Farmakokinetički parametri fitoestrogena

Lasić, Kornelija

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:065846

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

KORNELIJA LASIĆ

FARMAKOKINETIČKI PARAMETRI FITOESTROGENA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020



University of Zagreb
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

KORNELIJA LASIĆ

PHARMACOKINETIC PARAMETERS OF PHYTOESTROGENS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2020

Sveučilište u Zagrebu
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

KORNELIJA LASIĆ

FARMAKOKINETIČKI PARAMETRI FITOESTROGENA

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof.dr.sc Biljana Nigović

Zagreb, 2020



University of Zagreb
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

KORNELIJA LASIĆ

PHARMACOKINETIC PARAMETERS OF PHYTOESTROGENS

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof.dr.sc Biljana Nigović

Zagreb, 2020

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

ZAHVALE

Od srca zahvaljujem prof. dr. sc. Biljani Nigović, mojoj mentorici, što je sa mnom dijelila svoje veliko stručno znanje i bogato iskustvo. Na njezinom razumijevanju, strpljenju i savjetima kojima me usmjeravala tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na svoj pomoći koju mi je pružila tijekom planiranja eksperimentalnog dijela te na savjetima i sugestijama koje su ovaj rad učinili vrijednijim.

Zahvaljujem dr. sc. Astrid Milić na uspješnoj suradnji i nesebičnom dijeljenju znanja o permeabilnosti i Caco-2 stanicama.

Zahvaljujem Plivi Hrvatska d.o.o. na ukazanoj prilici izrade ovog rada i svim dragim prijateljima i suradnicima koji su me motivirali riječima podrške i savjetima.

Veliko hvala mojim roditeljima i obitelji na podršci i vjeri u uspjeh svih ovih godina.

Naposljetku, posebno hvala Danijelu što mi je bio oslonac i snaga zajedno sa Lukom, Emom i Martom koji su strpljivo čekali završetak ove „domaće zadaće“.

SAŽETAK

Primjena fitoestrogena se kontinuirano povećava zbog njihove biološke aktivnosti i potencijalno korisnih učinaka. Na tržištu se nalazi sve veći broj pripravaka koji sadrže različite fitoestrogene namijenjene ženama u postmenopauzi kao posebno rizičnoj skupini. Osim što se razlikuju kvantitativno s obzirom na ukupni sadržaj fitoestrogena, dodatno se razlikuju i kvalitativno s obzirom na zastupljenost pojedinih fitoestrogena.

Cilj je ovog rada odrediti farmakokinetičke parametre skupini 15 strukturno sličnih fitoestrogena (genistein, biokanin A, daidzein, formononetin, genistin, sisotrin, daidzin, ononin, prunetin, 3,4,7-trihidroksi izoflavon, 4,6,7-trihidroksi izoflavon, 4,6,7-trimetoksi izoflavon, genistein 4,7-dimetil eter, kumestrol, kumestrol dimetil eter) u svrhu boljeg razumijevanja njihove bioraspoloživosti i učinaka na organizam. Zatim, na temelju kromatografski određene lipofilnosti razviti novu, brzu, selektivnu i osjetljivu analitičku metodu za određivanje 8 najznačajnijih fitoestrogena iz skupine izoflavona u obliku aglikona i njihovih glikozida.

Određeni su parametri koji opisuju lipofilnost skupine strukturno sličnih fitoestrogena primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-UHPLC) s dvije metode različitih pH vrijednosti pufera pokretne faze. Ispitane su interakcije skupine strukturno sličnih fitoestrogena s fosfolipidima staničnih membrana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim umjetnim membranama (IAM-HPLC). Određeni su udjeli vezanja skupine strukturno sličnih fitoestrogena za najzastupljenije proteine plazme, humani serumski albumin i alfa-1-kiseli glikoprotein, primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim humanim serumskim albuminom (HPLC-HSA) i alfa-1-kiselim glikoproteinom (HPLC-AGP). Određena je permeabilnost skupine strukturno sličnih fitoestrogena i način prijenosa kroz sluznicu gastrointestinalnog trakta primjenom modela Caco-2 stanica.

Dobiveni rezultati diferenciraju fitoestrogene sukladno njihovoj strukturi, gdje su aglikoni pokazali značajno višu lipofilnost, jaču interakciju s fosfolipidima na IAM koloni, viši udio vezanja za AGP i višu Caco-2 permeabilnost u usporedbi s glikozidima. Međutim, udio vezanja za HSA bio je visok za sve ispitivane fitoestrogene.

Uspoređeni su eksperimentalno određeni farmakokinetički parametri s ADME parametrima izračunatim različitim računalnim programima. Dobra korelacija dobivena je za parametre koji opisuju lipofilnost fitoestrogena i udio vezanja za HSA, dok je veća razlika uočena za kromatografski određeno vezanje fitoestrogena za alfa-1-kiseli glikoprotein te za rezultate

određivanja permeabilnosti primjenom Caco-2 stanica, što ukazuje na povezanost *in silico* predviđanja sa složenošću pojedinog parametra.

Razvijena je nova analitička metoda primjenom QbD pristupa za određivanje sadržaja najznačajnijih fitoestrogena iz skupine izoflavona u obliku glikozida (genistin, sisotrin, daidzin, ononin) i aglikona (genistein, biokanin A, daidzein, formononetin) primjenom tehnike tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti obrnutih faza upotrebom detektora s nizom fotosenzitivnih dioda (RP-UHPLC-DAD). Osam odabranih izoflavona s vrlo različitim fizikalno-kemijskim svojstvima učinkovito je odijeljeno (razlučivanje veće od 2,0) tijekom samo 1,6 min što omogućuje istovremenu kvantifikaciju aglikona i glikozidnih oblika bez prethodno provedenog dugotrajnog postupka hidrolize. Razvijena metoda je validirana prema ICH smjernicama i primijenjena u analizi pripravaka različitih dozirnih oblika dostupnih na tržištu koji sadrže različite fitoestrogene namijenjene ženama u postmenopauzi. Razvijena je i dvodimenzionalna metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnute s masenom spektrometrijom (2D-UHPLC-MS) za pouzdanu identifikaciju fitoestrogena iz skupine izoflavona u složenom matriksu ispitivanih uzoraka.

Rezultati provedene analize novom RP-UHPLC-DAD metodom pokazuju značajna odstupanja između kromatografski određenog i deklariranog sadržaja ispitivanih izoflavona u pripravcima s fitoestrogenima kao i između pojedinih serija istog proizvoda. Navedeni rezultati ukazuju na nedostatak kontrole kvalitete pripravaka s fitoestrogenima što dovodi u pitanje sigurnost pacijenta zbog mogućeg visokog unosa izoflavona.

Ključne riječi: fitoestrogeni, izoflavoni, lipofilnost, biomimetička kromatografija, Caco-2 permeabilnost, kromatografija visoke djelotvornosti, kromatografija ultravisoke djelotvornosti, kvaliteta ugrađena u dizajn, dvodimenzionalna tekućinska kromatografija, masena spektrometrija

EXTENDED ABSTRACT

Intoduction: Phytoestrogens are biologically active compounds of plant origin that structurally mimic the principal mammalian estrogen. An increasing number of dietary supplements containing different phytoestrogens are widely present in the market targeting postmenopausal women. The content of isoflavones in dietary supplements is still not regulated and the dosages recommended by the manufacturers vary significantly with the product. The aim of the present study was to obtain data on pharmacokinetic properties for a set of 15 structurally related phytoestrogens from isoflavonoid (biochanin A, daidzein, formononetin, genistein, genistein-4,7-dimethylether, prunetin, 3,4,7-trihydroxyisoflavon, 4,6,7-trihydroxyisoflavon, 4,6,7-trimethoxyisoflavon, daidzin, genistin, ononin, sissotrin) and coumestan (coumestrol, coumestrol dimethylether) families, and to develop a novel, fast, selective and sensitive analytical method for simultaneous quantification of the 8 most important isoflavones in the aglycone and glycoside forms.

Materials and methods: Lipophilicity was measured using reversed phase ultra-high performance liquid chromatography (RP-UHPLC) gradient method on ODS column. Measurements were performed using mobile phase containing solvent A at physiological conditions, pH 7.4, and at pH 2.0 where all investigated compounds were in neutral form. The phospholipid binding measurements were carried out using high performance liquid chromatography (HPLC) gradient method on IAM.PC.DD.2 column with a stationary phase that contains covalently bonded phosphatidylcholine covering the silica particles at monolayer density. The protein binding measurements were carried out using HPLC gradient method on a plasma protein stationary phases that include human serum albumin (HSA) and alpha-1-acid-glycoprotein (AGP) chemically bonded to silica particles. Caco-2 cells, human colon adenocarcinoma cells, were used to estimate the permeability of phytoestrogens test compounds and to determine whether they are possible substrates for human P-glycoprotein (P-gp). The concentration of each phytoestrogen in Caco-2 assay samples was determined using tandem mass spectrometry coupled to ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC-MS/MS). *In silico* pharmacokinetic profiling was performed using online available computer platforms based on various theoretical approaches: ACD/Labs, ChemAxon, VCCLab, pkCSM, preADMET, admetSAR, ChemExper and Molinspiration. New UHPLC method with UV detection for simultaneous determination of a set of structurally related isoflavones was developed. Quality by Design (QbD) approach was employed using the DryLab software modelling package where stationary phase, gradient time, column temperature and the pH of

the eluent A were explored parameters. Validation was conducted according to Q2(R1) guidelines of International Conference Harmonization (ICH) and the method was applied for quantification of isoflavones in two chemical forms in complex matrices of various dietary supplements. Additionally to identification using external standard, the identity of selected compounds in complex samples was confirmed by using two-dimensional ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (2D-UHPLC-MS).

Results: For lipophilicity determination, Chromatographic Hydrophobicity Index (CHI) was measured. At pH 7.4 results showed that genistein-4,7-dimethylether and coumestrol dimethylether were the most lipophilic compounds with highest CHI_{ODS} values. As expected, isoflavonoids with polar glucoside group showed the lowest CHI_{ODS} values. A moderate correlation was observed between chromatographically obtained CHI_{ODS} values at pH 7.4 and calculated log*P* (ACD/Labs) values with r=0.69. The reason of this could be the fact that some of the investigated phytoestrogens are partially or fully ionized at pH 7.4, so the retention data represents the distribution of both species, while log*P* values represent the distribution of neutral species between octanol and water. To investigate the lipophilicity of the compound´s neutral species, measurements at pH 2.0 were carried out, where good correlation was observed between chromatographically obtained CHI_{ODS} values and calculated log*P* (ACD/Labs, Molinsipration and ChemExper) values with r values in the range of 0.83–0.89.

For phospholipid binding measurment CHI_{IAM} values were determined where investigated phytoestrogens showed moderate to high IAM partitioning. Lower CHI_{IAM} values were obtained for glycosylated phytoestrogens than those of the corresponding aglycones that could be compared to the results on ODS column.

Protein binding results showed high binding affinity to HSA, which is in accordance to *in silico* calculated data obtained by pkCSM (RSD from 0.3-11.4%) and preADMET (RSD from 3.0-28.8%) computer platforms. In general, all investigated phytoestrogens showed lower protein binding to AGP value than HSA. Experimentally obtained %AGP PB values correlated less with calculated plasma protein binding, as expected since AGP binds chemically very different drugs compared to HSA and it is represented in significantly lower extent in the whole plasma protein fraction. preADMET platform calculated plasma protein binding more similar to experimental data for %AGP PB values than pkCSM.

Since IAM partition, HSA and AGP binding is mainly governed by lipophilicity, with differences due to the presence of charge, these results were also compared to log*P* values predicted by ACD/Labs. A moderate correlations were observed between experimentally

obtained values and predicted log*P* values with r=0.66 (CHI_{IAM}), r=0.70 (%HSA protein binding) and r=0.77 (%AGP protein binding).

Substances with glycoside group showed low permeability using Caco-2 cells, as well as low IAM partitioning, therefore low intestinal absorption could be expected. In aglycone form, lipophilicity is significantly increased and due to low molecular weight, permeability on Caco-2 cell is high and can be compared with obtained high IAM partitioning. Comparison of efflux ratios in the presence and absence of a P-glycoprotein (P-gp) inhibitor did not identify any of the compound as P-gp substrate suggesting passive transport of investigated phytoestrogens. Experimentally obtained results were compared to *in silico* predicted data. Obtained results differed greatly from preADMET Caco-2 permeability calculations, while better intercorrelation was obtained with pkCSM and admetSAR platforms.

New UHPLC-DAD method was developed using DryLab® modelling software by creating a visual „Design Space“, in which the method is robust. The method was capable of efficiently separate all eight selected isoflavones in aglycone (biochanin A, daidzein, formononetin, genistein) and glycoside forms (daidzin, genistin, ononin, sissotrin) in only 1.6 min, with a resolution between peaks $R_S > 2.0$, allowing quantification in a very short time with lower solvent consumption. The developed method was validated in terms of selectivity, linearity, limits of detection and quantification, accuracy, precision, robustness, stability of solutions and extraction efficiency. The proposed method was applied to the analysis of eight selected isoflavones with diverse physicochemical properties in the dietary supplement samples avoiding time-consuming process of hydrolysis. The wide variability of detected versus the labelled amount of analytes was found in dietary supplements ranging from 23.1% to 282.5%. Different batch numbers of dietary products also showed variable differences between 2.4% - 22.9%. Only three samples were in the range of 80 - 120% of detected versus labelled amount. Additionally, identity of each analyte was confirmed by 2D-UHPLC-MS method in these various sample matrices.

Conclusions: The bioavailability, metabolism, and biological activity of phytoestrogens depend upon physicochemical properties. Lipophilicity may play a major role in their therapeutic efficacy. Our data demonstrate that tested set of phytoestrogens show low lipophilicity for glucosides and high for aglycones. Results obtained on the IAM column demonstrated moderate to high partition. Caco-2 assay resulted in more diverse data, ranging from low, moderate to high permeability. In addition, obtained results suggest only passive diffusion is involved in the transport of tested compounds, since none of them could be characterised as P-gp substrate. Furthermore, the bioavailability of phytoestrogens may also be

poor due to their interaction with plasma proteins. All investigated phytoestrogens have shown high human serum albumin binding (more than 94%) except daidzin (81%) and ononin (94%). Moreover, the obtained plasma protein binding data appear to be relevant in rationalizing the interference between various phytoestrogens.

