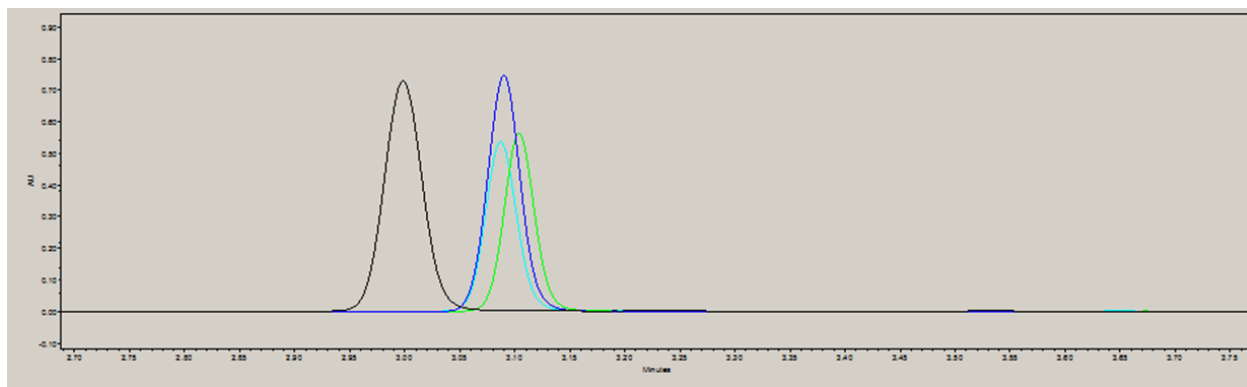
- **pH 9**
- **pH 3**
- **pH 4**
- **pH 5**

**P.11. Preklopljeni kromatogram daidzina pri različitim vremenima trajanja gradijenta (5 min, 23 min) i različitim temperaturama kolone (30 °C, 60 °C)**



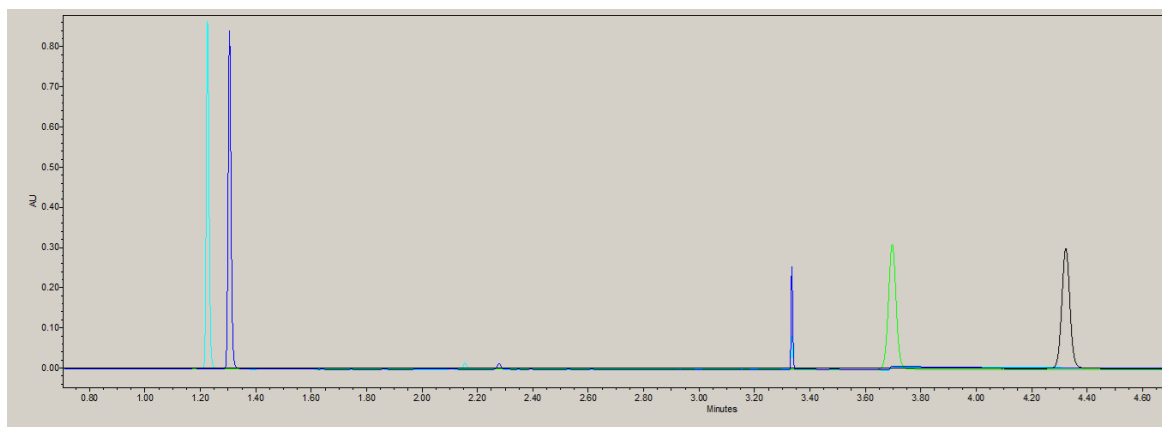
1. tg5T60
2. tg5T30
3. tg23T60
4. tg23T30

**P.12. Preklopljeni kromatogram daidzina pri različitim pH-vrijednostima pokretne faze**



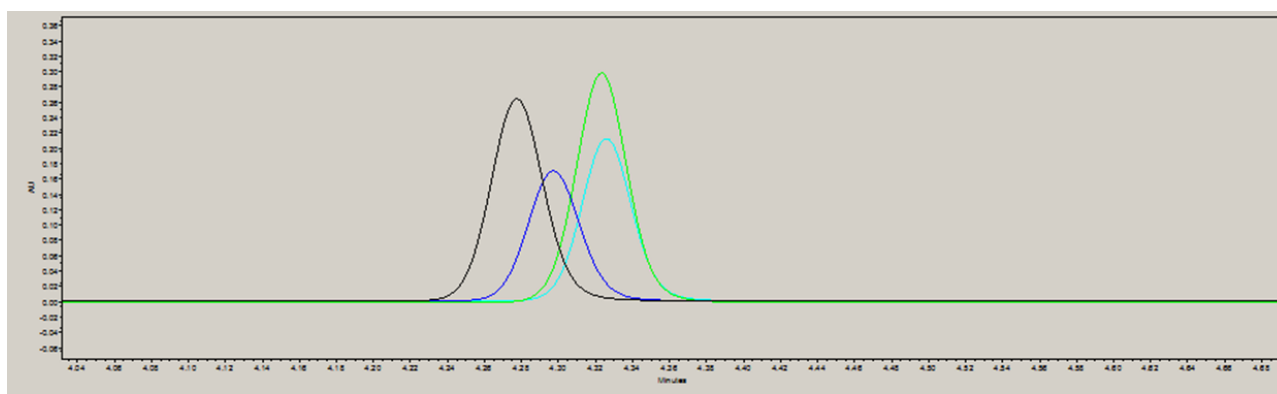
- pH 9
- pH 3
- pH 4
- pH 5

**P.13. Preklopljeni kromatogram ononina pri različitim vremenima trajanja gradijenta (5 min, 23 min) i različitim temperaturama kolone (30 °C, 60 °C)**



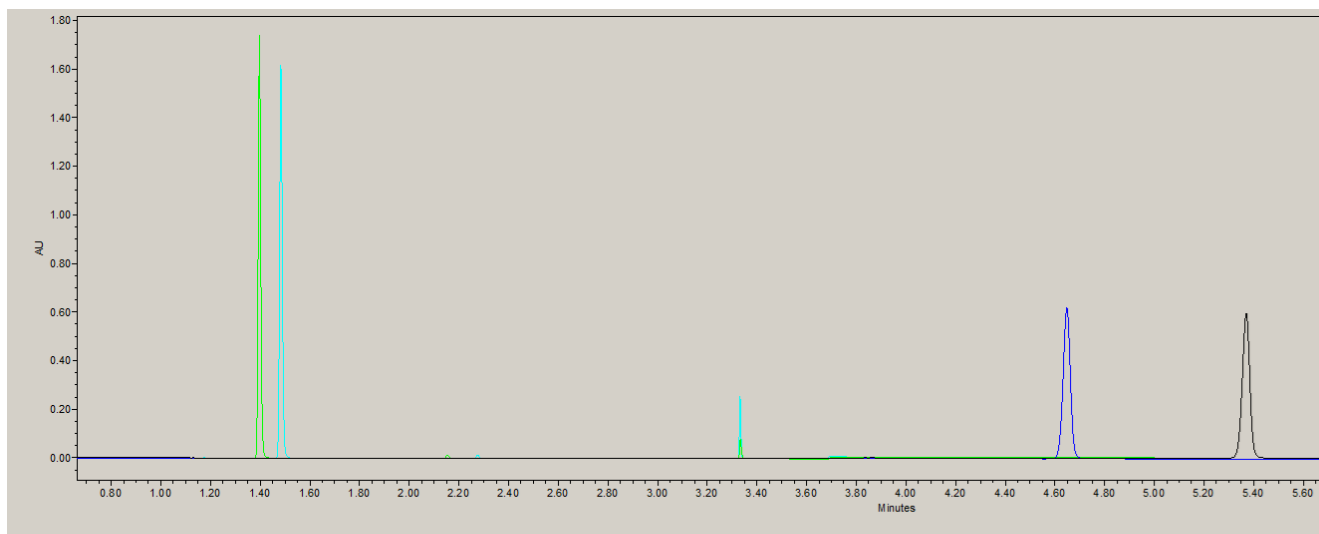
1. **tg5T60**
2. **tg5T30**
3. **tg23T60**
4. **tg23T30**

**P.14. Preklopljeni kromatogram ononina pri različitim pH-vrijednostima pokretne faze**



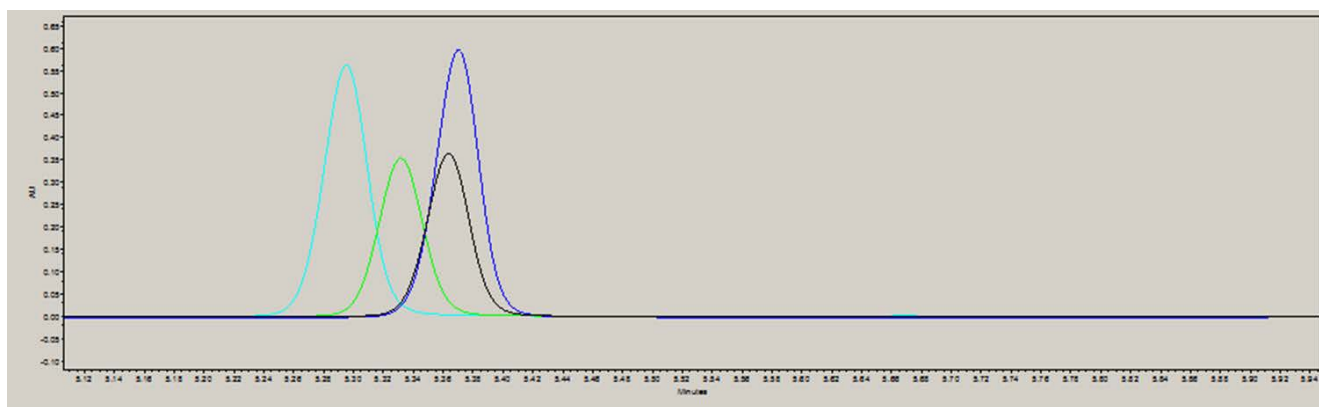
- **pH 9**
- **pH 5**
- **pH 4**
- **pH 3**

**P.15. Preklapljeni kromatogram sisotrina pri različitim vremenima trajanja (5 min, 23 min) i različitim temperaturama kolone (30 °C, 60 °C)**



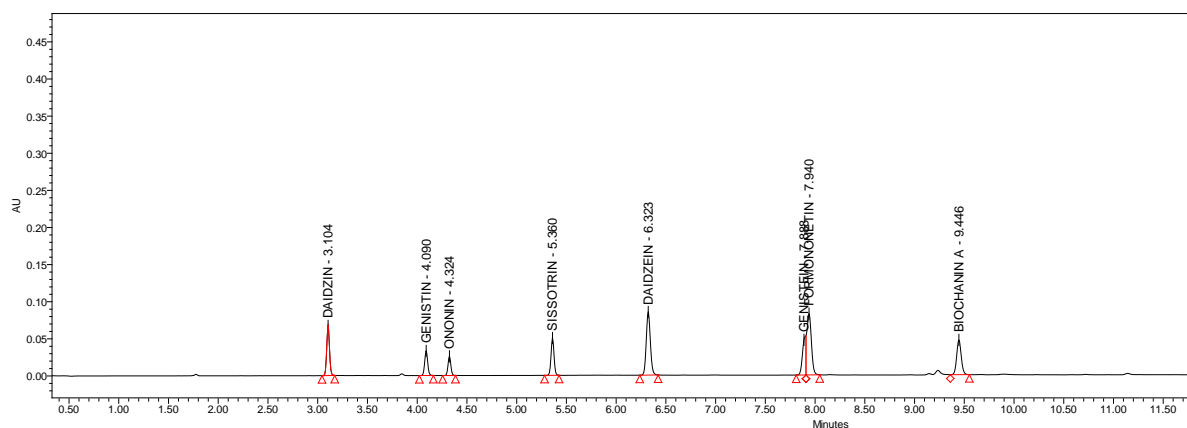
1. tg5T60
2. tg5T30
3. tg23T60
4. tg23T30

**P.16. Preklapljeni kromatogram sisotrina pri različitim pH-vrijednostima pokretne faze**

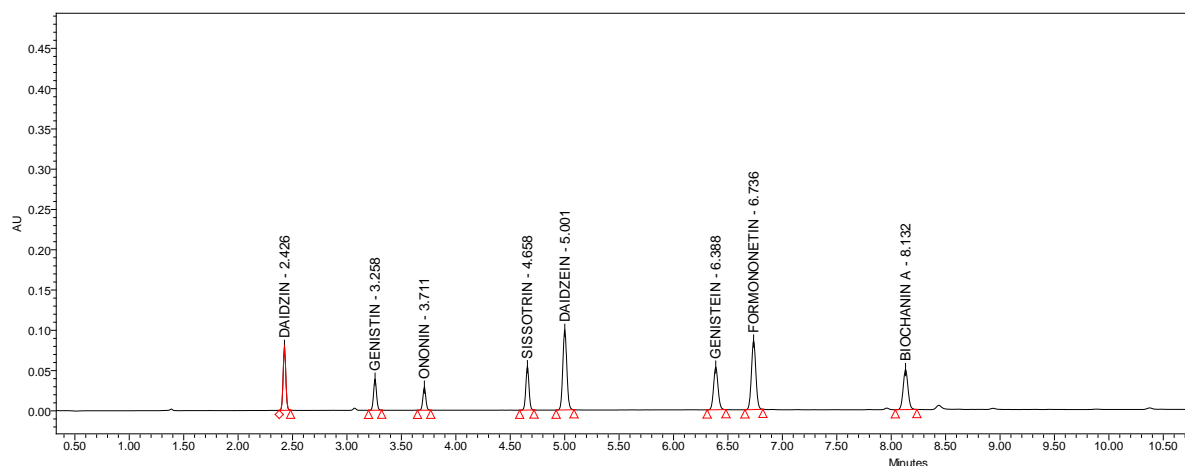


- pH 9
- pH 5
- pH 4
- pH 3

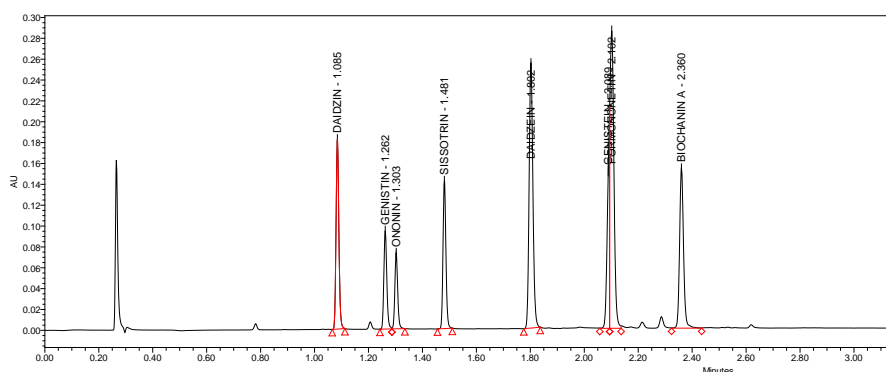
**P.17. Kromatogram rezolucijske otopine svih osam molekula fitoestrogena (Uvjeti: pH(pokretne faze)=4,  $t_G$ =23 min, T=30 °C, kolona: AGILENT Zorbax BONUS RP RRHD 1,8  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm)**



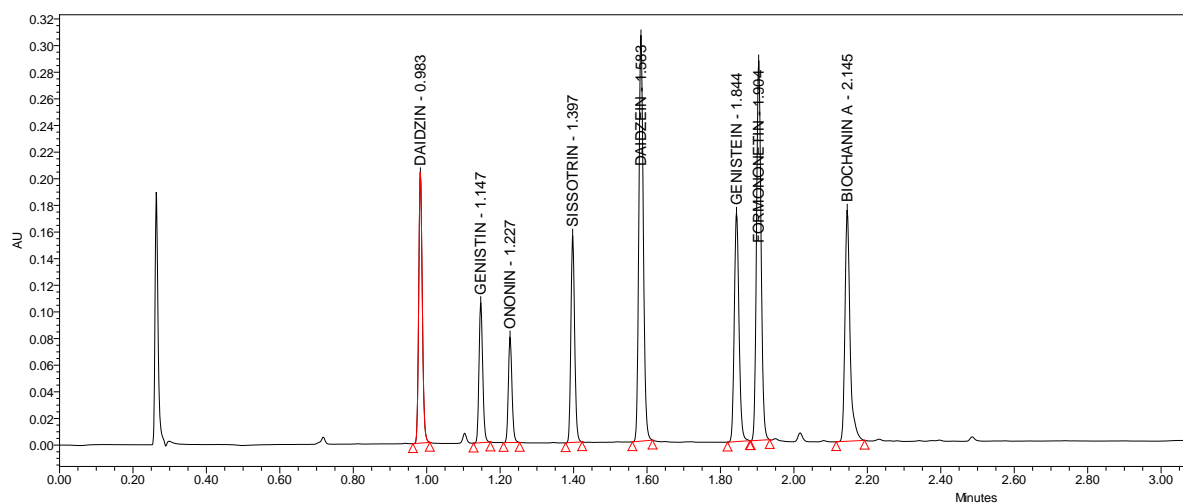
**P.18. Kromatogram rezolucijske otopine svih osam molekula fitoestrogena (Uvjeti: pH(pokretne faze)=4,  $t_G$  =23 min, T=60 °C, kolona: AGILENT Zorbax BONUS RP RRHD 1,8  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm)**



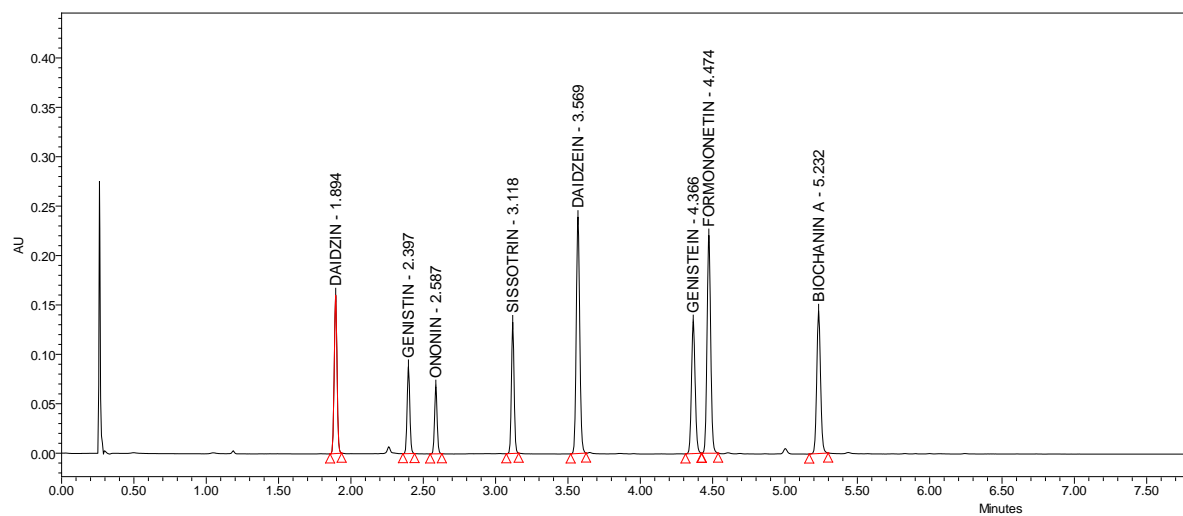
**P.19. Kromatogram rezolucijske otopine svih osam molekula fitoestrogena (Uvjeti: pH(pokretne faze)=3,  $t_G$  =5 min, T=30 °C, kolona: AGILENT Zorbax BONUS RP RRHD 1,8  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm)**