In silico predictions are associated with the complexity of each parameter. Where good correlations were obtained between experimental and theoretical log*P* and %HSA PB data, a greater difference was obtained for %AGP PB and CaCo-2 values.

A new reversed phase UHPLC method with UV detection combined with 2D-UHPLC-MS method was developed for simultaneous determination of eight isoflavones in aglycone and glycoside forms. Systematic method development was performed by QbD approach using DryLab software modelling package. Optimised gradient method was able to separate selected isoflavones under 2.0 min. The method was validated as per ICH recommendations and was successfully applied to the analysis of isoflavones present in the dietary supplements containing also other substances. Analysis revealed deviations between measured and labelled content of isoflavones in investigated dietary supplements as well as high batch to batch variations. In addition, a 2D-UHPLC-MS method was employed for identification and selectivity confirmation of the developed method due to complicated matrix present in the dietary supplements. A newly developed UHPLC-UV method can be used to carry out analysis of selected isoflavonoids in routine analysis of dietary supplements.

Keywords: phytoestrogens, isoflavones, lipophilicity, biomimetic chromatography, Caco-2 permeability, ultra-high performance liquid chromatography, high performance liquid chromatography, quality by design, dietary supplement, two dimensional liquid chromatography, mass spectrometry

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. FITOESTROGENI 2

1.1.1. Podjela fitoestrogena 2

1.1.2. Mehanizam djelovanja i farmakokinetika fitoestrogena 3

1.2. FARMAKOKINETIKA U ISTRAŽIVANJU I RAZVOJU FARMAKOLOŠKI AKTIVNIH SUPSTANCIJA 5

1.2.1. Apsorpcija i Caco-2 model za određivanje permeabilnosti 5

1.2.2. Distribucija i vezanje na proteine plazme 8

1.2.3. Metabolizam i eliminacija 9

1.3. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI KOJI UTJEČU NA FARMAKOKINETIKU 11

1.3.1. Lipofilnost 11

1.4. *In-silico* PREDVIĐANJE FARMAKOKINETIČKIH PARAMETARA 14

1.5. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA 15

1.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti 17

1.5.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti 18

1.5.3. Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija 19

1.5.4. Primjena tekućinske kromatografije 20

1.5.4.1. Primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-HPLC) 21

1.5.4.2. Biomimetički kromatografski sustavi 23

1.5.4.3. Primjena dvodimenzionalne tekućinske kromatografije 25

1.6. VEZANI SUSTAVI TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI I MASENE SPEKTROMETRIJE 26

1.6.1. Detektor s nizom fotosenzitivnih dioda 26

1.6.2. Maseni spektrometar 26

1.6.2.1. Ionizacijske tehnike 27

1.6.2.2. Analizatori masa 28

1.6.3. Primjena vezanog sustava LC-MS 29

1.7. KVALITETA UGRAĐENA U DIZAJN U RAZVOJU ANALITIČKIH METODA 31

1.8. PREGLED ANALITIČKIH METODA U ISTRAŽIVANJU FITOESTROGENA 34

2. OBRAZLOŽENJE TEME 36

3. MATERIJELI I METODE 39

3.1. MATERIJELI I KEMIKALIJE 40

3.1.1. Standardne supstancije 40
3.1.2. Pripravci s fitoestrogenima 41
3.1.3. Materijali za određivanje permeabilnosti 41
3.1.4. Kemikalije 42
3.1.5. Nepokretne faze korištene u razvoju metoda tekućinske kromatografije 42
3.2. INSTRUMENTI 44
3.2.1. Tekućinska kromatografija 44
3.2.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrijom masa (QQQ) 44
3.2.3. Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrijom masa (2D-UHPLC-QTOF) 45
3.2.4. Pribor za pripremu otopina i uzoraka 45
3.2.5. Računalni programi 45
3.3. METODE 47
3.3.1. Određivanje lipofilnosti skupine fitoestrogena primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-UHPLC) 47
3.3.2. Ispitivanje interakcija skupine fitoestrogena s fosfolipidima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim umjetnim membranama (IAM-HPLC) 49
3.3.3. Ispitivanje vezanja skupine fitoestrogena za humani serumski albumin primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim humanim serumskim albuminom (HSA-HPLC) 50
3.3.4. Ispitivanje vezanja skupine fitoestrogena za alfa-1-kiseli glikoprotein primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim alfa-1-kiselim glikoproteinom (AGP-HPLC) 52
3.3.5. Određivanje permeabilnosti primjenom Caco-2 stanica 53
3.3.6. *In-silico* predviđanje farmakokinetičkih parametara 58
3.3.7. Razvoj metode QbD pristupom za istovremeno određivanje aglikonskih i glikozidnih oblika izoflavona primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-UHPLC) 59
3.3.8. Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrom masa visokog razlučivanja (2D-UHPLC-QTOF) 61
4. REZULTATI I RASPRAVA 63
4.1. ODREĐIVANJE FARMAKOKINETIČKIH PARAMETARA 64
4.1.1. Lipofilnost odabranih fitoestrogena određena primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (RP-UHPLC) 66
4.1.2. Interakcije odabranih fitoestrogena s fosfolipidima ispitane primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim umjetnim membranama (IAM-HPLC) 71

4.1.3. Interakcije odabranih fitoestrogena i proteina plazme određene biomimetičkom kromatografijom 75

4.1.3.1. Vezanje odabranih fitoestrogena za humani serumski albumin određeno primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim humanim serumskim albuminom (HSA-HPLC) 76

4.1.3.2. Vezanje odabranih fitoestrogena za alfa-1-kiseli glikoprotein određeno primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim alfa-1-kiselim glikoproteinom (AGP-HPLC) 79

4.1.4. Određivanje permeabilnosti odabranih fitoestrogena primjenom Caco-2 stanica 82

4.1.5. Usporedba eksperimentalno određenih farmakokinetičkih parametara i ADME parametara predviđenih računalnim programima 86

4.2. RAZVOJ UHPLC METODE ZA ISTOVREMENU ANALIZU AGLIKONA I GLIKOZIDA IZOFLAVONA 92

4.2.1. p*K*a i log *D* parametri predviđeni računalnim programom 93

4.2.2. Razvoj UHPLC-DAD metode primjenom QbD pristupa 94

4.2.3. Validacija UHPLC-DAD metode 99

4.2.4. Analiza pripravaka s fitoestrogenima primjenom nove UHPLC-DAD metode 103

4.2.4.1. Ekstrakcijska učinkovitost 105

4.2.4.2. Identifikacija izoflavona u složenom matriksu pripravaka s fitoestrogenima primjenom 2D-UHPLC-MS metode 105

4.2.4.3. Kvantitativno određivanje odabranih izoflavona u uzorcima pripravaka primjenom UHPLC-DAD metode 108

4.2.5. Usporedba nove UHPLC-DAD metode s postojećim metodama za određivanje fitoestrogena 110

5. ZAKLJUČAK 112

6. LITERATURA 115

ŽIVOTOPIS 126

1. UVOD

1.1. FITOESTROGENI

Fitoestrogeni su se široko primjenjivali u različitim kulturama i vremenskim razdobljima tijekom povijesti. Empirijski podatci i epidemiološka istraživanja ukazuju da je učestalost hormonsko uzrokovanih bolesti smanjena u zemljama s visokim udjelom fitoestrogena u prehrani. Stoga je i zanimanje za fitoestrogene dramatično poraslo nakon što je utvrđeno da hormonska nadomjesna terapija nije sigurna i učinkovita kako se prethodno pretpostavljalo [1]. Naime, brojna istraživanja su provedena kako bi se dokazala sigurnost i učinkovitost prehrambenih proizvoda i pripravaka koji sadrže fitoestrogene za ublažavanje simptoma menopauze, osteoporoze, karcinoma, kardiovaskularnih i neurodegenrativnih bolesti, bolesti imunološkog sustava i metaboličkih bolesti [2-8]. Međutim, neki pregledni radovi su pokazali da učinkovitost fitoestrogena još uvijek nije jasna. Više problema je opisano u provedenim istraživanjima od kojih su najznačajniji heterogenost studija, poteškoće u razumijevanju farmakologije fitoestrogena zbog njihove velike raznolikosti i brojnosti u biljnim izvorima, a time i mogućih interferencija, te nepostojanja standardizacije fitoestrogena u pripravcima. Na tržištu se nalazi sve veći broj pripravaka koji sadrže različite fitoestrogene namijenjene ženama u postmenopauzi koje su posebno rizična skupina i za nepoželjne učinke, povećanu mogućnost karcinoma i hipotireoze povezane s unosom izoflavona. Iako su izoflavoni najčešći fitoestrogeni koji pokazuju najveći učinak, njihov sadržaj u pripravcima još uvijek nije reguliran. Preporučena doza se razlikuje ovisno o proizvodu, a kreće se između 20-80 mg izoflavona dnevno. Osim što se razlikuju kvantitativno s obzirom na ukupni sadržaj izoflavona, dodatno se razlikuju i kvalitativno s obzirom na pojedini izoflavon, uključujući omjere pojedinih izoflavona te omjere slobodnih i glikoziliranih izoflavona, kao i s obzirom na pomoćne tvari u formuliranim farmaceutskim oblicima [9].

1.1.1. Podjela fitoestrogena

Fitoestrogenima se smatra skupina s više od 100 molekula, koje se dijele prema kemijskoj strukturi na izoflavonoide, lignane, kumestane i stilbene.

Izoflavonoidi obuhvaćaju najvažniju i u biljnom svijetu najrasprostranjeniju skupinu fitoestrogena, izoflavone, s vrlo visokom biološkom aktivnošću. Izoflavoni se nalaze u obliku aglikona ili glikozida gdje je jedna molekula glukoze vezana za hidroksilnu skupinu na položaju

7 u strukturi. Glikozilirani izoflavoni se mogu esterificirati tvoreći acetil-glikozide i malonil-glikozide. Glikozidni izoflavoni podliježu hidrolizi u tankom crijevu, prelaze u aglikone i u takvom obliku dolazi do apsorpcije.

Kumestani su strukturno slični izoflavonoidima i zato ih se svrstava u zajedničku skupinu flavonoidnih fitoestrogena (Slika 1). Lignani i stilbeni su skupina ne-flavonoidnih fitoestrogena. Lignani također mogu postojati u obliku aglikona i glikozida, dok se stilbeni nalaze u obliku monomera, dimera ili polimera [10,11].



Izoflavoni Kumestani

Slika 1. Osnovne strukture izoflavona i kumestana: R_1 – H, OH, OCH_3; R_2 – H, OH, OCH_3; R_3 – OH, OCH_3, glikozidna skupina; R_4 – OH, OCH_3, R_5 – H, OH

1.1.2. Mehanizam djelovanja i farmakokinetika fitoestrogena

Fitoestrogeni su bifenilne nesteroidne supstancije koje su strukturno slične estrogenima, što im omogućuje vezanje na ljudski estrogen receptor (ER). Na taj način mogu pokazivati različite estrogene i anti-estrogene učinke, iako izoflavoni u usporedbi s 17β-estradiolom pokazuju 100-500 puta niži afinitet za ER. U organizmu se nalaze dvije forme estrogenih receptora, ERα i ERβ, s različitom ekspresijom u tkivima. Dosadašnji podatci ukazuju da ERα ima veliku ulogu u posredovanju estrogenih učinaka na uterus, hipotalamus/hipofizu, koštani sustav i ostala klasična estrogena ciljna tkiva. ERβ ima utjecaj na jajnike, kardivaskularni sustav, mozak i na upalne procese u nekoliko životnjskih modela. Estrogeni receptori su pripadnici steroidnih/tiroidnih intracelularnih receptora, lociranih primarno u membranama jezgri. Interakcija s izoflavonima dovodi do aktivacije takozvanih elemenata estrogenskog odgovora na unutarnjoj strani membrane jezgre. Na taj način se može utjecati na genetski mehanizam, točnije na transkripcijske procese.

Izoflavoni djeluju kao agonisti estrogenskih receptora, ali je njihova aktivnost manja od 17β-estradiola. Pri dovoljno visokim koncentracijama (preko 100 nmol/L za genistein), učinak izoflavona se može približiti onome endogenog 17β-estradiola pri fiziološkoj koncentraciji. Učinak izoflavona dodatno ovisi i o koncentraciji endgoenog estradiola, s obzirom da se izoflavoni i endogeni estradiol natječu za vezanje na ER. U stanju visokih koncentracija endogenih estrogena (kod žena u folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa), izoflavoni mogu spriječiti potpunu estrogenu aktivnost zauzimanje dijela estrogenih receptora. U drugom slučaju, kod stanja niskih koncentracija endogenih estrogena (kod muškaraca, žena u menopauzi itd.), estrogena aktivnost izoflavona može doći do izražaja. U navedenom kontekstu, izoflavoni se sve više koriste kao alternativna ili komplementarna terapija nadomjesnoj hormonskoj terapiji žena u postemenopauzi, osobito u slučajevima dugoročne terapije [12].

Izoflavoni također pokazuju i ne-genomske učinke. Genistein *in vitro* inhibira aktivnost tirozin protein kinaze. Genistein utječe i na gene koji sudjeluju u kontroli rasta stanica putem učinka na stanice ubojice, inhibiciju enzima i peroksisom-proliferator regulaciju. Sveukupni dokazi upućuju na postojanje različitih puteva, ne samo estrogen ovisnih, kojima izoflavoni i njihovi metaboliti iskazuju svoj učinak [13].

Fitoestrogeni se u biljkama nalaze u obliku glikozida (npr. daidzin, genistin, glicitin) koji nemaju biološku aktivnost. Kako bi došlo do apsorpcije fitoestrogena iz hrane ili pripravka, moraju se prevesti u biološki aktivni oblik, aglikon, uz pomoć enzima u usnoj šupljini, tankom crijevu i mikroflore u debelom crijevu. Djelovanjem enzima glukozidaze i laktaza-florizin hidrolaze (LPH) dolazi do hidrolize glikozida i uklanjanja šećerne skupine i na taj način nastaje aktivni oblik, aglikon (npr. daidzein, genistein, glicitein). Aglikonski oblici izoflavona se apsorbiraju iz tankog crijeva i transportiraju u krv ili ostaju u probavnom sustavu gdje se metaboliziraju. Ukoliko se transportiraju u krv, dolaze do jetre gdje se odvija daljnji metabolizam izoflavona; izoflavoni se konjugiraju s glukuronskom kiselinom i sulfatima. U krvnom serumu najveće koncentracije izoflavona dostižu se 2-8 sati nakon konzumacije. Ukoliko izoflavoni ostaju u probavnom sustavu dalje se metaboliziraju. Mikroflora debelog crijeva metabolizira daidzein u ekvol ili O-desmetilangolen, a genistein do p-etilfenola. Ekskrecija se odvija najčešće urinom tijekom 24 sata [14,15].