**P.20. Kromatogram rezolucijske otopine svih osam molekula fitoestrogena (Uvjeti: pH(pokretne faze)=3,  $t_G$  =5 min, T=60 °C, kolona: AGILENT Zorbax BONUS RP RRHD 1,8  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm)**

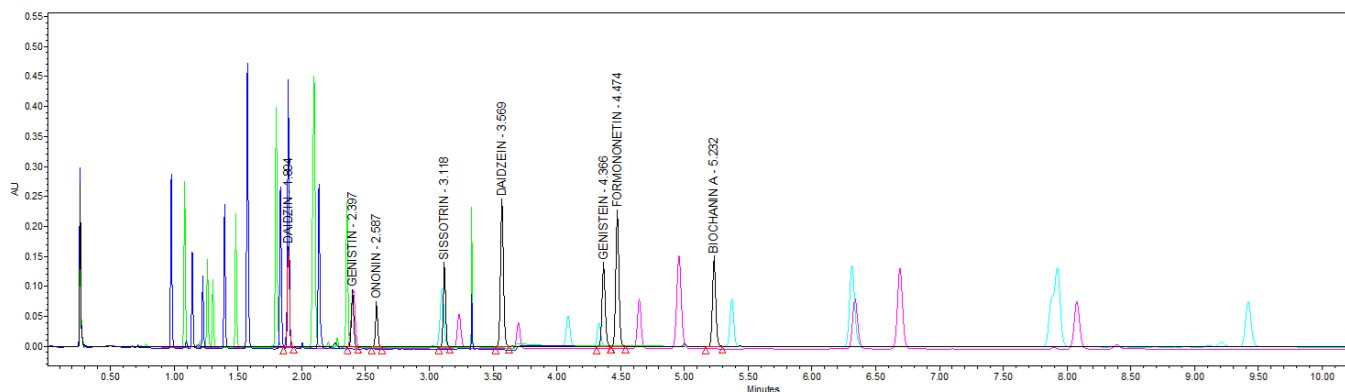


**P.21. Kromatogram rezolucijske otopine svih osam molekula fitoestrogena (Uvjeti: pH(pokretne faze)=3,  $t_G$  =13 min, T=45 °C, kolona: AGILENT Zorbax BONUS RP RRHD 1,8  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm)**



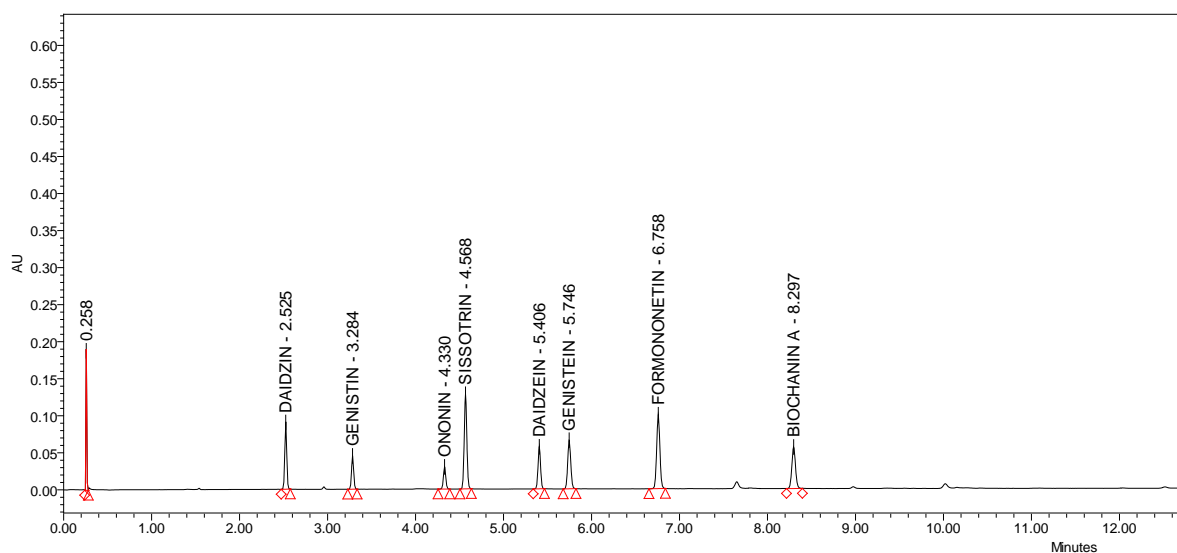


**P.22. Kromatogram rezolucijske otopine svih osam molekula fitoestrogena pri različitim vremenima trajanja gradijenta (5 min, 13 min, 23 min) i različitim temperaturama kolone (30 °C, 45 °C, 60 °C) (pH(pokretne faze)=3, kolona: AGILENT Zorbax BONUS RP RRHD 1,8 µm; 2,1 x 50 mm)**

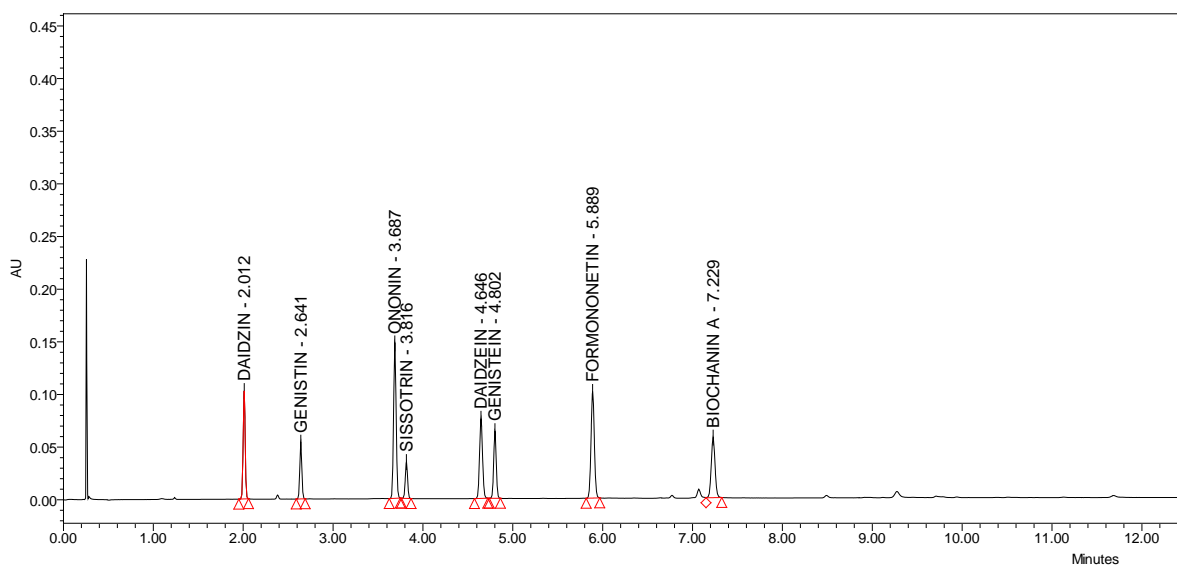


- RS tG3T60
- RS tG3T30
- RS tG10T45
- RS tG20T60
- RS tG20T30

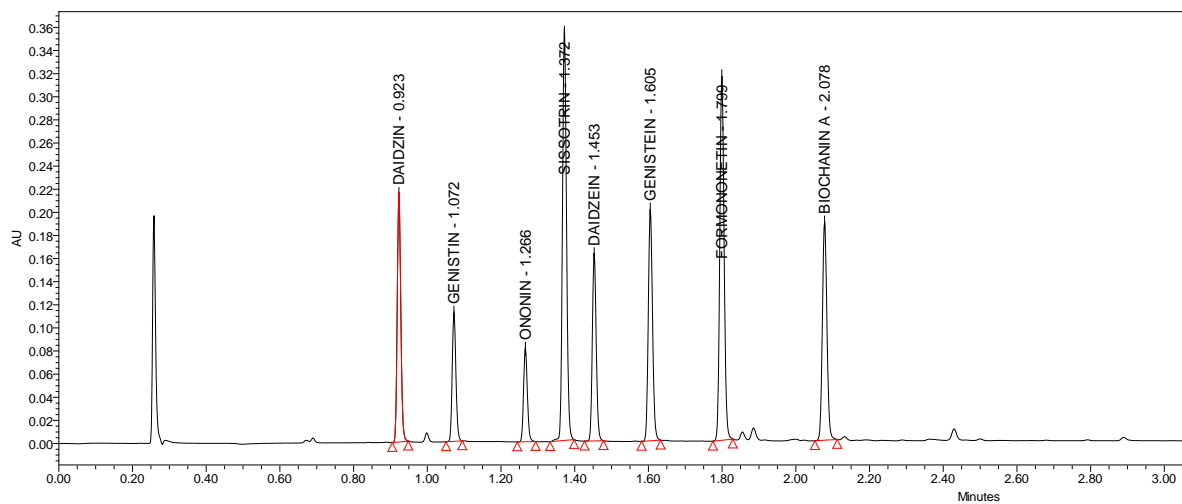
**P.23. Kromatogram rezolucijske otopine svih osam molekula fitoestrogena (Uvjeti: pH(pokretne faze)=4,  $t_G$  =23 min, T=30 °C, kolona: AGILENT Zorbax EclipsePlusC18 RRHD 1,8 µm; 2,1 x 50 mm)**



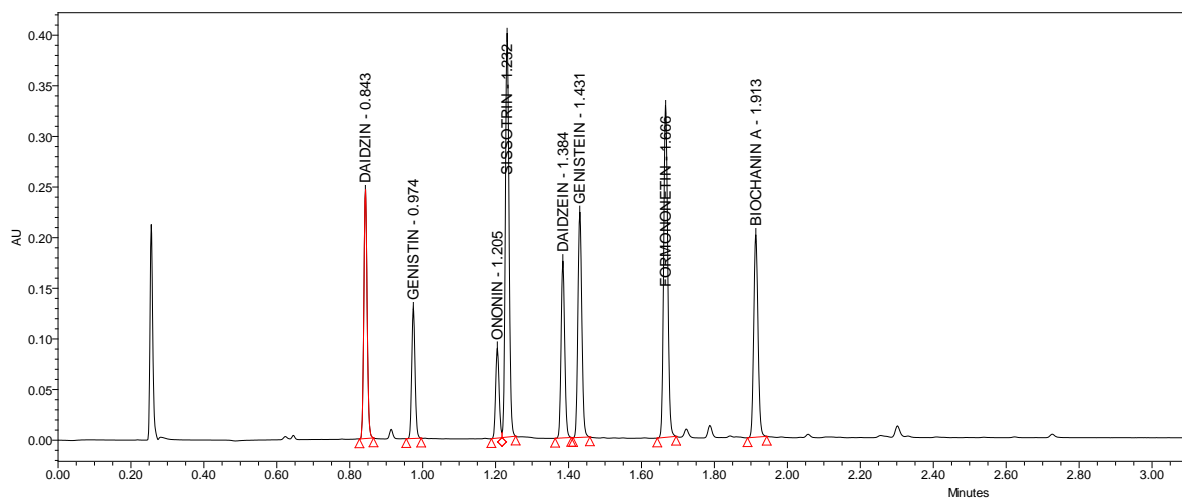
**P.24. Kromatogram rezolucijske otopine svih osam molekula fitoestrogena (Uvjeti: pH(pokretne faze)=4,  $t_G$  =23 min, T=60 °C, kolona: AGILENT Zorbax EclipsePlusC18 RRHD 1,8  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm)**



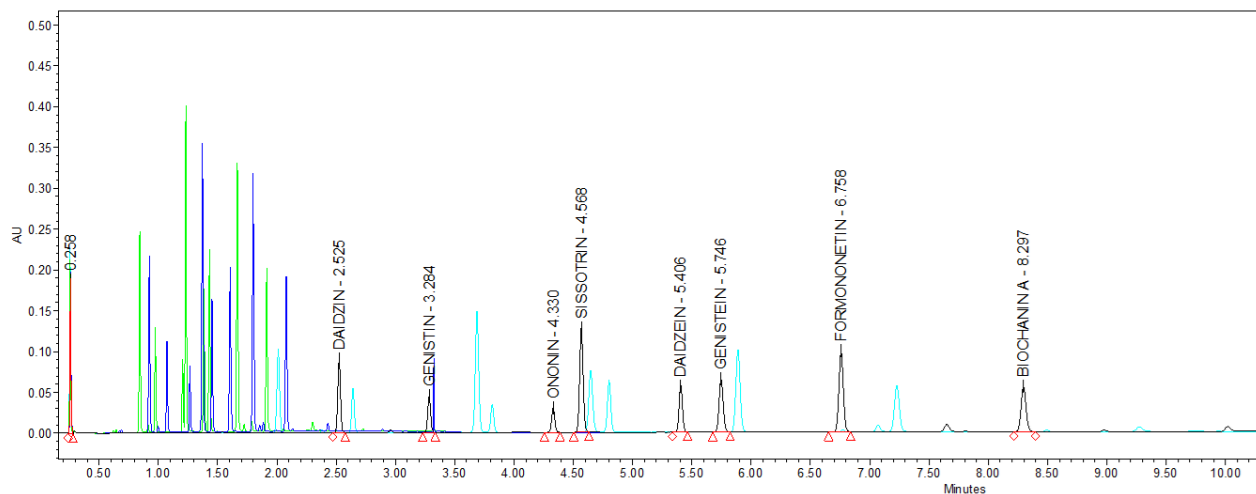
**P.25. Kromatogram rezolucijske otopine svih osam molekula fitoestrogena (Uvjeti: pH(pokretne faze)=4,  $t_G$  =5 min, T=30 °C, kolona: AGILENT Zorbax EclipsePlusC18 RRHD 1,8  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm)**



**P.26. Kromatogram rezolucijske otopine svih osam molekula fitoestrogena (Uvjeti: pH(pokretne faze)=4,  $t_G$  =5 min, T=60 °C, kolona: AGILENT Zorbax EclipsePlusC18 RRHD 1,8  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm)**

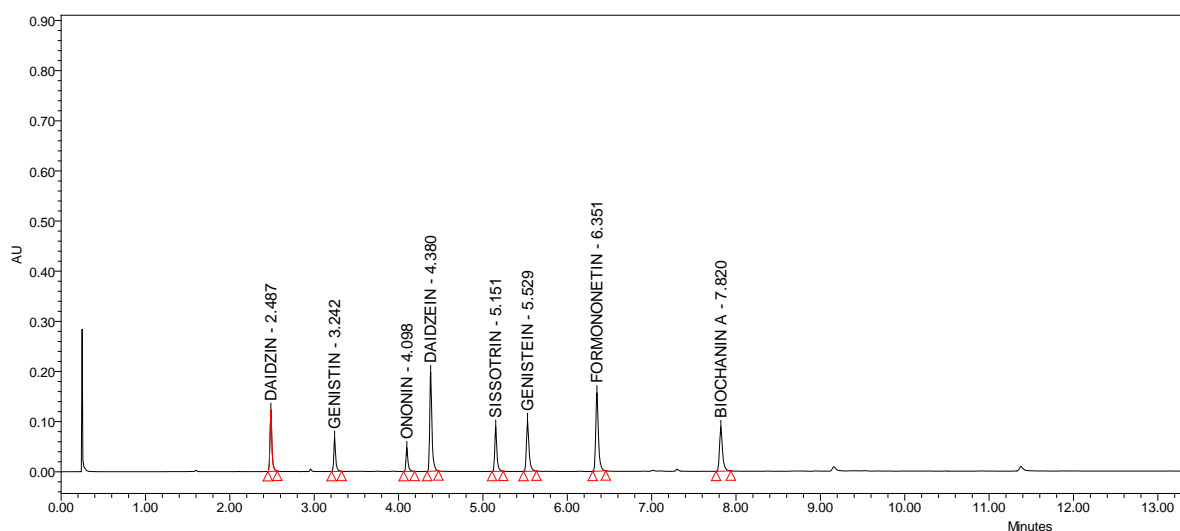


**P.27. Kromatogram rezolucijske otopine svih osam molekula fitoestrogena pri različitim vremenima trajanja gradijenta (5 min, 13 min, 23 min) i različitim temperaturama kolone (30 °C, 45 °C, 60 °C) (pH(pokretne faze)=4, kolona AGILENT Zorbax EclipsePlusC18 RRHD 1,8  $\mu$ m; 2,1 x 50 mm)**

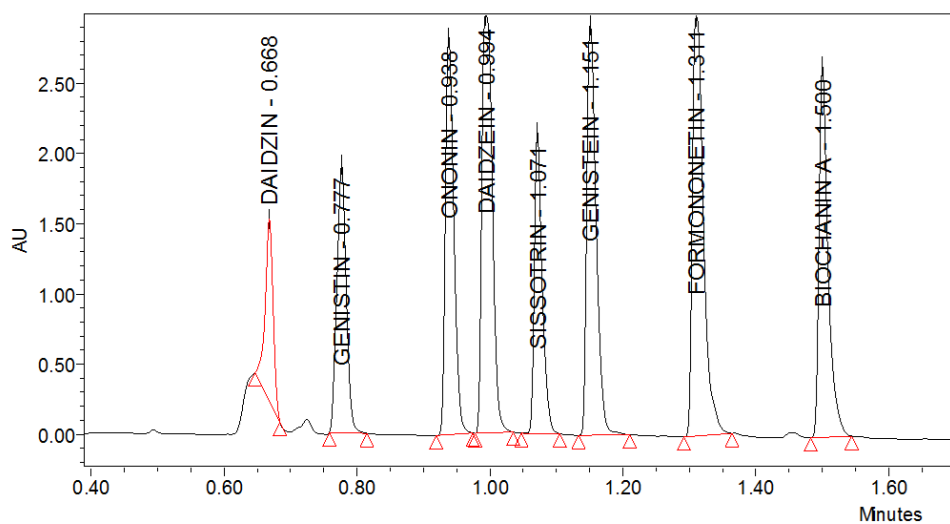


- RS tG3T60
- RS tG3T30
- RS tG20T60
- RS tG20T30

**P.28. Kromatogram rezolucijske otopine svih osam molekula fitoestrogena (Uvjeti: pH(pokretne faze)=4,  $t_G$  =23 min, T=30 °C, kolona: CORTECS™ UPLC C18+ 1,6 μm; 2,1 x 50 mm)**