1.2. FARMAKOKINETIKA U ISTRAŽIVANJU I RAZVOJU FARMAKOLOŠKI AKTIVNIH SUPSTANCIJA

Supstancija (lijek, otrov ili nutrijent) koja određenim putem dospije u krvotok djeluje na pojedine organe, ali i organizam djeluje na supstanciju. Djelovanje organizma na supstanciju opisuje farmakokinetika i obuhvaća apsorpciju supstancije u krv, raspodjelu u tjelesnim tekućinama i tkivima, metabolizam i izlučivanje nepromijenjene supstancije ili njenog produkta biotransformacije. Za navedene farmakokinetičke parametre koristi se skraćenica ADME (engl. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion*). Farmakološki učinak, djelovanje supstancije na organizam, se dugo vremena smatrao najvažnijim dijelom razvoja lijeka.

Navedenim pristupom su razvijani novi lijekovi koji nisu imali prikladna farmakokinetička svojstva. Kao posljedica toga, čak do 40% lijekova u fazi kliničkih ispitivanja je povučeno iz daljnjeg razvoja, prvenstveno zbog loše bioraspoloživosti [16-19]. Ispitivanje farmakokinetičkih svojstava i utvrđivanje netoksičnosti je neizostavan dio ranog razvoja lijeka, usporedno s ispitivanjem farmakološkog učinka, kako bi ishod bio uspješan. Poželjne osobine lijeka, između kojih je neophodno pronaći ravnotežu, su visoka topljivost i apsorpcija, dobra distribucija u ciljna tkiva, prikladna metabolička stabilnost i minimalna biotransformacija u toksične metabolite, opsežna interakcija s namijenjenim ciljem i minimalna interakcija s nenamijenjenim ciljevima, minimalna interakcija s usporednom terapijom, minimalna toksičnost i prikladna brzina eliminacije.

Dodatno se u istraživanju lijekova koriste vrlo učinkovita *in vitro* mjerenja svojstava koja su ključna za razumijevanje njihove *in vivo* apsorpcije, distribucije, metabolizma, eliminacije i toksičnosti [20].

1.2.1. Apsorpcija i Caco-2 model za određivanje permeabilnosti

Bioraspoloživost je definirana kao frakcija primijenjene doze lijeka koja u nepromijenjenom obliku dospijeva u sistemsku cirkulaciju i ostvaruje svoj učinak. Bioraspoloživost lijeka uvelike ovisi o apsorpciji, dok čitav niz čimbenika utječe na apsorpciju lijeka nakon oralne primjene. Apsorpcija ovisi o vanjskim faktorima (hrana, formulacija lijeka) i unutarnjim faktorima (volumen i pH probavnih tekućina, motilitet i vrijeme prolaska kroz pojedine dijelove probavnog sustava, probavni enzimi, gastrointestinalna permeabilnost) [21].

Svojstvo od posebne važnosti kod oralno primijenjenog lijeka je sposobnost prolaska kroz sluznicu gastrointestinalnog trakta.

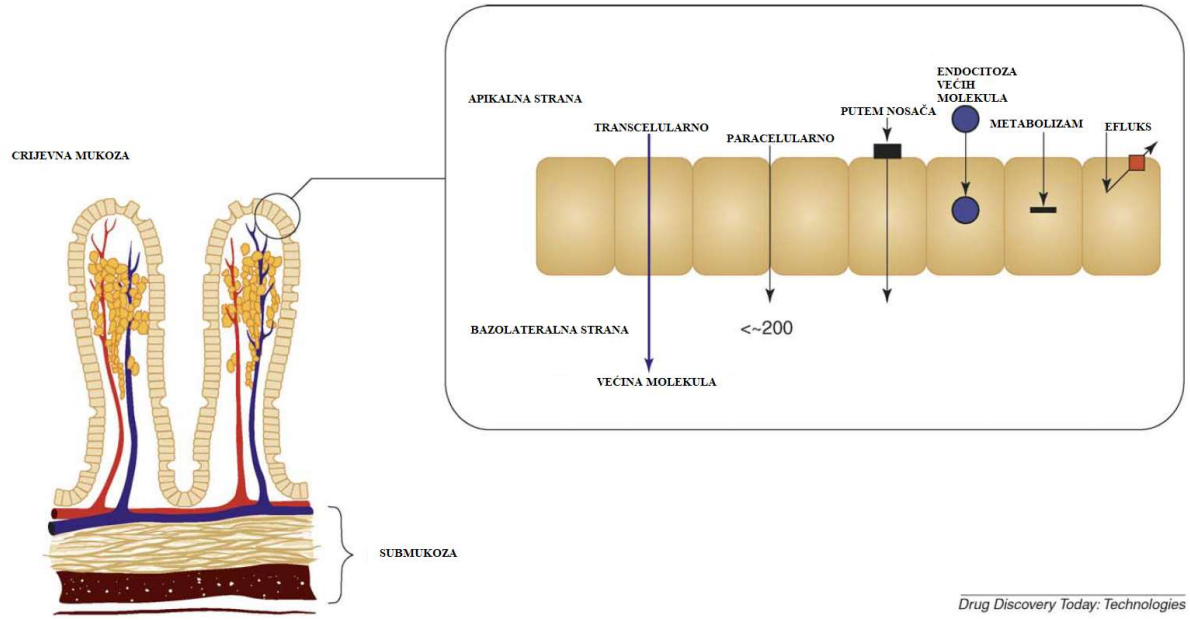
Poznato je nekoliko mehanizama prijenosa lijekova (Slika 2). Pasivni transcelularni transport je glavni put apsorpcije lipofilnih lijekova. Oni lako prolaze lipidni dvosloj staničnih membrana pasivnom difuzijom. Permeabilnost (P_m) lipofilnih lijekova ovisi o membranskim koeficijentima razdjeljenja (K_m) i difuzije (D_m) spoja te debljini stanične membrane (L):

$$P_m = \frac{K_m x\, D_m}{L} \qquad (1)$$

Membranski koeficijenti razdjeljenja između dvosloja lipida i vodene faze obuhvaća sve molekularne interakcije lijeka i membrane, dok membranski koeficijent difuzije ovisi o veličini molekule lijeka. Kako su lijekovi većinom manji od membranskih lipida, veličina u manjoj mjeri utječe na pasivnu difuziju, dok je koeficijent razdjeljenja između dvosloja lipida i vodene faze ključni parameter koji određuje brzinu transporta lijeka kroz staničnu membranu.

Lijekovi koji su polarni i netopljivi u fosfolipidnom dvosloju apsorbiraju se paracelularnim transportom. Ovakva potpomognuta difuzija uključuje korištenje transportnog proteina koji ovisno o koncentracijskom gradijentu, lijek prenose s mjesta više na mjesto niže koncentracije bez utroška energije.

Aktivni transport također podrazumijeva posredovanje transportnog proteina, ali uz utrošak energije dobivene iz adenozin trifosfata (ATP). Ovakav transport nije ovisan o koncentracijskom gradijentu lijeka, ali s obzirom da uključuje transportne proteine, može doći do zasićenja i do inhibicije. Najčešće istraživani transportni protein je P-glikoprotein (P-gp) [22-24].



Slika 2. Prikaz različitih puteva apsorpcije lijekova [25]

Iako postoje razlike u lipidnom sastavu membrane različitih stanica, udio lipidnog dvosloja je jednak za gotovo sve stanice. Prema tome će se pasivni transcelularni transport odvijati neovisno o vrsti stanica (u *in vivo* organima i u *in vitro* stanicama). Na taj način je razvijen niz eksperimentalnih metoda za predviđanje apsorpcije oralno primijenjenog lijeka. Za istraživanje pasivnog transporta koriste se membrane od jednog fosfolipidnog dvosloja (liposomi), dok se za istraživanje pasivnog i aktivnog transporta koriste različite stanične linije od kojih se Caco-2 model smatra zlatnim standardom određivanja permeabilnosti u ranom istraživanju i razvoju.

Caco-2 model pokazuje vrlo dobru korelaciju s *in vivo* apsorpcijom, pozdan je, jednostavno se izvodi i zahtijeva vrlo malu količinu supstancije. Stanična linija se dobiva izolacijom iz epitelnih stanica humanog adenokarcinoma. Dolazi do spontane diferencijacije gdje se stvaraju uske pore među stanicama koje služe kao model za paracelularni transport. Dodatno sadrže i sustave za aktivni transport koji uključuju transportere žučnih kiselina, amino kiselina i šećera, P-glikoprotein itd. Na mnogo načina pokazuju funkcije ljudskih normalnih enterocita.

Caco-2 monosloj se diferencira na polupropusnoj plastičnoj membrani unutar komore približno 21 dan. Otopina ispitivane supstancije se zatim dodaje gornjoj ili apikalnoj strani koja predstavlja luminalnu stranu crijeva i tada se određuje transport u apikalno-bazolateralnom smjeru (A2B). Kada se dodaje donjoj ili bazolateralnoj strani koja predstavlja krvotok, odnosno limfni tok u gastrointestinalnom traktu, tada se određuje transport u bazolateralno-apikalnom smjeru (B2A). Koeficijent permeabilnosti ovisi o uvjetima provođenja pokusa te o

karakteristikama sloja Caco-2 stanica zbog čega se u svakom pokusu koriste referentne tvari koje predstavljaju visokopermeabilni standard (npr. diklofenak) ili P-gp supstrat (npr. amprenavir) ako se ispituje aktivni transport [26,27]. Lijek se smatra P-gp supstratom kada je omjer efluksa (tj. omjer brzine putovanja lijeka u B2A i A2B smjeru) u odsutnosti inhibitora > 2 uz značajno smanjenje (>50%) u prisutnosti inhibitora.

1.2.2. Distribucija i vezanje na proteine plazme

Nakon dolaska u krvotok, učinkovitost i sigurnost, metabolizam, interakcije s drugim lijekovima te prolazak kroz krvno-moždanu barijeru, ovisit će o distribuciji lijeka u organizmu. Većina lijekova se vrlo brzo veže za proteine plazme, zbog čega je mjerenje opsega vezanja i razumijevanje svojstava koji upravljaju vezanjem od velike važnosti tijekom razvoja lijeka. Vezanje za proteine plazme se odnosi na reverzibilnu vezu lijeka i proteina uslijed djelovanja elektrostatskih i hidrofobnih veza. Reverzibilno vezani lijek će biti u ravnoteži sa slobodnom, nevezanom, frakcijom lijeka. Udio vezanog lijeka će ovisiti o afinitetu lijeka za različite proteine te o kapacitetu vezanja svakog proteina. Nadalje, samo slobodna frakcija lijeka je u mogućnosti pasivno proći membrane, vezati se na ciljni receptor i izazvati farmakološki učinak.

Plazma sadrži više od 60 različitih proteina, od kojih je najzastupljeniji (60% od ukupnih proteina) humani serumski albumin (HSA). Molekulska masa HSA je 66,5 kDa i sadrži 585 aminokiselina. Identificirano je najmanje 18 različitih mutacija humanog serumskog albumina kao posljedica mutacije po jedne aminokiseline. Slijedeći po zastupljenosti je alfa-1-kiseli glikoprotein (AGP). AGP je značajno rijeđe zastupljen u plazmi (oko 3%), molekulska masa je 44 kDa i sadrži 183 aminokiseline. Polarne skupine koje se nalaze na površini navedenih proteina privlače molekule suprotnog naboja, stoga će HSA imati viši afinitet vezanja za kisele lijekove, dok će AGP imati viši afinitet vezanja za bazične lijekove.

Vezanje lijekova na proteine plazme može značajno varirati kod različitih stanja i bolesti, ali i kod zdravih pojedinaca. Opseg vezanja je uglavnom kontroliran lipofilnošću lijeka gdje viša log*D* vrijednost za bazične i neutralne, a viša log*P* vrijednost za kisele lijekove, obično vodi do višeg opsega vezanja. Ostale značajne karakteristike koje se mogu mijenjati u svrhu optimizacije vezanja na proteine plazme su ionizacija, veličina molekule i mogućnost stvaranja vodikovih veza. Postoji vrlo velik broj eksperimentalnih metoda pomoću kojih se određuje vezanje na proteine plazme. Metoda ravnotežne dijalize se smatra zlatnim standardom, dok su ostale metode također značajne, kao što su ultrafiltracija, mikrodijaliza, dinamična dijaliza,

ultracentrifugiranje, kromatografske metode te različite spektroskopske tehnike [28,29]. U većini slučajeva se vezanje na proteine plazme (PPB) izražava kao postotak sljedećom formulom:

$$\%\text{PPB} = 100\ (1 - fu_p) \tag{4}$$

$$K^{B/F} = (1 - fu_p) / fu_p = \%\text{Vezano} / \%\text{Slobodno} \tag{5}$$

gdje je
$K^{B/F}$ – konstanta pseudo-vezanja
fu_p – slobodna frakcija lijeka u plazmi.

Krvno-moždana barijera (Blood-Brain Barrier – BBB) razdvaja mozak i središnji živčani sustav od krvotoka i predstavlja najvažniji čimbenik koji ograničava razvoj novih lijekova namijenjenih djelovanju u srdišnjem živčanom sustavu. Dodatno su važna ispitivanja prolaska kroz krvno-moždanu barijeru i za lijekove koji nisu namijenjeni djelovanju u središnjem živčanom sustavu kako bi se izbjegli nepoželjni učinci. Jedna od prepoznatljivih karakteristika krvno-moždane barijere je prisustvo vrlo čvrsto spojenih endotelnih stanica moždanih kapilara. Takva barijera sprječava prolazak oko 98% svih potencijalnih lijekova kandidata za središnji živčani sustav. Stoga se, prolazak krvno-moždane barijere odvija pasivnom difuzijom, transcelularno, ili aktivnim transportom uz posredovanje različitih transportnih proteina. Najčešće korištene eksperimentalne metode za ispitivanje prolaska kroz krvno-moždanu barijeru su animalni modeli i stanična linija dobivena od moždanih mikrovezikularnih endotelnih stanica ($BMEC^2$) [30,31].