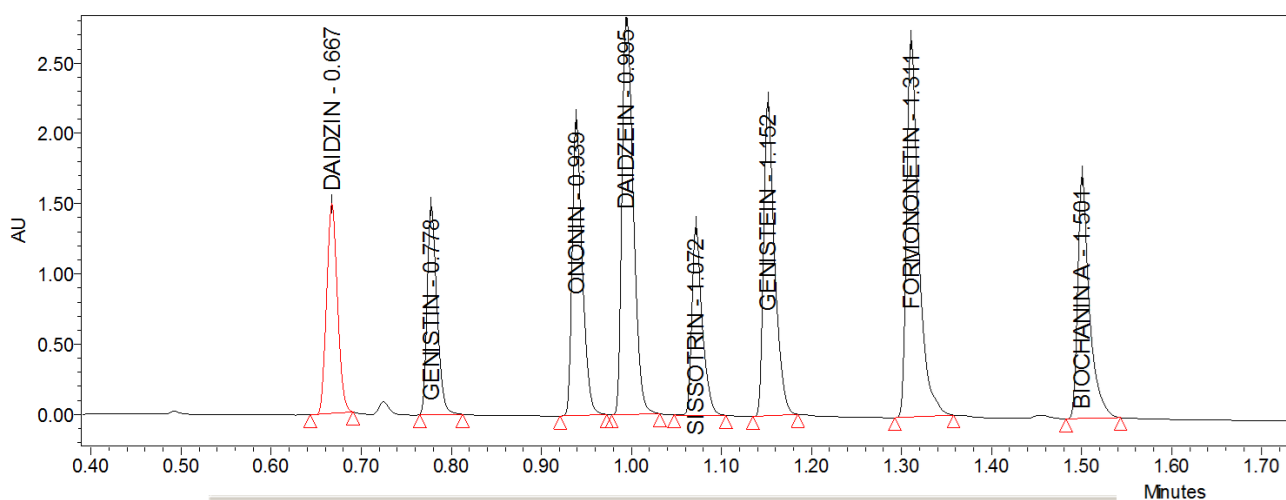


**P.29. Rezultati ispitivanja linearnosti za koncentraciju 0,5 mg/mL**



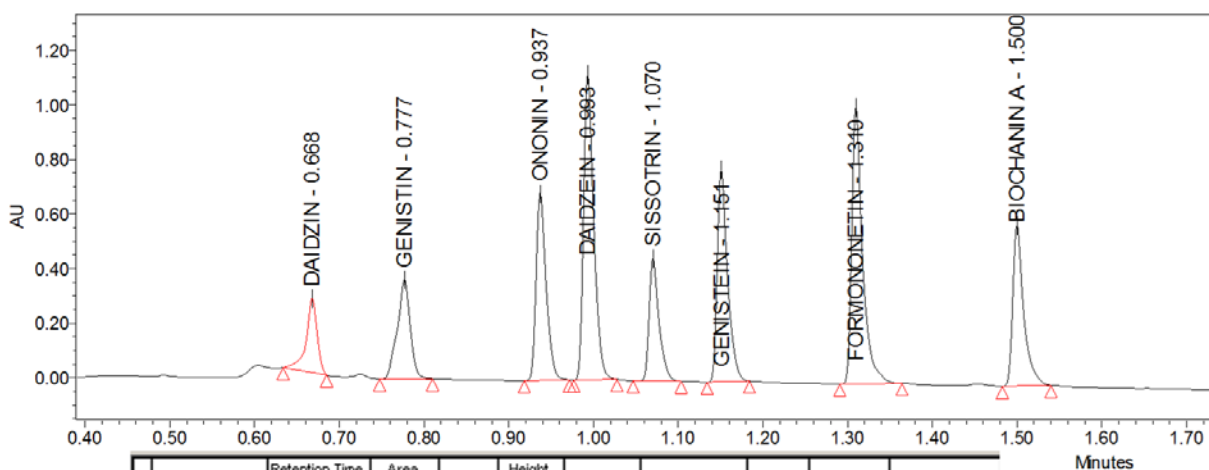
Name	Retention Time (min)	Area (μV*sec)	% Area	Height (μV)	Resolution	USP Resolution	EP s/h	USP Tailing	USP Plate Count
1 DAIDZIN	0.668	1075676	5.56	1299317			1720.24	0.92	15632
2 GENISTIN	0.777	1865240	9.64	1910212	4.74	4.46	2529.51	1.07	12952
3 ONONIN	0.938	2513393	12.99	2832225	6.59	6.38	3750.93	1.37	25993
4 DAIDZEIN	0.994	3288450	17.00	2973531	2.11	2.24	3938.13	1.40	22348
5 SISOOTRIN	1.074	1744094	9.02	2145826	3.09	3.25	2841.64	1.50	41636
6 GENISTEIN	1.151	2884169	14.91	2923621	3.49	3.46	3872.01	1.52	33906
7 FORMONONETIN	1.311	3471066	17.94	2984758	5.84	6.11	3953.00	1.79	36929
8 BIOCHANIN A	1.500	2501703	12.93	2649409	7.31	7.54	3508.75	1.70	68022

### P.30. Rezultati ispitivanja linearnosti za koncentraciju 0,3 mg/mL



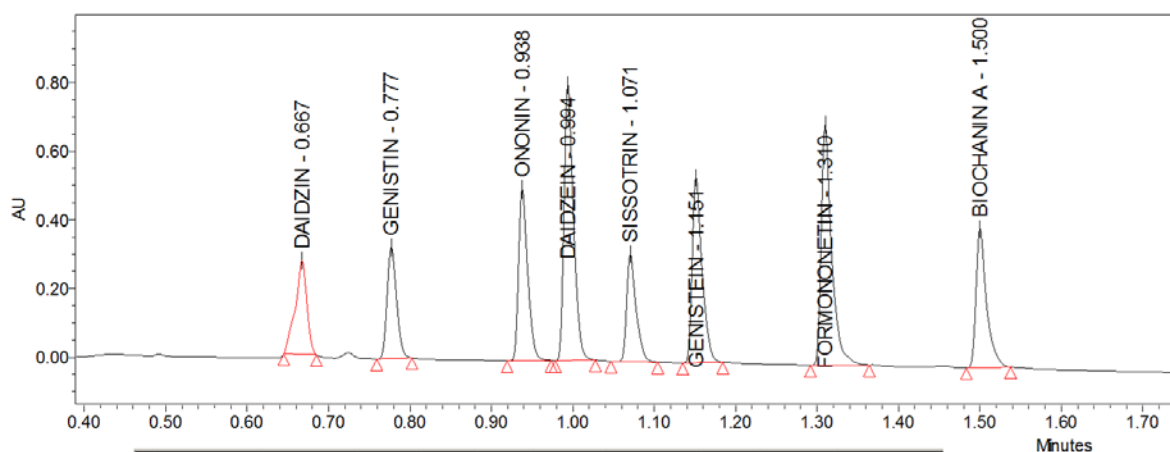
Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}^2\text{sec}$ )	% Area	Height ( $\mu\text{V}$ )	Resolution	USP Resolution	EP s/n	USP Tailing	USP Plate Count
1 DAIDZIN	0.667	1249815	9.26	1493276			1981.84	1.10	13683
2 GENISTIN	0.778	1123990	8.32	1485496	5.29	5.11	1971.51	1.33	23312
3 ONONIN	0.939	1633262	12.10	2119036	8.17	7.87	2812.76	1.41	33477
4 DAIDZEIN	0.995	2476006	18.34	2840274	2.62	2.58	3770.45	1.41	30374
5 SISOOTRIN	1.072	1062903	7.87	1348282	3.63	3.57	1789.31	1.50	44101
6 GENISTEIN	1.152	1897042	14.05	2235742	3.91	3.77	2967.73	1.50	43719
7 FORMONONETIN	1.311	2504348	18.55	2686233	7.26	7.07	3565.91	1.70	52096
8 BIOCHANIN A	1.501	1556161	11.52	1729698	8.68	8.45	2295.78	1.69	74449

### P.32 Rezultati ispitivanja linearnosti za koncentraciju 0,1 mg/mL



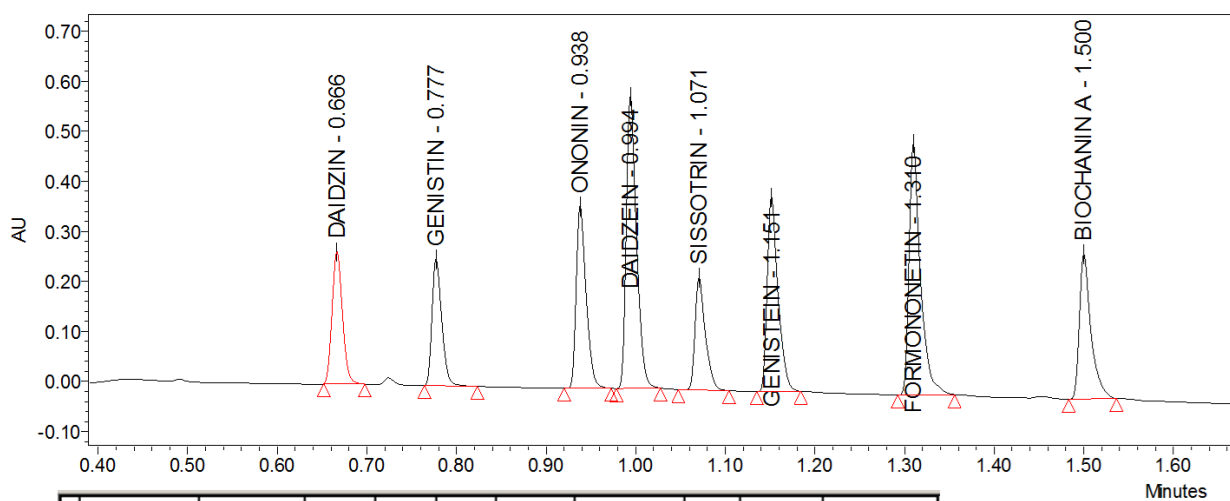
Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}^2\text{sec}$ )	% Area	Height ( $\mu\text{V}$ )	Resolution	USP Resolution	EP s/n	USP Tailing	USP Plate Count
1 DAIDZIN	0.668	246111	5.40	271228			359.19	0.80	15450
2 GENISTIN	0.777	382818	8.40	363838	4.65	4.53	482.17	0.93	13736
3 ONONIN	0.937	562154	12.33	687190	6.79	6.68	911.58	1.36	30363
4 DAIDZEIN	0.993	927102	20.34	1119604	2.67	2.60	1485.82	1.37	33414
5 SISOOTRIN	1.070	360558	7.91	448570	3.74	3.64	594.70	1.51	43523
6 GENISTEIN	1.151	654605	14.36	777529	3.93	3.84	1031.55	1.49	45694
7 FORMONONETIN	1.310	899363	19.73	1015638	7.57	7.39	1347.75	1.68	59765
8 BIOCHANIN A	1.500	526178	11.54	591253	9.05	8.84	784.18	1.67	77022