1.2.3. Metabolizam i eliminacija

Metabolizam ili reakcije biotransformacije lijeka mogu se definirati kao kemizam enzimskih i neenzimskih procesa. Identifikacija kemijskih entiteta nastalih *in vitro* tijekom rane faze razvoja i *in vivo* u organizmu životinja i ljudi je od velike važnosti kako bi se ispitala njihova farmakološka učinkovitost i toksičnost. Produkti biotransformacije su najčešće polarniji metaboliti i topljiviji u vodi koji se iz tijela izlučuju brže od lijeka, ali isto tako mogu nastati biološki aktivni metaboliti ili čak i toksični. Metabolizam lijekova se u najvećoj mjeri

odvija u jetri, a reakcije biotransformacije se dijele u dvije faze. Prva faza obuhvaća reakcije oksidacije, redukcije i hidrolize čime mogu nastati više reaktivne molekule. Prva faza se odvija uglavnom uz djelovanje enzima citokrom P450. Druga faza obuhvaća reakcije sinteze, konjugacije s glukuronskom kiselinom, sumpornom kiselinom ili glutationom te nastaju inaktivni spojevi koji su polarniji te se lakše izlučuju iz organizma.

Za ispitivanje metabolizma koriste se različiti eksperimentalni modeli kao što su ljudski i životnjski mikrosomi, hepatociti te animalni modeli. Metaboliti se zatim analiziraju vezanim sustavima kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti-spektrometrija masa (HPLC/MS/MS) [21,32].

Izlučivanje lijekova i njihovih metabolita odvija se na različite načine od kojih su najznačajniji putem bubrega, žuči i pluća. Izlučivanje putem bubrega je najčešći put eliminacije i odvija se putem glomerularne filtracije, pasivne i aktivne reapsorpcije, aktivnog izlučivanja i biotransformacije. Za ispitivanje eliminacije koriste se animalni modeli [21].

1.3. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI KOJI UTJEČU NA FARMAKOKINETIKU

Određivanje fizikalno-kemijskih parametara je integralni dio rane faze razvoja lijeka, jer omogućuje razumijevanje ključnih svojstava koja utječu na apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju. Među najvažnijim fizikalno-kemijskim svojstvima su lipofilnost, topljivost, p*K*a, permeabilnost, stabilnost i integritet spoja [33-35]. Neposredno nakon sinteze novog potencijalnog lijeka, provodi se analiza „pravilo 5“ ili Lipinskijevo pravilo, koja služi kao prvi filter za daljnje istraživanje. Prema tom pravilu, dobra gastrointestinalna apsorpcija se može očekivati za lijekove koji zadovoljavaju sljedeće uvjete:

1. broj donora protona je manji od 5,
2. broj akceptora protona je manji od 10,
3. molekularna masa manja od 500 Da,
4. logaritam koeficijenta razdjeljenja, log *P*, manji od 5 i
5. prethodna pravila nisu važeća ako se radi o aktivnom transportu

U slučaju gdje dva uvjeta nisu zadovoljena, može se očekivati loša apsorpcija ili permeabilnost [36,37].

Za predviđanje prolaska lijeka kroz krvno-moždanu barijeru, Norinder i Haeberlein [38] su definirali sljedeće uvjete koje lijek treba zadovoljiti za prolazak kroz barijeru:

1. zbroj atoma dušika i kisika u molekuli je manji ili jednak 5 i
2. vrijednost log *P* – (N+O) je pozitivna.

1.3.1. Lipofilnost

Lipofilnost se smatra najznačajnijim fizikalno-kemijskim parametrom u istraživanju novih potencijalnih lijekova jer utječe na ostala svojstva molekule kao što su topljivost i permeabilnost, vezanje na proteine plazme i toksičnost. Lipofilnost je jedini parametar koji izravno utječe na sve farmakokinetičke (ADME) procese. Lipofilnost utječe i na raspodjelu lijeka u različita tkiva i na prolaz kroz krvno-moždanu barijeru. Lipofilni lijekovi su podložniji reakcijama biotransformacije, a u nepromijenjenom obliku se duže zadržavaju u organizmu zbog sporije eliminacije bubrezima [39,40].

Lipofilnost molekule predstavlja afinitet molekule ili dijela molekule za lipidno okruženje. Određuje se raspodjelom spoja u sustavu dviju faza koje se ne miješaju. Sustavi dviju faza mogu biti tekućina-tekućina ili krutina-tekućina. Hansch i Fujita su prvi predložili izražavanje lipofilnosti logaritamskom vrijednosti koeficijenta razdjeljenja između dviju faza, *n*-oktanola i vode, log *P*. Do danas je log *P* ostao najčešće korišten pokazatalj lipofilnosti, a sustav sa *n*-oktanolom najznačajniji jer strukturom nalikuje strukturi fosfolipida stanične membrane. Pozitivna log *P* vrijednost upućuje na veći afinitet molekule za organsku fazu, dok negativna vrijednost za vodenu fazu. Lipofilnost, odnosno log *P* vrijednost, je određena inter- i intramolekularnim silama između molekule sustava dviju faza koje se ne miješaju [41-43].

Koeficijent razdjeljenja *P* je definiran kao omjer koncentracija lijeka pri ravnoteži između organske i vodene faze, a izražava se kao logaritam sljedećom formulom:

$$\log P = \log_{10} ([\text{lijek}]_o / [\text{lijek}]_v) \quad (6)$$

gdje je
P – koeficijent razdjeljenja
$[\text{lijek}]_o$ - koncentracija lijeka u organskoj fazi
$[\text{lijek}]_v$ - koncentracija lijeka u vodenoj fazi.

Vrijednost log *P* opisuje intrinzičnu lipofilnost pojedine ionske vrste, najčešće neutralne. Kada molekula sadrži ionizirajuće funkcionalne skupine, ukupna lipofilnost je opisana koeficijentom distribucije neutralnih i ioniziranih oblika molekule. Izražava se logaritmom koeficijenta distribucije (log *D*), koji ovisi o pH vrijednosti vodene faze sustava u kojem se provodi razdjeljivanje. Veliki broj lijekova sadrži funkcionalne skupine koje su slabe kiseline ili slabe baze, stoga ioniziraju u otopini ovisno o pH vrijednosti. Navedeno utječe na distribuciju i raspodjelu lijekova, a time i bioraspoloživost. Termodinamički parametar koji povezuje pH vrijednost s ionizacijskim stanjem molekule je konstanta disocijacije pK_a. Kada je pH vrijednost jednaka pK_a, tada se u vodenoj otopini nalaze jednake koncentracije neioniziranog i ioniziranog oblika molekule [44].

Eksperimentalno se koeficijent razdjeljenja i distribucije može odrediti na više načina. Najstarija je metoda izmućkavanja (engl. *shake flask*) koja je dugotrajna, potrebne su veće količine čistog spoja, a postupak je potrebno pažljivo provoditi zbog velike varijabilnosti rezultata. Potenciometrijska titracija se često koristi za brzo određivanje koeficijenta razdjeljenja pri cijelom pH profilu i za određivanje pK_a. Kromatografske metode na osnovu

vremena zadržavanja molekule imaju veliku prednost za određivanje lipofilnosti s obzirom na potrebnu malu količinu uzorka, jednostavne su i brze [22,44].

1.4. *In-silico* PREDVIĐANJE FARMAKOKINETIČKIH PARAMETARA

Uz eksperimentalne metode određivanja ADME parametara, dostupan je sve veći broj programskih paketa za predviđanje farmakokinetike potencijalnih lijekova. Osnovni ciljevi teorijskog, *in silico*, pristupa su smanjenje sredstava identifikacijom potencijalnih lijekova u ranoj fazi razvoja koji bi mogli imati lošu apsorpciju. Time se smanjuje potrebno uloženo vrijeme, ali i broj životinja za potrebe istraživanja. Dva su pristupa *in silico* modeliranja; podatkovno modeliranje i molekularno modeliranje. Podatkovno modeliranje se temelji na odnosu strukture i aktivnosti (engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR) gdje se koriste statistički alati za pretraživanje korelacije između određenog svojstva i skupa molekularnih i strukturnih deskriptora. Molekularno modeliranje se temelji na pristupu kao što je trodimenzionalno modeliranje proteina koji stupa u interakciju s molekulom lijeka [22,45,46].

Dostupni računalni programi se koriste za predviđanje ADME i povezanih parametara; gastrointestinalne apsorpcije, bioraspoloživosti, prolazak kroz krvno-moždanu barijeru, interakciju s transportnim proteinima, transdermalnu permeabilnost, permeabilnost kroz barijere oka, vezanje za proteine plazme, volumen distribucije, izlučivanje putem bubrega, reakcije biotransformacije. Također su razvijeni računalni programi za predviđanje fizikalno-kemijskih parametara; lipofilnost - izračun log *P*, log *D*, topljivost, pK_a, mogućnost stvaranja vodikovih veza, permeabilnost [45].

Primjena *in silico* metoda u ADME istraživanjima se pokazala kao veliki uspjeh prijašnjih godina. Za poboljšanje i razvoj novih računskih modela neophodna je kontinuirana usporedba s eksperimentalno određenim vrijednostima. Stoga je sprega između *in silico* metoda i eksperimentalnih metoda ključna za rutinsko korištenje teorijskih pristupa [45].

1.5. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA

Prvi rad o tekućinskoj kromatografiji je izdan davne 1905. godine, gdje je ruski botaničar Mihail Semjonovič Cvet opisao separaciju biljnih pigmenata pomoću tekućinske kromatografije na otvorenoj koloni. Time je tekućinska kromatografija (eng. *Liquid Chromatography,* LC) postala najstariji oblik kromatografije [47]. Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna (stacionarna faza) dok se druga pokretna (mobilna faza), giba u određenom smjeru. Tekućinska kromatografija je zbog svoje raznolikosti najšire korištena kromatografska tehnika, a obuhvaća različite modele separacije:

- adsorpcijska kromatografija - ravnoteža se uspostavlja između tekućine u pokretnoj fazi i površine čvrstog adsorbensa, pri čemu se molekule analiziranog uzorka vežu na površinu adsorbensa
- razdjelna kromatografija - ravnoteža se uspostavlja između dvije tekućine, pokretne faze i tekućine vezane na inertni nosač nepokretne faze
- kromatografija isključenjem - razdvajanje se zbiva zbog razlike u molekulskoj masi i obujmu na nepokretnoj fazi slabih adosrpcijskih svojstava i porama definiranih dimenzija
- afinitetna kromatografija - vezanje nastaje zbog specifičnih interakcija s funkcionalnim skupinama određenog prostornog rasporeda koje se nalaze na površini nepokretne faze [48].

Tekućinska kromatografija se zasniva na principu razdvajanja analita iz smjese na temelju različitog afiniteta prema pokretnoj i nepokretnoj fazi. Faktor zadržavanja (k) je mjera zadržavanja analita na koloni, jednaka je omjeru vremena koje otopljena tvar provede u nepokretnoj fazi prema vremenu koje provede u pokretnoj fazi [49]:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \tag{7}$$

gdje je

t_R – vrijeme zadržavanja ispitivanog spoja

t_M – vrijeme zadržavanja nezadržanog spoja (mrtvo vrijeme kromatografskog sustava).

Faktor zadržavanja k se može povezati s koeficijentom razdjeljenja analita (K) između nepokretne i pokretne faze prema jednadžbi [49]:

$$\log k = \log K + \log \frac{V_S}{V_M} \quad (8)$$

gdje je

V_S/V_M – omjer volumena nepokretne i pokretne faze.

Separacijski faktor ili koeficijent selektivnosti α je mjera relativnog zadržavanja dva analita [49]:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (9)$$

Koeficijent selektivnosti je mjera razlike u migraciji i ovisna je o više čimbenika; vrsti nepokretne faze, sastavu pokretne faze i svojstvima analita.

Kvaliteta separacije dva susjedna pika mjeri se razlučivanjem (R_S), a definirana je razlikom vremena zadržavanja dva pika podijeljena sa srednjom vrijednosti širine pika [49]:

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\left(\frac{w_{b1}+w_{b1}}{2}\right)} = \frac{\Delta t_R}{w_b} \quad (10)$$

gdje je

w_b – širina pika.

Kako bi došlo do potpunog razdvajanja pikova unutar istog kromatograma, razlučivanje mora biti veće od 1,5. Pri razlučivanju od 1,5 preklapanje susjednih pikova iznosi svega 0,3%.

Učinkovita kolona će producirati oštre kromatografske pikove i time moći razdvojiti više analita u određenom vremenu. Broj teoretskih tavana (N) je mjera učinkovitosti kolone i definiran je sljedećom jednadžbom [49]:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 \quad (11)$$

Učinkovitost kolone i koeficijent selektivnosti su komplementarni kromatografski deskriptori. Visoko učinkovita kolona može producirati uske pikove i omogućiti dobro razlučivanje analita

s niskom selektivnošću. S druge strane, ako kromatografski sustav pokazuje visoku selektivnost za dva analita, oni mogu biti odvojeni na koloni s niskom učinkovitošću [50].

1.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je novija forma tekućinske kromatografije koja koristi kolone s malim česticama punila kroz koje se unosi pokretna faza pod visokim tlakom. HPLC je postala primarna tehnika separacije koja omogućuje analizu kompleksnih smjesa različitih analita s visokom preciznošću i danas se smatra standardom u farmaceutskoj industriji za identifikaciju i određivanje sadržaja aktivnih farmaceutskih supstancija, kao i za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju onečišćenja. HPLC može biti potpuno automatiziran sustav s različitim detektorima koji mogu biti vrlo osjetljivi i specifični, a među najvažnijim značajkama je primjenjivost na 60-80 % postojećih supstancija. Nedostatci HPLC tehnike su velika potrošnja organskih otapala, a time i zagađenje okoliša, te nepostojanje univerzalnog detektora [49].

Tekućinski kromatograf se sastoji od više modula koji moraju zadovoljavati određene uvjete. HPLC je opremljen s jednim ili više spremnika pokretne faze i sustavom za obradu otapala koji uklanja plinove i čestice iz tekućina. Sustav crpki omogućuje postizanje tlaka do 400 bara, izlaz bez pulsiranja tlaka, brzine protoka pokretne faze od 0,1 do 10 mL/min, reproducibilnost protoka i otpornost na koroziju različitim otapalima. Sustav za automatsko unošenje uzorka u pokretnu fazu može kontinuirano unositi različite volumene analita. Kolona sadrži nepokretnu fazu i najčešće je konstruirana od nehrđajućeg čelika, duljine od 5 do 25 cm, unutarnjeg promjera od 3 do 5 mm i veličine čestica nepokretne faze od 3 do 5 μm. Odabir detektora ovisi o prirodi uzorka, a najčešće korišteni detektor s HPLC instrumentom se temelji na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja, detektori s nizom fotoosjetljivih dioda (DAD), fluorescencijski detektori (engl. *fluorescence detector*, FLD), elektrokemijski detektori (engl. *electrochemical* d*etector*, ED), detektori indeksa loma (engl. *refractive indeks detector*, RID) ili detektori raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku (engl. *evaporative light-scattering detector*, ELSD) [51].