### P.33. Rezultati ispitivanja linearnosti za koncentraciju 0,07 mg/mL



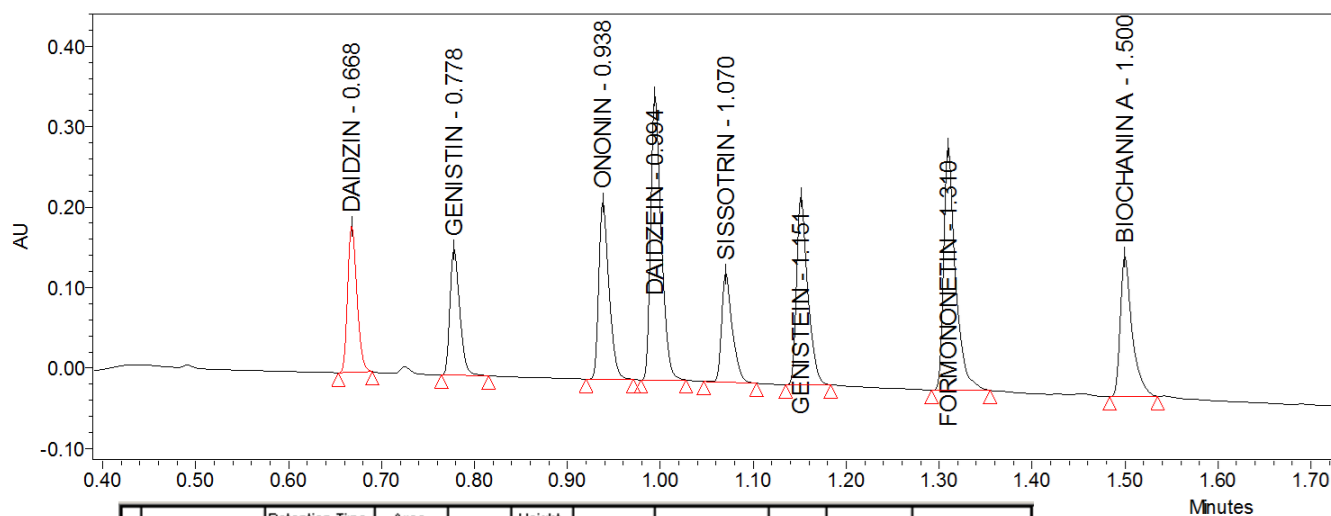
Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}^2\text{sec}$ )	% Area	Height ( $\mu\text{V}$ )	Resolution	USP Resolution	EP s/h	USP Tailing	USP Plate Count
1 DAIDZIN	0.667	269132	8.29	272485			363.09	0.84	12099
2 GENISTIN	0.777	260559	8.03	324385	4.84	4.77	432.44	1.21	20501
3 ONONIN	0.938	388424	11.97	501502	7.82	7.61	669.10	1.40	33268
4 DAIDZEIN	0.994	641162	19.76	802349	2.76	2.68	1071.09	1.39	35026
5 SISOOTRIN	1.071	249212	7.68	312472	3.77	3.68	416.52	1.50	43745
6 GENISTEIN	1.151	452457	13.94	539428	3.92	3.83	719.78	1.47	45176
7 FORMONONETIN	1.310	622145	19.17	700444	7.49	7.33	934.93	1.62	58638
8 BIOCHANIN A	1.500	361581	11.14	405376	8.95	8.75	540.66	1.64	75598

### P.33. Rezultati ispitivanja linearnosti za koncentraciju 0,05 mg/mL



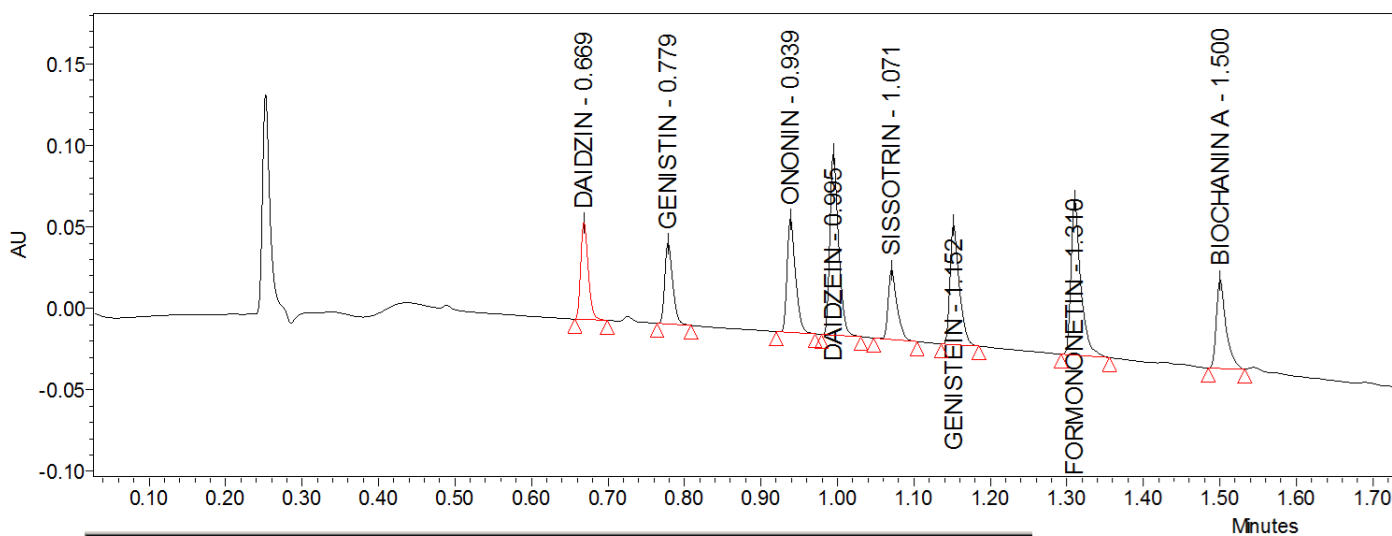
Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}^2\text{sec}$ )	% Area	Height ( $\mu\text{V}$ )	Resolution	USP Resolution	EP s/h	USP Tailing	USP Plate Count
1 DAIDZIN	0.666	212667	9.05	264544			351.65	1.16	15366
2 GENISTIN	0.777	190831	8.12	253339	5.44	5.32	336.71	1.34	23993
3 ONONIN	0.938	279198	11.87	365365	8.16	7.97	486.05	1.40	34135
4 DAIDZEIN	0.994	461195	19.62	583956	2.79	2.71	777.44	1.39	35836
5 SISOOTRIN	1.071	179023	7.61	225235	3.79	3.70	299.25	1.50	43870
6 GENISTEIN	1.151	325150	13.83	388897	3.93	3.84	517.42	1.47	45390
7 FORMONONETIN	1.310	444304	18.90	503082	7.50	7.33	669.63	1.60	58722
8 BIOCHANIN A	1.500	258791	11.01	290597	8.96	8.76	386.38	1.63	75565

### P.34. Rezultati ispitivanja linearnosti za koncentraciju 0,03 mg/mL



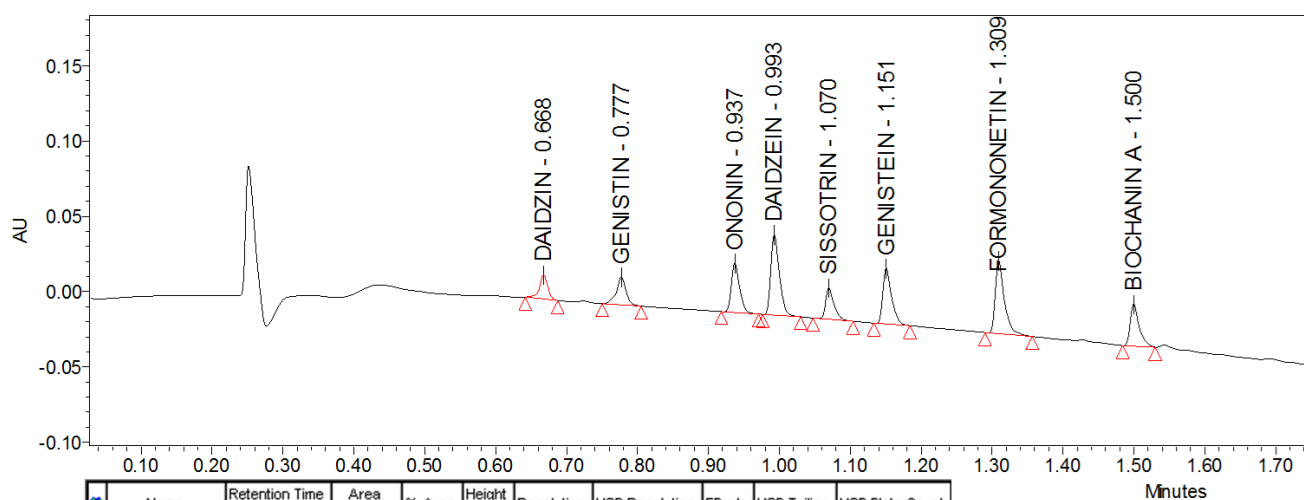
Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}^*\text{sec}$ )	% Area	Height ( $\mu\text{V}$ )	Resolution	USP Resolution	EP s/h	USP Tailing	USP Plate Count
1 DAIDZIN	0.668	126362	8.97	182006			256.00	1.26	20935
2 GENISTIN	0.778	114295	8.12	156736	5.91	5.83	220.32	1.35	25897
3 ONONIN	0.938	167370	11.88	220268	8.29	8.14	310.03	1.40	35167
4 DAIDZEIN	0.994	276990	19.67	352683	2.81	2.75	497.01	1.39	36655
5 SISOOTRIN	1.070	107481	7.63	135610	3.78	3.72	190.49	1.51	44739
6 GENISTEIN	1.151	194945	13.84	233883	3.93	3.89	329.26	1.48	46340
7 FORMONONETIN	1.310	266461	18.92	301552	7.48	7.40	424.81	1.61	59832
8 BIOCHANIN A	1.500	154394	10.96	173763	8.93	8.82	244.36	1.62	76663

### P.35. Rezultati ispitivanja linearnosti za koncentraciju 0,01 mg/mL



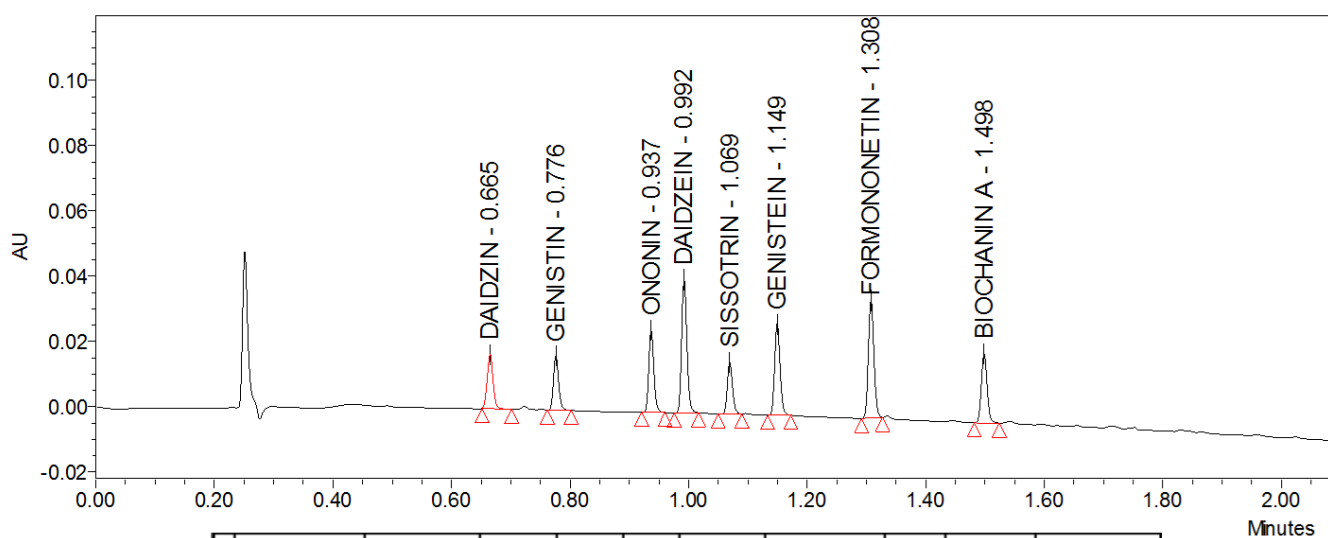
Name	Retention Time (min)	Area ( $\mu\text{V}^*\text{sec}$ )	% Area	Height ( $\mu\text{V}$ )	Resolution	USP Resolution	EP s/h	USP Tailing	USP Plate Count
1 DAIDZIN	0.669	40345	9.09	59501			72.86	1.32	22295
2 GENISTIN	0.779	35626	8.02	49634	6.02	5.94	60.62	1.36	26577
3 ONONIN	0.939	52882	11.91	69755	8.32	8.19	85.59	1.43	35245
4 DAIDZEIN	0.995	87737	19.76	111316	2.81	2.76	137.19	1.41	36851
5 SISOOTRIN	1.071	33939	7.64	42769	3.77	3.72	52.09	1.57	44821
6 GENISTEIN	1.152	61524	13.85	73596	3.93	3.89	90.36	1.50	46065
7 FORMONONETIN	1.310	84134	18.95	95084	7.45	7.37	117.04	1.71	59363
8 BIOCHANIN A	1.500	47881	10.78	54422	8.89	8.81	66.56	1.62	76881

### P.36. Rezultati ispitivanja linearnosti za koncentraciju 0,005 mg/mL



Name	Retention Time (min)	Area (μV*sec)	% Area	Height (μV)	Resolution	USP Resolution	EP s/h	USP Tailing	USP Plate Count
1 DAIDZIN	0.668	12935	5.94	16057			20.56	0.98	17626
2 GENISTIN	0.777	17509	8.04	18469	5.24	5.08	23.79	0.94	18356
3 ONONIN	0.937	26507	12.18	32574	7.36	7.20	42.73	1.40	30504
4 DAIDZEIN	0.993	44840	20.60	53525	2.59	2.56	70.86	1.40	32195
5 SISOOTRIN	1.070	16856	7.74	20762	3.62	3.60	26.87	1.65	42634
6 GENISTEIN	1.151	31446	14.45	36960	3.82	3.81	48.62	1.53	44613
7 FORMONONETIN	1.309	43250	19.87	48638	7.35	7.31	64.30	1.87	58843
8 BIOCHANIN A	1.500	24330	11.18	27881	8.85	8.83	36.43	1.61	77634

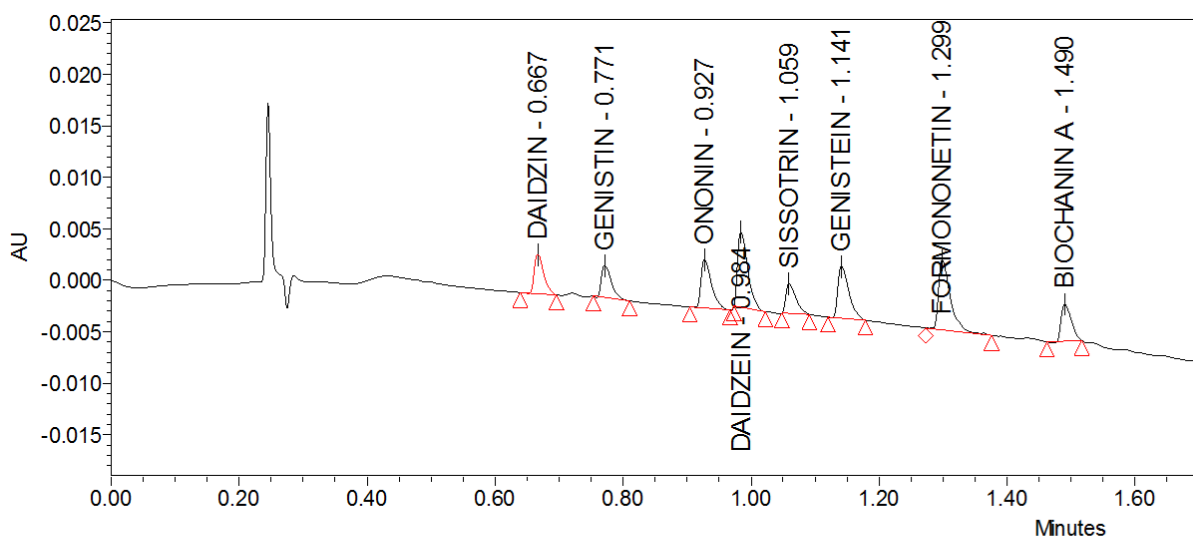
### P.37. Rezultati ispitivanja linearnosti za koncentraciju 0,0025 mg/mL



Name	Retention Time (min)	Area (μV*sec)	% Area	Height (μV)	Resolution	USP Resolution	EP s/h	USP Tailing	USP Plate Count
1 DAIDZIN	0.665	11414	8.95	16776			192.74	1.04	21807
2 GENISTIN	0.776	10267	8.05	16681	6.63	6.52	191.64	1.23	37610
3 ONONIN	0.937	15111	11.85	25305	10.29	10.14	291.24	1.16	56908
4 DAIDZEIN	0.992	25369	19.89	41111	3.53	3.48	473.77	1.15	59782
5 SISOOTRIN	1.069	9671	7.58	15924	4.86	4.79	182.90	1.19	71895
6 GENISTEIN	1.149	17812	13.97	28050	4.96	4.89	322.94	1.15	75092
7 FORMONONETIN	1.308	23519	18.44	36307	9.45	9.32	418.30	1.11	92641
8 BIOCHANIN A	1.498	14377	11.27	21285	11.06	10.91	244.81	1.13	113826