1.5.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) je moderna tehnika koja omogućuje novi smjer razvoja tekućinske kromatografije. Odnosi se na poboljšanje u tri područja u usporedbi sa HPLC tehnikom: brzina, bolje razlučivanje i veća osjetljivost [52]. Osnova za razvoj UHPLC tehnike je materijal nepokretne faze, veličina čestica manja od 2 μm. Mehanizam UHPLC separacije i širenje kromatografske zone su opisane Van Deemterovom jednadžbom[49]:

$$H = A + \frac{B}{v} + C \cdot v \tag{12}$$

gdje je

H – visina teorijskog tavana (engl. *Height Equivalent to Theoretical Plate,* HEPT)

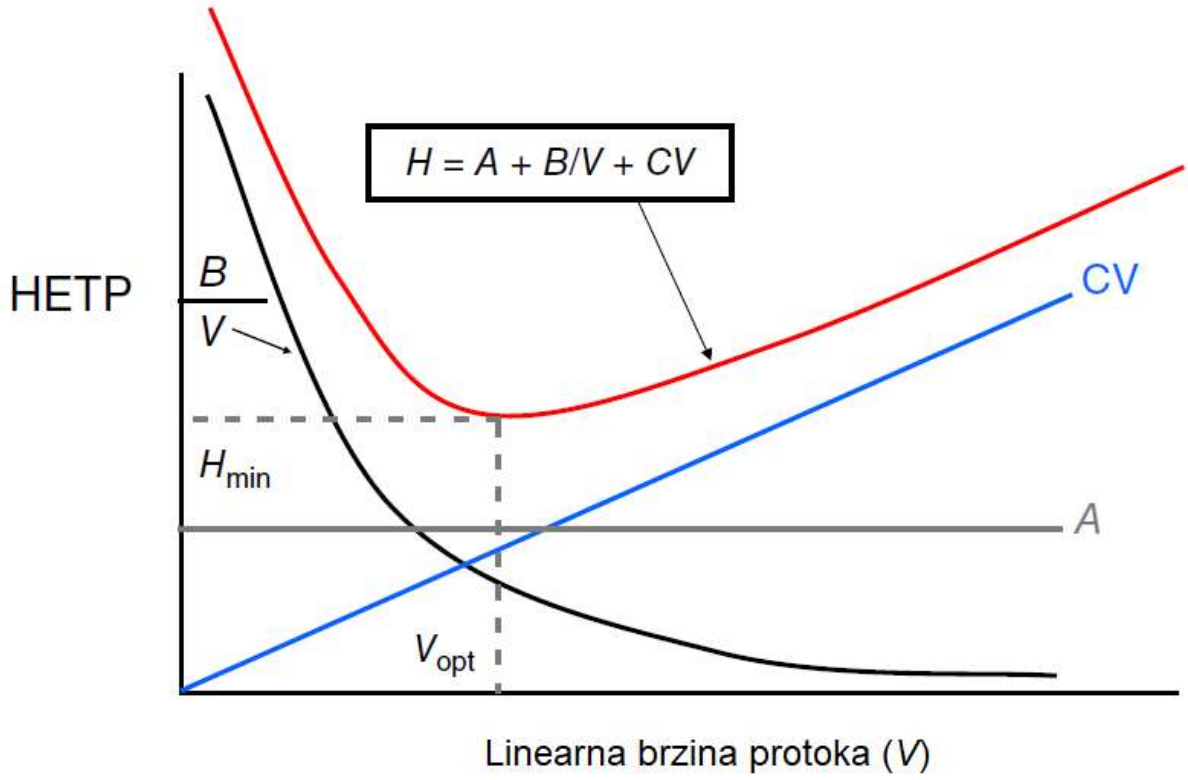
A – koeficijent vrtložne difuzije (engl. *Eddy diffusion*) - neovisan o brzini protoka i najmanji kod kolona s manjim i jednoliko pakiranim česticama

B – koeficijent uzdužne difuzije (engl. *longitudinal diffusion*) – ovisi o brzini protoka i pri visokim protocima je beznačajan

C - koeficijent prijenosa mase (engl. *mass transfer resistance)* – ovisi proporcionalno o brzini protoka

v - linearna brzina mobilne faze (engl. *velocity*).

Van Deemterova jednadžba opisuje odnos između visine teorijskog tavana (*HEPT*) i linearne brzine (protok pokretne faze). Teoretski se kolona može podijeliti na određeni broj odsječaka (teoretskih tavana, *N*) koji imaju svoju visinu (HEPT). Što je broj teoretskih tavana veći, to je visina pojedinog odsječka manja i ukazuje na bolju djelotvornost kolone. Glavni faktor koji određuje visinu odsječka je promjer čestica nepokretne faze, a najveća učinkovitost se postiže kod najmanje vrijednosti HEPT i optimalne brzine protoka (Slika 3)



Slika 3. Kromatografska učinkovitost opisana Van Deemterovom jednadžbom [49]

Zbog navedenih razloga, kako bi se postigla optimalna kromatografska učinkovitost, razvijene su kolone s nepokretnim fazama koje sadrže čestice promjera manje od 2 µm. S obzirom na visoke tlakove do kojih dolazi zbog uporabe čestica manjih od 2 µm, razvijeni su UHPLC uređaji koji mogu podnijeti tlak do 1200 bara. Prednosti UHPLC tehnike u usporedbi s HPLC tehnikom su brza separacija s dobrim razlučivanjem, brži razvoj metode, smanjena potrošnja otapala, bolja osjetljivost i ponovljivost, dok je nedostatak kraći vijek trajanja kolona zbog visokih tlakova [49,52].

1.5.3. Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija je izuzetno uspješan analitički alat za separaciju zbog velikog broja mogućih modela separacije i sposobnosti otapanja gotovo svih uzoraka u određenom otapalu. Dobra selektivnost je praćena i visokom učinkovitošću u vrlo kratkom vremenu analize korištenjem modernih UHPLC instrumenata i kratkih kolona koje sadrže čestice promjera ispod 2 µm [49,50-53]. Međutim, tekućinska kromatografija nije pogodna za razdvajanje

kompleksnih smjesa zbog nemogućnosti postizanja vrlo visoke učinkovitosti u kratkom vremenu gdje bi broj teoretskih tavana bio veći od 100 000 (kao kod plinske kromatografije ili kapilarne elektroforeze). U takvim slučajevima, za separaciju, kvalifikaciju i kvantifikaciju, metoda izbora je dvodimenzionalna tekućinska kromatografija (engl. *two dimensional liquid chromatography*, 2D-LC) [54].

Pojam višedimenzionalne separacije zahtjeva ispunjenje dva kriterija [55]:

- sastavnice uzorka prolaze dvije ili više nezavisnih separacija
- sastavnice se razdvoje u prvom koraku, a u drugom koraku se analiti od interesa prenose u drugu fazu različitih karakteristika kako bi se mogao provesti različit model separacije i/ili pogodnu za analize spregnute sa spektrometrijom masa.

Dvodimenzionalna tekućinska separacija može biti izvediva na dva načina s obzirom na broj analiziranih kromatografskih pikova [56]:

- frakcija jednog ili nekoliko pikova od interesa se skuplja i prenosi u drugu kolonu (engl. *heart-cutting*). Ovaj način se koristi za uzorke koji nisu kompleksni, a sadrže analite koji djelomično ili potpuno koeluiraju.
- sveobuhvatna (engl. *comprehensive*) dvodimenzionalna tekućinska kromatografija, gdje se svaki pik iz prve dimenzije (kolone) skuplja i prenosi u drugu dimenziju (kolonu).

Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija se može provoditi u *online*, *offline* i *stop-and-go* načinu rada. Tijekom *online* načina rada frakcija iz prve dimenzije se injektira u drugu dimenziju odmah nakon prikupljanja. Kod *offline* načina rada frakcije prikupljene iz prve dimenzije se pohranjuju prije nego se injektiraju u drugu dimenziju. Ovdje se istovremeno odvijaju separacije u prvoj i drugoj dimenziji. Zbog pohranjivanja frakcija, može doći do gubitka ili raspada analita. Tijekom *stop-and-go* načina rada skupljaju se frakcije iz prve dimenzije, zatim se zaustavlja separacija u prvoj dimenziji i provodi separacija u drugoj dimenziji [56].

1.5.4. Primjena tekućinske kromatografije

Tekućinska kromatografija, HPLC i modernija UHPLC, je postala rutinska tehnika kako u farmaceutskoj industriji tako i u drugim granama industrije. Zbog svoje separacijske sposobnosti, preciznosti, osjetljivosti, automatiziranom pristupu i pouzdanosti, znanstvenici su u mogućnosti dobiti vrlo točne podatke u kratkom vremenu. UHPLC se koristi također i za analizu biljnih pripravaka i dodataka prehrani. U analitičkim laboratorijima je postala standard

za kvantitativne analize sadržaja aktivnih supstancija i onečišćenja, za kvalitativne analize te u farmakokinetičkim istaživanjima [49,50,52].

1.5.4.1. Primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-HPLC)

HPLC u sustavu obrnutih faza smatra se jednom od najvažnijih analitičkih tehnika koja se koristi za farmaceutske i biomedicinske analize. Niz različitih kolona koje se koriste u sustavu obrnutih faza su komercijalno dostupne, robusne, a dobiveni podatci su ponovljivi [57].

Upotreba RP-HPLC u predviđanju bioraspoloživosti lijekova započela je istraživanjima Hubera i suradnika [58]. Zadržavanje analita na kromatografskoj koloni je povezano s njegovom raspodjelom između nepokretne (hidrofobne) i pokretne (hidrofilne) faze tijekom RP-HPLC analize [41,59]. Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (engl. *Organization for Economic Co-operation and Development* – OECD) je određivanje lipofilnosti upotrebom RP-HPLC tehnike indirektno iz vremena zadržavanja komponente, uvrstila u dokument "OECD smjernice za testiranje kemikalija" [60]. Kromatografski indeks hidrofobnosti (lipofilnosti) logaritamska je vrijednost faktora zadržavanja k koji se izračunava prema jednadžbi (8).

RP-HPLC tehnika prikladna je za ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih spojeva. Što je spoj lipofilniji, njegov afinitet prema nepokretnoj fazi je veći, a time je i vrijeme njegovog zadržavanja na koloni duže. Za određivanje lipofilnosti moguće je koristiti izokratne ili gradijentne metode, a najčešće se koriste kolone s C18 nepokretnom fazom (engl. *octadecyl sylane*, ODS) [61]. Izokratnim metodama se ispitivanje različitih spojeva provodi mjerenjem faktora zadržavanja pri minimalno pet različitih volumnih omjera organske i vodene faze u pokretnoj fazi [62]. Kako bi se usporedila vremena zadržavanja pri različitim omjerima organske faze, ekstrapoliraju se na isti uvjet, što je 0% organskog udjela u pokretnoj fazi. Nadalje se kromatografski parameter za 0% organskog otapala (log k_w) izračuna prema jednadžbi:

$$\log k = \log k_w + S \times \varphi \tag{13}$$

gdje je

S – nagib pravca i

φ – udio organskog otapala u pokretnoj fazi.

Izokratnim metodama je moguće dobiti izuzetno dobru korelaciju između kromatografskih parametara lipofilnosti i log *P* vrijednosti određenih u sustavu *n*-oktanol – voda za određenu skupinu strukturno srodnih spojeva. Međutim nedostatak istih metoda je slaba korelacija s log *P* vrijednostima za strukturno različite spojeve, što je uzrokovano različitim svojstvima koji su odgovorni za zadržavanje na kromatografskoj koloni i raspodjele u sustavu *n*-oktanol – voda, posebice zbog doprinosa interakcija vodikovih veza [63].

Primjenom gradijentnih metoda određivanja lipofilnosti mogu se izbjeći nedostatci izokratnih metoda. Prednosti gradijentnih metoda su u tome što nije potrebno vrijeme za razvoj metode s obzirom da se odabirom jedne gradijentne metode pokriva širok raspon udjela organskog otapala, te se mogu analizirati spojevi vrlo različite lipofilnosti. Tijekom gradijentne analize pojedino vrijeme zadržavanja analita odgovara određenom volumnom udjelu organskog otapala u pokretnoj fazi. Poznavanjem zadržanog volumena i dodatnog volumena HPLC sustava moguće je odrediti volumni udio organskog otapala potrebnog za eluiranje analita s kromatografske kolone. Uzevši u obzir primjenu brzog gradijenta i korištenjem kraćih kolona, utjecaj parametra *S* iz jednadžbe (13) će imati zanemariv utjecaj na vrijeme zadržavanja analita te se može smatrati konstantnim za određenu molekulu. Vrijeme zadržavanja analita tijekom gradijentne metode linearno ovisi o vrijednosti φ_0 koja se određuje izokratnim metodama.

U načelu se odabire kalibracijska skupina spojeva poznate log *P* vrijednosti koja pokriva željeni raspon lipofilnosti, te se iz izokratno određenih vrijednosti φ_0 i gradijentnog vremena zadržavanja mogu izračunati konstante A i B. Nagib (A) i odsječak (B) takvog kalibracijskog pravca koriste se za prevođenje gradijentnog vremena zadržavanja ispitivanog analita (t_{Rg}) u gradijentni kromatografski indeks hidrofobnosti (CHI) prema jednadžbi [64]:

$$\mathrm{CHI} = \mathrm{A} \times t_{Rg} + B \qquad (14)$$

CHI vrijednost za pojedini analit se nalazi u rasponu od 0 do 100 i približno je jednaka volumnom postotku organske faze u pokretnoj fazi koji je potreban da bi spoj eluirao s kolone. Korištenjem kiselih ili bazičnih pufera tijekom analize gradijentnom metodom, moguće je odrediti CHI vrijednosti analita podložnih ionizaciji. CHI vrijednosti neioniziranih spojeva koji su strukturno različiti pokazuju dobru korelaciju s log *P* vrijednostima.

Prednost ove metode je da su zbog upotrebe kalibracijske skupine spojeva, mjerenja usporediva među laboratorijima i vrijednosti CHI se mogu u vrlo kratkom vremenu odrediti za veliki broj

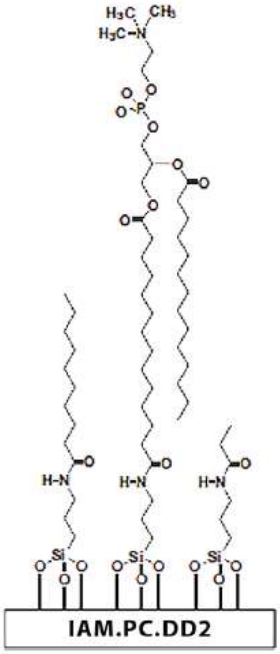
spojeva. Korištenjem UHPLC tehnike s kolonama čiji je promjer čestica manji od 2 μm omogućeno je dodatno skraćivanje postupka određivanja lipofilnosti.

1.5.4.2. Biomimetički kromatografski sustavi

Kromatografske kolone s vezanim umjetnim membranama (IAM)

Osim određivanja lipofilnosti, HPLC tehnikom moguće je mjeriti i sklonost vezanja lijeka za određene biomolekule korištenjem različitih nepokretnih faza koje oponašaju biološki vrlo važne komponente. Membranske barijere sadrže fosfolipidne dvosloje s hidrofilnim, polarnim, ioniziranim skupinama s vanjske strane te hidrofobnim lancima masnih kiselina u unutrašnjosti dvosloja [17]. Pidgeon i suradnici su patentirali metodu vezanja fosfolipida na silikagel nepokretne faze koja oponaša lipidno okruženje fluidne stanične membrane na čvrstom matriksu. HPLC kolone s imobiliziranim umjetnim membranama (engl. *Immobilized Artificial Membrane*, IAM) su pripremljene kovalentinim vezanjem fosfolipida na silikagel nepokretnu fazu s propilamino skupinama. Preostale propilamino skupine i slobodne silanolne skupine se zatim obrađuju kako bi se smanjile njihove sekundarne reakcije s analitom [65]. Komercijalno su dostupne nepokretne faze sa vezanim fosfatidilkolinom (IAM.PC) (Slika 4).

Za određivanje vezanja za stanične membrane mogu se koristiti izokratne metode kako je opisano za određivanje lipofilnosti [61,66]. Valko i suradnici su razvili gradijentnu metodu s acetonitrilom kao organskom fazom na IAM HPLC koloni koja omogućuje izračun kromatografskog hidrofobnog indeksa (engl. *Chromatographic Hydrophobicity Index*, CHI IAM). Način određivanja identičan je onom opisanom za određivanje CHI vrijednosti na kromatografskim kolonama u sustavu RP-HPLC u prethodnom poglavlju. Gradijentna vremena zadržavanja se također kalibriraju s podatcima dobivenim izokratnim mjerenjima [67].



Slika 4. Struktura nepokretne faze s vezanim umjetnim membranama

Kromatografske kolone s vezanim humanim serumskim albuminom (HSA) i alfa-1-kiselim glikoproteinom (AGP)

Nepokretne faze s vezanim proteinima plazme kemijski vezanim na silika gel uključuju humani serumski albumin (engl. *Human Serum Albumin*, HSA) i alfa-1-kiseli glikoprotein (engl. *Alpha-1-acid-glycoprotein*, AGP). Za kromatografska mjerenja gdje se koriste kolone s HSA nepokretnom fazom primjenjuju se izokratne metode s niskim koncentracijama organskog udjela u pokretnoj fazi [68,69]. Razvijena je i brza gradijentna metoda s izopropanolom kako bi se skratilo vrijeme analize za komponente čvrsto vezane za nepokretnu HSA fazu [70]. Dobivena je dobra korelacija između kromatografski dobivenih vrijednosti i literaturnih vrijednosti [71]. Nadalje, dobivene su i dobre korelacije između izokratnih ili gradijentnih metoda na AGP nepokretnoj fazi s izopropanolom ili acetonitrilom i rezultata dobivenih drugim metodama [72]. S obzirom da kod svih metoda kromatografski faktor zadržavanja ovisi o eksperimentalnim uvjetima, važno je kalibrirati kromatografski sustav mjerenjem podataka o zadržavanju za skupinu spojeva za koje je podatak o vezanju za proteine literaturno dostupan, odnosno određen drugom metodom kao što je ravnotežna dijaliza ili ultrafiltracija [73]. Zatim se postotak vezanja za protein plazme (% PPB) može prevesti u vrijednosti log *k* prema jednadžbi:

$$\log k = \log\left(\frac{\%\ \mathrm{PPB}}{101-\%\ \mathrm{PPB}}\right) \quad (15)$$

Logaritamske vrijednosti vremena zadržavanja (log t_R) određene gradijentnom metodom se linearno koreliraju s log k vrijednostima čime se dobiva kalibracijski pravac. Iz kalibracijskog pravca se na osnovu dobivenih log t_R vrijednosti za ispitivane spojeve, očitaju vrijednosti za log k. Za ispitivane spojeve % PPB se može izračunati koristeći sljedeću jednadžbu:

$$\%\ \mathrm{PPB} = \frac{101\ \mathrm{x}\ 10^{\log k}}{1+10^{\log k}} \quad (16)$$

1.5.4.3. Primjena dvodimenzionalne tekućinske kromatografije

Popularnost dvodimenzionalne kromatografije je u stalnom porastu zbog velikog raspona uspješnih primjena [74]. Kada se odaberu dva vrlo različita mehanizma separacije u prvoj i drugoj dimenziji, omogućeno je visoko pročišćavanje ciljanog pika iz prve dimenzije i određivanje njegove čistoće [54]. Ovakav način rada je od velikog interesa tijekom razvoja analitičkih metoda u farmaceutskoj industriji gdje postoji potencijalna mogućnost koeluiranja kromatografskih pikova, a dodatna separacija u drugoj dimenziji predstavlja ortogonalnu metodu razdvajanja [75-78]. Također se primjenjuje u području biofarmaceutike, za praćenje farmakokinetike i farmakoloških ispitivanja tijekom analize lijekova i srodnih spojeva u složenom matriksu kao što su plazma, serum i urin [79,80]. Dodatno se koristi i za analize peptida, oligonukleotida, monoklonskih antitijela i ostalih proteina koji se koriste u terapijske svrhe [54]. Sveobuhvatna 2D-LC tehnika je od posebnog interesa u analizi vrlo kompleksnih uzoraka koje sadrže nehlapljive analite ili komponente matriksa. Separacija takvih uzoraka se može značajno poboljšati zahvaljujući visokom kapacitetu razdvojenih pikova, ali zbog toga služi kao izvrsna tehnika pročišćavanja analita prije detektora spektrometrije masa. U analizi prirodnih lijekova vizualna usporedba 2D-LC kromatograma omogućava brzi preliminarni pregled i njihovu međusobnu usporedbu [54,74].

1.6. VEZANI SUSTAVI TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI I MASENE SPEKTROMETRIJE

1.6.1. Detektor s nizom fotosenzitivnih dioda

Detektor s nizom fotosenzitivnih dioda (DAD) funkcionira kao UV/Vis detektor i snima cijelo ultraljubičasto i vidljivo područje s razlučivanjem od 1 nm. Računalni program za spektralnu evaluaciju omogućuje kromatografski prikaz i spektralni prikaz svih pikova u uzorku, što omogućuje dobivanje različitih informacija o svakoj komponenti uzorka.

Primjerice, osim kvantifikacije, omogućuje dodatnu identifikaciju iz spektra, mogućnost usporedbe spektara, procjenu čistoće kromatografskog pika usporedbom spektara uzetih na različitim mjestima samog pika i time utvrditi selektivnost analitičke metode. DAD detektor je zbog navedenog postao standardni detektor u većini HPLC laboratorija. Na DAD detektor je moguće povezati druge detektore jer analit iz detektora izlazi nepromijenjen. Nedostatak DAD detektora je da omogućuje analizu samo molekula koje u svojoj strukturi imaju kromofor [81].

1.6.2. Maseni spektrometar

Masena spektrometrija je analitička tehnika čije se načelo rada zasniva na stvaranju ioniziranih molekula i molekulskih fragmenata koji nastaju u vakuumu ili neposredno prije ulaska molekule u visoki vakuum. Ionizirane molekule moraju biti u plinovitoj fazi, a upotrebom električnog ili magnetskog polja razdvajaju se prema omjeru mase i naboja (*m/z*). Tako masena spektrometrija obuhvaća ionizaciju i ionsku separaciju [82].

Prvi korak u masenoj spektrometriji je ionizacija analita pri čemu nastaje molekulski ion. Molekulski ion podliježe daljnjoj fragmentaciji i prelazi u ion produkt s parnim brojem elektrona i radikal ili ion s neparnim brojem elektrona i neutralnu molekulu. Dostupno je više načina ionizacije molekula, a ovisno o tipu ionizatora ovisi i broj iona, fragmentacija te konačni izgled spektra. Dvije su osnovne skupine ionizacije ovisne o količini primijenjene energije:

- *čvrste* ionizacijske tehnike (engl. *hard ionization*) - ionizacija elektronima (engl. *electron impact ionisation*, EI), kemijska ionizacija (engl. *chemical ionisation*, CI) i ionizacija brzim atomima (engl. *fast atom bombardment*, FAB)

- *blage* ionizacijske tehnike (engl. *soft ionization*) - ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionisation*, ESI), ionizacija termoraspršenjem (engl. *thermospray*, TS), ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure ionization,* API) i matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *matrix assisted laser desorption ionisation*, MALDI).

Analizator masa razdvaja dobivene ione u vakuumu na temelju njihovog omjera mase i naboja. Najzastupljeniji analizatori masa su kvadrupolni analizator (engl. *quadrupole mass analyzer*, Q), stupica za ione (engl. *ion trap*, IT) i analizator vremena leta (engl. *time of flight*, TOF).

Odabir tehnike ionizacije i vrste analizatora ovisi o svojstvima uzorka i podacima koje je potrebno dobiti (identifikacija, karakterizacija onečišćenja, kvantifikacija). Najčešće korištene tehnike ionizacije, posebice u spregnutim sustavima s tekućinskom kromatografijom, su ionizacija elektroraspršenjem i ionizacija pri atmosferskom tlaku [81,83-85].

1.6.2.1. Ionizacijske tehnike

Ionizacija elektroraspršenjem je najzastupljenija tehnika ionizacije. Ionizacija se odvija na način da se otopina koja sadrži analit uvodi u metalnu kapilaru na koju se pri atmosferskom tlaku primjenjuje jako električno polje pod čijim utjecajem dolazi do nabijanja površine tekućine. Kapljice otapala isparavaju dovođenjem zagrijanog plina za sušenje (dušik). Smanjenjem volumena kapljice, povećava se površinski naboj, dok ne prevladaju odbojne elektrostatske sile između iona i uzrokuju potpuni raspad kapljice, a ioni analita prelaze u plinovitu fazu te ulaze u analizator.

Ioni nastali elektroraspršenjem mogu biti pozitivno ili negativno nabijeni. Koristi se za ionizaciju molekula malih i velikih molekulskih masa, nenabijenih ili ionskih spojeva, itd. Jedinstveno je svojstvo nastajanje višestruko nabijenih iona, što omogućuje detekciju tvari velikih molekulskih masa i malih vrijednosti *m/z* korištenjem odgovarajućih analizatora. Omogućuje postizanje vrlo visoke osjetljivosti te je pogodan za analize sadržaja u vrlo niskim koncentracijama.

Ionizacija pri atmosferskom tlaku vrlo je zastupljena tehnika ionizacije koja je kompatibilna sa svim analizatorima. Ionizacija analita se odvija pri atmosferskom tlaku nakon čega se molekulski ioni prenose u područje visokog vakuma masenog spektrometra. Tijekom

navedenog prijenosa dolazi do gubitka iona koji se nadoknađuje visokim ukupnim prinosom API ionizacijske tehnike u usporedbi s ionizacijskim tehnikama pri sniženom tlaku. Najvažnije prednosti ionizacije pri atmosferskom tlaku su jednostavno vezanje separacijskih tehnika, kao što je HPLC, s masenim spektrometrom i lako uvođenje uzorka u maseni spektrometar.

1.6.2.2. Analizatori masa

Kvadrupolni analizator masa (Q) je jedan od najzastupljenijih analizatora masa. Sastoji se od četiri elektrode koje su dijagonalno električki povezane. Pri tome, jedan par elektroda ima pozitivni, a drugi negativni polaritet. Dodatno su ti parovi elektroda spojeni s radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje koji je za 180 stupnjeva izvan faze. Ioni koji ulaze u analizator imaju različite vrijednosti *m/z* i u ovisnosti o primijenjenoj struji i polju mogu zadržati stabilnu putanju i proći analizator ili dotaknuti elektrode i postati neutralne molekule.

Danas se sve više koristi tandemska spektrometrija masa (MS/MS, MS^n) s ciljem izazivanja dodatne fragmentacije u svrhu kvalitetnijeg određivanja strukture analiziranog iona, ili da bi se povećala selektivnost tijekom kvantifikacije određenog analita. Tandemske MS možemo podijeliti u tri skupine: spektrometri masa s jednim analizatorom, kod kojih je teorijski moguća analiza do MS^n (stupica za ione, engl. *ion trap*, IT), spektrometri masa s više analizatora za analizu do MS^2 (trostruki kvadrupol, engl. *triple quadrupol,* QQQ) te spektrometri masa s dva analizatora između kojih se nalazi kolizijska ćelija (tzv. *quadrupol - time of flight,* Q-TOF) kod kojih je moguća analiza do MS^2.

Analizator vremena leta (TOF) je analizator koji omogućuje visoko razlučivanje i točnost. Načelo rada temelji se na činjenici da brzina iona ovisi o masi iona. Svi ioni koji ulaze u analizator imaju različitu brzinu koja ovisi o njihovoj masi. Manji ioni imaju veću brzinu, a veći ioni manju brzinu. Separacija iona provodi se s obzirom na brzinu iona koji dolaze na detektor u različitim vremenima. Ioni mogu ući aksijalno ili ortogonalno u analizator (engl. *pusher*), on ih sakuplja u određenom vremenu te zatim istovremeno otpušta. U trenutku otpuštanja uključuje se mjerenje vremena preleta do detektora. Vrijeme preleta iona do detektora je između 5 μs i 100 μs. Analizatori TOF mogu imati ugrađeno ionsko ogledalo (engl. *reflectron, ion mirror*), koje omogućava da ioni istih masa, a različitih kinetičkih energija, istovremeno dođu do detektora. Analizatori TOF često se povezuju s kvadrupolnim analizatorima što im daje mogućnost analiza MS/MS.