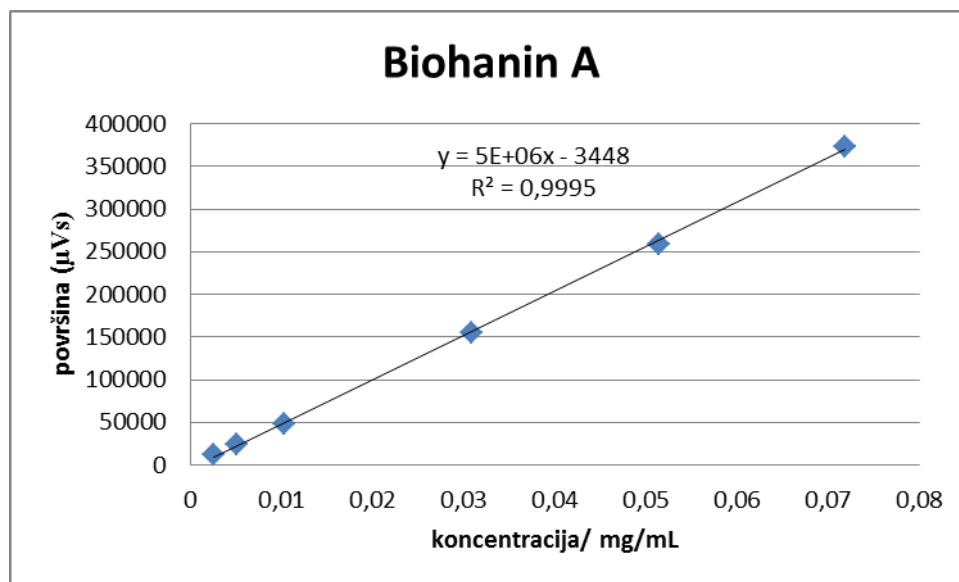


**P.38. Rezultati ispitivanja linearnosti za koncentraciju 0,00125 mg/mL**

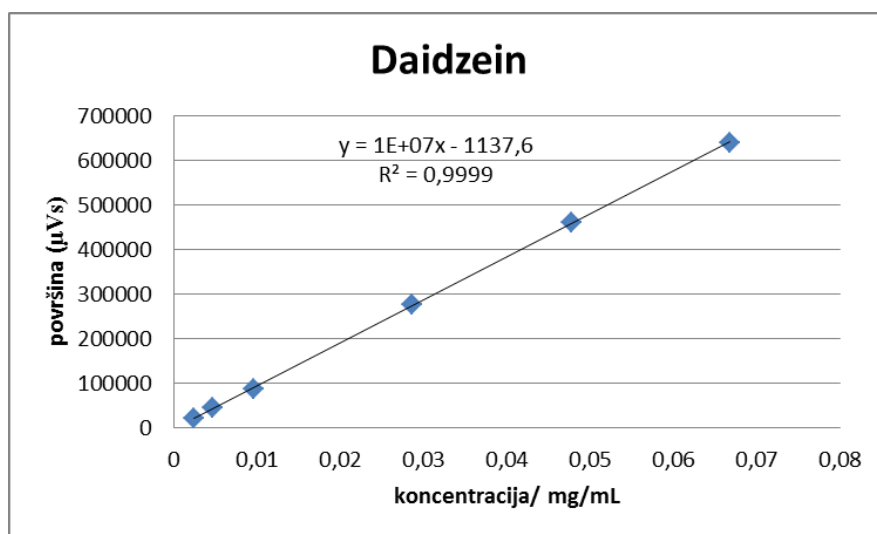


Name	Retention Time (min)	Area (μV*sec)	% Area	Height (μV)	Resolution	USP Resolution	EP s/h	USP Tailing	USP Plate Count
1 DAIDZIN	0.667	3938	9.24	3811			11.15	1.65	10333
2 GENISTIN	0.771	3379	7.92	3080	3.76	3.90	8.82	1.98	12643
3 ONONIN	0.927	5303	12.44	4704	5.35	5.50	14.00	1.89	16201
4 DAIDZEIN	0.984	8108	19.02	7295	1.94	1.97	22.27	1.93	18688
5 SISOOTRIN	1.059	3129	7.34	2867	2.58	2.59	8.14	1.92	21075
6 GENISTEIN	1.141	6023	14.13	5053	2.73	2.72	15.12	1.89	21742
7 FORMONONETIN	1.299	8753	20.53	6820	4.97	4.93	20.75	2.43	26292
8 BIOCHANIN A	1.490	4003	9.39	3614	6.15	6.05	10.52	1.55	38911

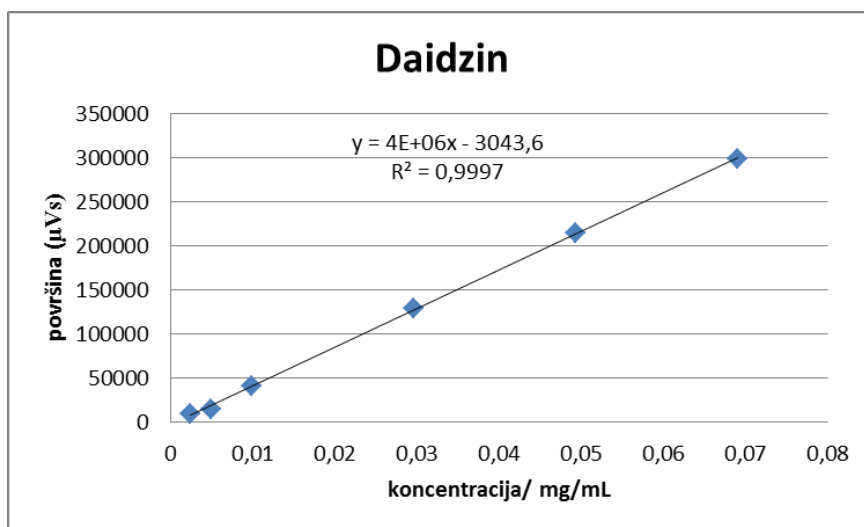
**P.39. Eksperimentalno dobiveni umjerni pravac biohanina A**



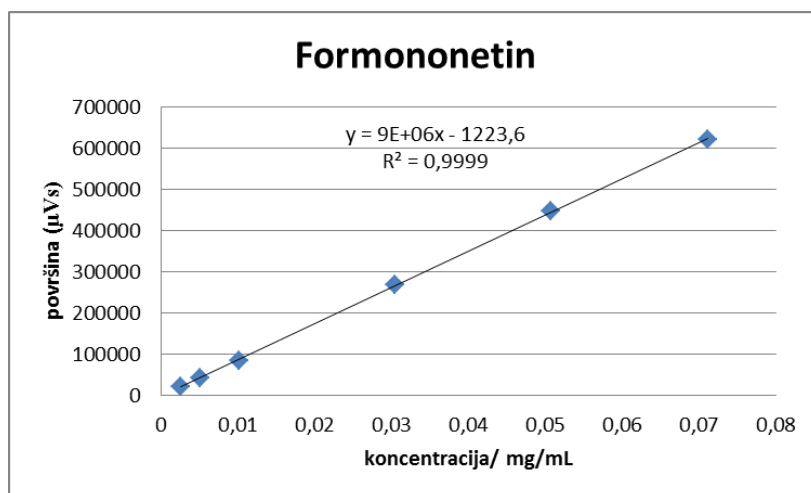
#### P.40. Eksperimentalno dobiveni umjerni pravac daidzeina



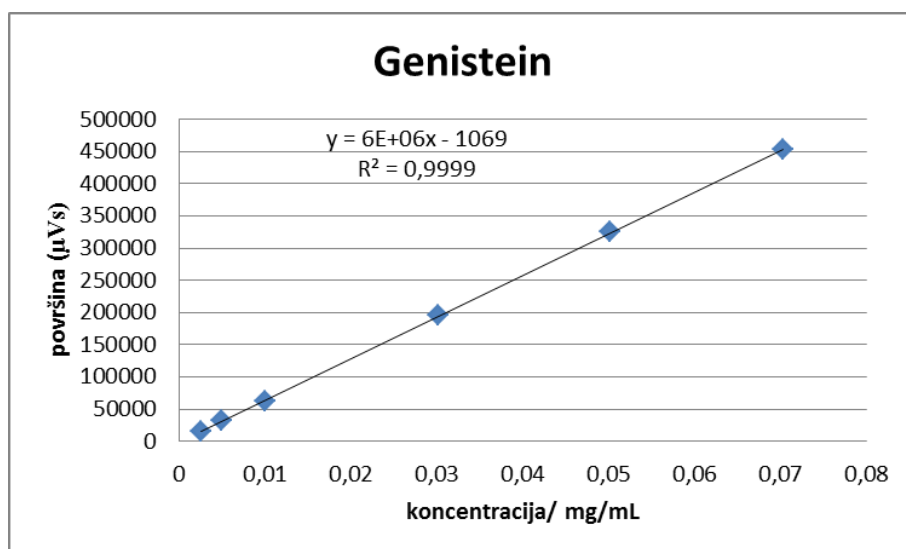
#### P.41. Eksperimentalno dobiveni umjerni pravac daidzina



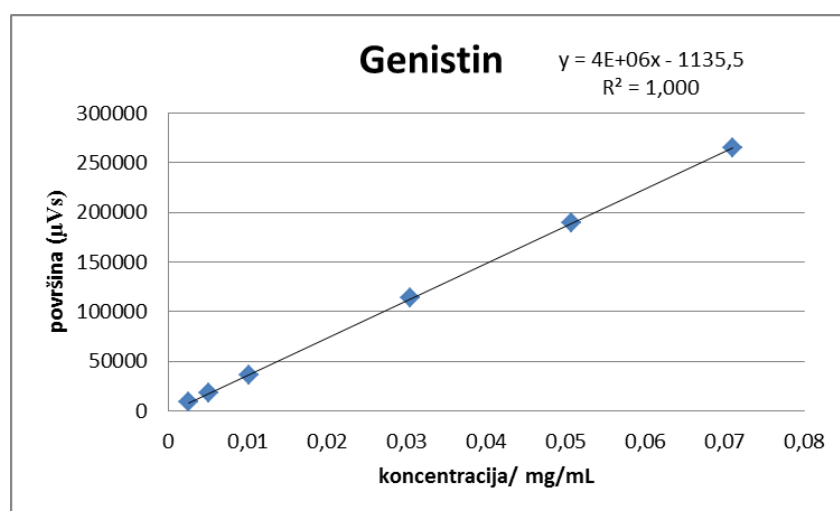
#### P.42. Eksperimentalno dobiveni umjerni pravac formononetina



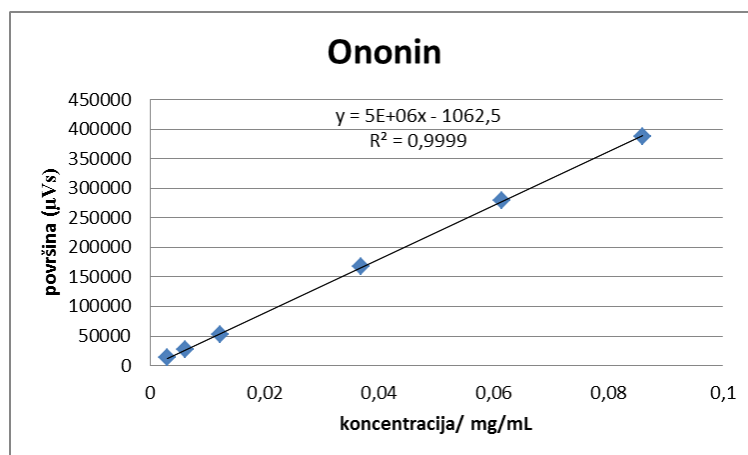
#### P.43. Eksperimentalno dobiveni umjerni pravac genisteina



#### P.44. Eksperimentalno dobiveni umjerni pravac genistina



#### P.45. Eksperimentalno dobiveni umjerni pravac ononina



**P.46. Eksperimentalno dobiveni umjerni pravac sisotrina**