Analizator ionska stupica koristi i električno i magnetsko polje za zadržavanje iona unutar vakuumskog sustava. Kružna elektroda stvara elektromagnetsko polje u kojem ostaju zarobljeni ioni. Oni osciliraju u centru stupice gdje se nalazi helij koji utišava njihovu energiju. Korištenjem jednosmjerne struje stvara se puls električnog polja koji izbije ione iz stupice. Na ovaj način moguće je zadržati molekulski ion od interesa, a ostale ukloniti. Dodatno je moguće i fragmentirati izolirani molekulski ion primjenom plina helija, što je prednost ovog analizatora jer omoguću izolaciju i fragmentaciju iona u istom prostoru.

1.6.3. Primjena vezanog sustava LC-MS

Tijekom istraživanja i razvoja lijeka, HPLC i UHPLC tehnike su postale iznimno važne u farmaceutskoj industriji. Uz sve prednosti, primjerice korištenje različitih sustava u svrhu razdvajanja vrlo srodnih analita, automatiziranog pristupa, jednostavne primjene, dodatnu vrijednost dobivaju korištenjem gore navedenih detektora. Vezani LC sustav s DAD detektorom je osnova tijekom analize koja pruža uvid u cijeli UV-spektar i daje intenzitet signala u svrhu kvantifikacije.

Uz dodatno vezanje MS detektora, dostupne su informacije o molekulskoj masi i izotopnoj raspodjeli što omogućuje automatiziranu karakterizaciju. Tijekom rane faze razvoja lijeka vrlo je važna identifikacija aktivne djelatne tvari i potencijalnih onečišćenja. Dodatna informacija o strukturi se može dobiti korištenjem fragmentacije upotrebom vezanih sustava, primjerice LC-DAD-QQQ analizatorima, što se koristi i u farmakokinetičkim istraživanjima. Danas se vezani sustavi koriste rutinski i u analizi tragova, kao što je određivanje genotoksičnih onečišćenja. U analizi vrlo kompleksnih uzoraka, za bioanalitičke analize plazme ili urina, LC/MS/MS s QQQ analizatorom je postala zlatni standard zbog izvrsne osjetljivosti, selektivnosti i robusnosti. U novije vrijeme, vezani sustav LC/TOF se pokazao kao moguća alternativa LC/MS/MS sustavu, zbog bolje selektivnosti zahvaljujući točnoj masi. Proteomika je još jedno područje koje se uvelike zasniva na vezanim sustavima tekućinske kromatografije i spektrometra masa [81,84,85].

Primjena vezanog sustava 2D-LC-MS je gotovo nezaobilazna tijekom uporabe dvodimenzionalne tekućinske kromatografije. Koristi se za dodatnu sigurnost prilikom identifikacije analita u farmaceutici i forenzici. Prilikom analize peptida ima mnogo prednosti u odnosu na konvencionalnu LC-MS tehniku [54]. Ukoliko se u razvijenoj LC-UV metodi koristi nehlapljivi pufer, identifikacija nepoznatih onečišćenja spektrometrijom masa nije

moguća bez prilagodbe postojeće metode. Ponekad razvoj kromatografske metode pogodne za identifikaciju spektrometrijom masa može utjecati na selektivnost već razvijene metode. Primjena 2D-LC omogućuje korištenje već razvijene metode za rutinske analize. Upotreba lako hlapljivog pufera u drugoj dimenziji omogućuje efikasnu i brzu identifikaciju nepoznatih onečišćenja. Istraživanja su pokazala da se uporabom 2D-LC povećava granica detekcije MS detektora pri detekciji onečišćenja u tragovima na način da dolazi do smanjenja interakcije glavne komponente u MS detektoru [86].

1.7. KVALITETA UGRAĐENA U DIZAJN U RAZVOJU ANALITIČKIH METODA

Kvaliteta ugrađena u dizajn (engl. *Quality by Design*, QbD) je postala važan koncept u farmaceutskoj industriji nakon implementacije od strane regulatornih agencija diljem svijeta. Osnovni cilj QbD pristupa je ugradnja kvalitete u farmaceutski proizvod od početka razvoja kako bi se u konačnici osigurala sigurnost pacijenta. Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonisation,* ICH) definira QbD kao sistematičan pristup razvoju lijeka koji započinje predefiniranim ciljevima, stavlja naglasak na proizvod te razumijevanje i kontrolu procesa na temelju znanstvenih činjenica i upravljanja rizicima. Navedeni pristup predstavlja suprotnost tradicionalnom pristupu osiguranja kvalitete analizom proizvoda na kraju proizvodnog ciklusa (engl. *Quality by Testing*, QbT). QbD pristupom se uspostavlja dizajn u prostoru (engl. *Design Space*, DS) definiran kao višedimenzionalna kombinacija i interakcija unesenih varijabli i procesnih parametara koji osiguravaju kvalitetu. U tu svrhu, ekperimentalni dizajn (engl. *Design of Experiments*, DoE) predstavlja osnovu za primjenu QbD pristupa [87-89].

QbD pristup je primjenjiv i tijekom razvoja analitičkih metoda (engl. *Analytical Quality by Design*, AQbD) iako nije posebno razmatran od strane ICH. Tradicionalni razvoj metoda je zasnovan na promjeni jednog po jednog faktora (engl. *One-Factor-At-a-Time*, OFAT) ili metodom pokušaja i pogrešaka, gdje oba načina zahtijevaju veliki broj eksperimenata koji su dugotrajni i ne daju sigurnost u konačnu metodu. Zbog navedenog je ponekad potreban naknadni razvoj, ponovljena validacija i transferiranje metode. Cilj AQbD pristupa je razviti robustnu metodu kojom se postižu pouzdani rezultati uz razumijevanje utjecaja različitih varijabli na kvalitetu dobivenih informacija. Razvoj metode AQbD pristupom sastoji se od sljedećih koraka [87,88,90]:

- predefiniranje zahtjeva analitičke metode (engl. *Analytical Target Profile*, ATP) – predstavlja skupinu kriterija koji definiraju što će se mjeriti (npr. kvantifikacija onečišćenja) i značajke mjerenja (npr. preciznost, točnost, osjetljivost)
- izbor kritičnih atributa kvalitete (engl. *Critical Quality Attributes*, CQA) koji omogućuju procjenu kvalitete razvijene analitičke metode (npr. zahtjev za razlučivanje susjednih pikova, vrijeme trajanja analize, robustnost)
- definiranje kritičnih procesnih parametara (engl. *Critical Process Parameters*, CPP) čije varijacije mogu utjecati na CQA i stoga se moraju pratiti kako bi se osigurala željena

kvaliteta rezultata analize. U kromatografskoj analizi veliki je broj parametara koji mogu utjecati na kvalitetu rezultata. Na osnovu prethodnog znanja i inicijalno provedenih eksperimenata te korištenjem alata kvalitete poput dijagrama tijeka analitičkog procesa i Ishikawinog dijagrama, dio parametara se može sa sigurnošću eliminirati.

- eksperimentalni dizajn (engl. *Design of Experiments*, DoE) i razvoj matematičkog modela koji opisuje ovisnost kritičnog atributa kvalitete o kritičnim procesnim parametrima te definiranje teoretskog područja robustnosti metode. Na ovaj način je moguće uočiti utjecaj pojedinačnih čimbenika i njihovih međusobnih interakcija.

Ovim pristupom razvoja analitičkih metoda otvara se mogućnost rada te izmjena parametara unutar kreiranog dizajna u prostoru za specifičnu metodu koji bi se smatrao prilagođavanjem metode umjesto izmjenom.

Danas postoje mnogobrojni računalni programi koji primjenjuju QbD pristup za razvoj analitičkih metoda, a jedan od najčešće korištenih je DryLab® (Molnar Institute, Berlin, Njemačka). Načelo rada se temelji na provedbi malog broja eksperimenata na osnovu kojih program predviđa ponašanje analita na nepokretnoj fazi, odnosno kretanje pikova u tekućinskoj kromatografiji obrnutih faza tijekom promjena sastava i pH vrijednosti pokretne faze, temperature kolone, brzine protoka pokretne faze, dimenzije kolone i veličine čestica te drugih parametara [91,92].

Teorijsku osnovu razvoja DryLab® računalnog programa čini solvofobna teorija koja opisuje interakcije otopljenog analita s nepolarnim ugljikovodikovim ligandima na površini nepokretne faze. Termodinamika slobodne energije u kromatografskim procesima je opisana sljedećom jednadžbom:

$$k = A + BD + C\Delta A + \frac{D(\kappa e-\ )V2}{3\gamma} + E + RTln\left(\frac{RT}{\mathrm{PoV}}\right) \qquad (17)$$

gdje je

A i C – konstante koje se određuju eksperimentalno

BD – elektrostatički izraz (D ≈ 1),

ΔA – površina solvofobnog kontakta između analita (S) i liganada s površinom nepokretne faze (L), m^2

γ– površinski napetost, N m^{-1}

R – plinska konstanta, 8.314 J K^{-1} mol^{-1}

T – temperatura, (K)

p_0 – atmosferski tlak, (Pa)

V – molarni obujam otapala, L mol^{-1}

κ_e – molekularni parametar analita.

Navedena jednadžba opisuje utjecaj pokretne faze na osnovu površinske napetosti, s obzirom na utjecaj temperature, utjecaj molekularnih svojstava analita i kemijski vezanog liganda i utjecaj elektrostatskih svojstava kao što su koncentracija pufera pokretne faze [93,94]. DryLab® računalni program je jednostavan za uporabu, a prije provođenja eksperimenata potrebno je odabrati kritične parametre koji će se mijenjati. Na osnovu provedenih inicijalnih eksperimenata moguće je generirati 1-, 2- ili 3-dimenzionalni model ovisno mijenja li se jedan, dva ili tri parametra. Na taj način se predviđa kretanje pikova u kromatogramu u različitim uvjetima i izračunava se kritično razlučivanje između dva analita čije je razlučivanje najlošije (kritični par). DryLab® na taj način daje vizualni prikaz područja robusnosti metode čime omogućava lako uočavanje područja (vrijednosti ispitivanih parametara) u kojem promjene parametara ne utječu na izvedbu metode što je vrlo korisno za optimizaciju metoda pristupom kvalitete ugrađene u dizajn [95,96].

1.8. PREGLED ANALITIČKIH METODA U ISTRAŽIVANJU FITOESTROGENA

Značajan broj radova o fitoestrogenima je dostupan u literaturi, međutim manji broj radova istražuje fizikalno-kemijska svojstva određenih fitoestrogena.

Rothwell i suradnici te Kato i suradnici su određivali lipofilnost koristeći metodu izmućkavanja, nakon čega su svaku frakciju analizirali koristeći HPLC tehniku. Dobivene su visoke log *P* vrijednosti za genistein i daidzein te niske log *P* vrijednosti za genistin i daidzin. Kato i suradnici su dodatno određivali afinitet polifenola za fosfolipidni dvosloj koristeći sustave liposoma [97,98]. Arnoldi i suradnici su izokratnom HPLC metodom, uz metanol i vodu kao pokretnu fazu, te ODS nepokretnu fazu, odredili log *P* vrijednosti za formononetin i kumestrol. Za određivanje su koristili referentne supstancije poznate log *P* vrijednosti [99]. Yang i suradnici su gradijentnom HPLC metodom odredili log *P* vrijednost za genistein koristeći metanol i vodu kao pokretnu fazu te ODS kolonu [100].

Uekusa i suradnici su istraživali afinitet za fosfolipidni dvosloj izokratnim HPLC metodama na IAM koloni. Koristili su acetonitril i otopinu natrijeva klorida pH 2,5 kao pokretne faze te izračunali K_{IAM} vrijednosti za skupinu polifenola među kojima su se nalazili i biokanin A, genistein, formononetin, daidzein, sisotrin, genistin i daidzin [101]. Tsopelas i suradnici su na dvije različite IAM kolone odredili log $k_{w(IAM)}$ vrijednosti za biokanin A, daidzein, genistein, formononetin, genistin i daidzin. Koristili su HPLC izokratne metode, fosfatni pufer pH 7,4 i acetonitril kao pokretne faze [102].

U literaturi je opisano eksperimentalno određivanje vezanja za HSA proteine plazme samo za biokanin A, daidzein, genistein, formononetin i genistin, dok vezanje za AGP proteine plazme do sada nije istraživano. Xiao i suradnici su istraživali povezanost između strukture i afiniteta za HSA protein koristeći fluorescentnu analizu [103]. Također su Cao i suradnici istom metodom istraživali ustjecaj metilacije na afinitet vezanja za HSA [104].

Svega se nekoliko publikacija do sada bavilo istraživanjem permeabilnosti određenih fitoestrogena uključujući biokanin A, daidzein, genistein, formononetin, daidzin i genistin na Caco-2 staničnoj liniji [100,105-107]. Općenito su glikozidi pokazivali nižu permeabilnost u usporedbi s odgovarajućim aglikonima. Autori su zaključili da se transport kroz Caco-2 stanični monosloj za većinu flavonoida odvija pasivnom difuzijom, iako je moguće da mehanizam izbacivanja iz stanice postoji, ali nije dalje istraživan inhibicijom P-glikoproteina [105].

Nadalje, razvijeno je više analitičkih metoda za određivanje različitih fitoestrogena u biljkama, biljnim proizvodima te biološkim uzorcima [108-110]. Metode za detekciju, kvalitativno i kvantitativno određivanje se temelje na različitim kromatografskim tehnikama među kojima su plinska kromatografija [111,112], tekućinska kromatografija visoke [113-118] i ultravisoke djelotvornosti [119-121] te kapilarna elektroforeza [122] spregnute s različitim detektorima: detektor koji se temelji na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja [119-121], elektrokemijski detektor [123], fluorescencijski detektor [124], maseni spektrometar [120] i spektrometar nuklearno magnetske rezonancije [125]. Osim navedenih tehnika, primjenjuju se i različite imunološke metode.

S obzirom da je u ovom istraživanju razvijena nova UHPLC metoda za analizu skupine fitoestrogena u pripravcima namijenjenim ženama u postmenopauzi, zbog opsega objavljivanih radova, u pregledu literature bit će navedene samo najznačajnije analitičke metode koje se temelje na tekućinskoj kromatografiji. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-HPLC) je najčešće korištena tehnika za određivanje izoflavona, međutim razvijene metode su dugotrajne, gdje je vrijeme trajanja metode od 19-60 minuta po uzorku [113-118].

Objavljeno je svega nekoliko studija gdje je korištena metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-UHPLC) s nešto kraćim vremenom trajanja metode [119-121,126-134]. Međutim, većina opisanih metoda je namijenjena kvantifikaciji samo aglikonskih oblika fitoestrogena, dok se glikozidni oblici mogu analizirati tek nakon provedene hidrolize. Magiera i suradnici su razvili brzu UHPLC metodu u trajanju od 5 minuta koja je primijenjena samo na aglikone u pripravcima [119]. Klejdus i suradnici su razvili još bržu HPLC metodu u trajanju od 1,8 minuta te kasnije i UHPLC metodu za kvantifikaciju aglikona i glikozida određenih izoflavona i fenolnih kiselina u uzorcima biljnog materijala [120-121]. Međutim, metode nisu validirane i primjenjene su samo na uzorcima soje i na određenim biljnim ekstraktima.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Primjena fitoestrogena se kontinuirano povećava zbog njihove biološke aktivnosti i potencijalno korisnih učinaka. Sve je veći broj pripravaka koji sadrže različite fitoestrogene namijenjene ženama u postmenopauzi kao posebno rizičnoj skupini. Sadržaj fitoestrogena u tim pripravcima još uvijek nije reguliran s obzirom da oni ne podliježu strogim regulatornim zahtjevima, kao lijekovi, čime bi se osigurala njihova kvaliteta, sigurnost i učinkovitost. Osim što se razlikuju kvantitativno s obzirom na ukupni sadržaj fitoestrogena, dodatno se razlikuju i kvalitativno s obzirom na zastupljenost pojedinih fitoestrogena.

Stoga je svrha ovog istraživanja odrediti farmakokinetičke parametre skupini 15 strukturno sličnih fitoestrogena (genistein, biokanin A, daidzein, formononetin, genistin, sisotrin, daidzin, ononin, prunetin, 3,4,7-trihidroksi izoflavon, 4,6,7-trihidroksi izoflavon, 4,6,7-trimetoksi izoflavon, genistein 4,7-dimetil eter, kumestrol, kumestrol dimetil eter) u svrhu boljeg razumijevanja njihove bioraspoloživosti i učinaka na organizam. Zatim, na temelju njihove lipofilnosti određene kromatografskim metodama, razviti novu, brzu, selektivnu, preciznu, osjetljivu i točnu analitičku metodu za istovremenu analizu najznačajnijih fitoestrogena iz skupine izoflavona u obliku aglikona (genistein, biokanin A, daidzein, formononetin) i glikozida (genistin, sisotrin, daidzin, ononin), a bez prethodno provedenog dugotrajnog postupka hidrolize uzoraka složenog matriksa.

Specifični ciljevi rada su:

- odrediti parametre koji opisuju lipofilnost skupine strukturno sličnih fitoestrogena primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti obrnutih faza
- ispitati interakcije skupine strukturno sličnih fitoestrogena s fosfolipidima staničnih membrana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim umjetnim membranama
- odrediti udjele vezanja skupine strukturno sličnih fitoestrogena za najzastupljenije proteine plazme, humani serumski albumin i alfa-1-kiseli glikoprotein, primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim humanim serumskim albuminom i alfa-1-kiselim glikoproteinom
- odrediti permeabilnost skupine strukturno sličnih fitoestrogena i način prijenosa kroz sluznicu gastrointestinalnog trakta primjenom modela Caco-2 stanica
- usporediti eksperimentalno određene parametre s ADME parametrima izračunatim različitim računalnim programima

- razviti novu analitičku metodu primjenom QbD pristupa za određivanje sadržaja najznačajnijih fitoestrogena iz skupine izoflavona u obliku glikozida i aglikona primjenom tehnike tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti obrnutih faza upotrebom detektora s nizom fotosenzitivnih dioda
- razvijenu metodu validirati prema ICH smjernicama i primijenti u analizi pripravaka s fitoestrogenima u različitim dozirnim oblicima dostupnima na tržištu
- razviti dvodimenzionalnu metodu tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnute s masenom spektrometrijom za pouzdanu identifikaciju fitoestrogena iz skupine izoflavona u složenom matriksu pripravaka namijenjenih ženama u postmenopauzi.

3. MATERIJELI I METODE

3.1. MATERIJELI I KEMIKALIJE

3.1.1. Standardne supstancije

- Biokanin A (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- Daidzein (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- Formononetin (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- Genistein (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- Genistein-4,7-dimetil eter (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- Prunetin (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- 3,4,7-trihidroksi izoflavon (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- 4,6,7-trihidroksi izoflavon (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- 4,6,7-trimetoksi izoflavon (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- Daidzin (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- Genistin (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- Ononin (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- Sisotrin (Extrasynthese, Lyon, Francuska)
- Kumestrol (Sigma, Darmstadt, Njemačka)
- Kumestrol dimetil eter (Sigma, Darmstadt, Njemačka)
- Teofilin (Sigma, Darmstadt, Njemačka)
- Valerofenon (Sigma, Darmstadt, Njemačka)
- Oktanofenon (Sigma, Darmstadt, Njemačka)
- 2,4,6-trikloropirimidin (Sigma, Darmstadt, Njemačka)
- 2,3-diklorofenol (Sigma, Darmstadt, Njemačka)
- Propil p-hidroksibenzoat (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Propifenazon (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Trimetoprim (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Klorotiazid (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Paracetamol (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Nikardipin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Nizatidin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Rivastigmin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)

- Kvetiapin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Karbamazepin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Buspron (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Diklofenak (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Valsartan (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Ezopiklon (Pliva, Zagreb, Hrvatska)
- Varfarin (Sigma, Darmstadt, Njemačka)
- Amprenavir (AKSci, Union City, SAD)

3.1.2. Pripravci s fitoestrogenima

- Pausa (Specchiasol, Bussolengo, Italija)
- Meno-Guide (Erba Vita, San Marino, Italija)
- Soy Flavon ® (Dietpharm, Rakitje, Hrvatska)
- Menopause (Helvetia Direct Marketing, Prag, Republika Češka)
- Maxi Life Mega Soy (Twinlab, Hauppauge, SAD)
- PhytoEstrogen one daily (Solaray, Park City, SAD)
- Soy Isoflavones (Natural Wealth, Bohemia, SAD)
- Menopause Relief (Natural Wealth, Bohemia, SAD)
- Feminal (Jadran - Galenski Laboratorij, Rijeka, Hrvatska)
- Red Clover Blossom (Solaray, Park City, SAD)
- Herbal Female Complex (Solgar, Leonia, SAD)

3.1.3. Materijali za određivanje permeabilnosti

- Millicell® 24 umetak stanične kulture (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Dulbecco's fosfatni pufer pH 7.4 (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Lucifer žuto (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Caco-2 stanice (ECACC, European Collection of Authenticated Cell Cultures, Salisbury, Engleska)

- Elakridar (Merck, Darmstadt, Njemačka)

3.1.4. Kemikalije

- Aceton, p.a. čistoće (J. T. Baker, Phillipsburg, SAD)
- Acetonitril, p.a. čistoće (J. T. Baker, Phillipsburg, SAD)
- Metanol, p.a. čistoće (J. T. Baker, Phillipsburg, SAD)
- 2-propanol, p.a. čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Dimetilsulfoksid, p.a. čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Fosforna kiselina, min. 85%, p.a. čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Mravlja kiselina, p.a. čistoće (J. T. Baker, Phillipsburg, SAD)
- Amonijev acetat, p.a. čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Amonijev hidroksid, min. 25%, p.a čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev nitrit, p.a. čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev dihidrogenfosfat, p.a. čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev hidroksid, p.a. čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Ledena octena kiselina, 100%, p.a. čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Svježe pročišćena voda, pripremljena u Milli Q Advantage A10 sustavu za pročišćavanje (Merck, Darmstadt, Njemačka)

3.1.5. Nepokretne faze korištene u razvoju metoda tekućinske kromatografije

- kolona Acquity UPLC BEH C18, 100 x 2,1 mm, čestice promjera 1,7µm (Waters, Milford, SAD)
- kolona IAM .PC.DD.2, 100 x 4,6 mm, čestice promjera 10 µm (Regis Technologies, SAD)
- kolona Daicel, Chiralpak HSA, 50 x 3,0 mm, čestice promjera 5 µm (Chiral Technologies Europe, Francuska)
- kolona Daicel, Chiralpak AGP, 100 x 4,0 mm, čestice promjera 5 µm (Chiral Technologies Europe, Francuska)

- kolona Zorbax Rapid Resolution High Definition (RRHD) Bonus RP Amide, 50 x 2,1 mm, čestice promjera 1,8µm (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- kolona Zorbax Rapid Resolution High Definition (RRHD) Eclipse Plus C18, 50 x 2,1 mm, čestice promjera 1,8µm (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- kolona Cortecs UPLC C18+, 50 x 2,1 mm, čestice promjera 1,6µm (Waters, Milford, SAD)
- kolona Zorbax Rapid Resolution High Definition (RRHD) Eclipse Plus Phenyl Hexyl, 50 x 2,1 mm, čestice promjera 1,8µm (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

3.2. INSTRUMENTI

3.2.1. Tekućinska kromatografija

Određivanje fizikalo-kemijskih parametara provedeno je na sustavu tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti Agilent 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Sustav se sastoji od binarne pumpe, otplinjača, sustava za automatsko uzorkovanje s volumenom do 20 µl, odjeljka za kolonu te detektora s nizom dioda (DAD). Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnog programa Waters Empower 2 (Waters, Milford, SAD).

Razvoj nove metode QbD pristupom provedeno je na sustavu tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti Waters I Class (Miliford, Masachusets, SAD). Sustav se sastoji od binarne pumpe, otplinjača, sustava za automatsko uzorkovanje s volumenom do 20 µl, odjeljka za kolonu te detektora s nizom dioda (DAD). Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnog programa Waters Empower 2 (Waters, Milford, SAD).

3.2.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrijom masa (QQQ)

Kvantifikacija fitoestrogena u uzorcima nakon određivanja permeabilnosti na Caco-2 stanicama provedena je na sustavu tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti Agilent 1290 spregnutog s Agilent 6490 spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom, QQQ (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Sustav se sastoji od binarne pumpe, otplinjača, sustava za automatsko uzorkovanje s volumenom do 20 µl, odjeljka za kolonu, detektora s nizom diode i spektrometra masa s trostrukim kvadrupolom. Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnog programa Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition za Triple Quad B.01.04 (B84), (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD).

3.2.3. Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrijom masa (2D-UHPLC-QTOF)

Identifikacija fitoestrogena u pripravcima je provedena na sustavu dvodimenzionalne tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti Agilent 1290 spregnutog sa Agilent 6550 spektrometrom masa koji mjeri vrijeme preleta, TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Sustav se sastoji od binarne pumpe, kvarterne pumpe, otplinjača, sustava za automatsko uzorkovanje s volumenom do 20 µl, odjeljka za kolonu, dva ventila za pohranu uzorka, dva detektora s nizom dioda (DAD) i spektrometra masa koji mjeri vrijeme preleta. Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnih programa Agilent MassHunter Data Acquisition za Q-TOF B.06.01 (B6157) i OpenLab CDS ChemStation C.01.07 SR2 sa 2D-LC programskim dodatkom.

3.2.4. Pribor za pripremu otopina i uzoraka

- analitička vaga Balance XPE205 (Mettler Toledo, Columbus, SAD)
- mikro vaga Mettler Toledo MX 5 (Mettler Toledo, Columbus, SAD)
- pH-metar Seven Excellence S400 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- ultrazvučna kupelj Sonorex digital 10P (Bandelin, Berlin, Njemačka)

3.2.5. Računalni programi

- ACD/Labs (Advanced Chemistry Development, Toronto, Kanada)
- ChemAxon (ChemAxon, Budimpešta, Mađarska)
- VCCLab (Virtual Computational Chemistry Laboratory)
- pkCSM (pkCSM-pharmacokinetics, Melbourn, Australija)
- preADMET (Sveučilište Yonsei, Seoul, Republika Koreja)
- admetSAR (Farmaceutski Fakultet, Shangai, Kina)
- ChemExper (ChemExper, Brussels, Belgija)
- Molinspiration (Molinspiration Cheminformatics, Slovensky Grob, Republika Slovačka)

- DryLab® (Molnar Institute, Berlin, Njemačka)
- Microsoft® Office Excel 2016 (Microsoft, Seattle, SAD)

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje lipofilnosti skupine fitoestrogena primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-UHPLC)

Priprema otopina

Pripremljena je otopina 50 mM amonijevog acetatnog pufera s pročišćenom vodom. Nakon otapanja pH je podešen na željene vrijednosti 7,4 ± 0,05 i 2,0 ± 0,05 dodatkom odgovarajuće količine otopine amonijevog hidroksida ili fosforne kiseline. Otopina natrijevog nitrita, standardne otopine fitoestrogena i supstancije za kalibraciju su pripremljene u otopini odgovarajućeg pufera i acetonitrila (1:1, v/v) u koncentraciji 0,5 mg mL^{-1}.

Izokratna kromatografska analiza

Za određivanje lipofilnosti tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti izokratnom analizom korištena je kolona Acquity UPLC BEH C18, 100 x 2,1 mm, čestice promjera 1,7μm.

Dva sustava otapala su korištena kao pokretna faza:

- 50 mM amonijev acetatni pufer pH 7,4 ± 0,05 (eluent A) i acetonitril (eluent B)
- 50 mM amonijev acetatni pufer pH 2,0 ± 0,05 (eluent A) i acetonitril (eluent B)

Volumni udio organskog otapala u pokretnoj fazi je iznosio 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 i 80%. Najmanje pet različitih koncentracija acetonitrila u pokretnoj fazi je korišteno za analizu pojedine supstancije za kalibraciju. Protok pokretne faze je iznosio 0,25 mL min^{-1}, temperatura kolone je bila 25±1 °C, a injektirani volumen uzorka 0,2 μL. Vrijeme zadržavanja nezadržanog spoja (mrtvo vrijeme) kromatografskog sustava mjereno je natrijevim nitritom. Kromatogrami pojedinog uzorka snimljeni su pri valnim duljinama maksimuma apsorpcije u UV spektru snimljenom u rasponu od 210-300 nm, a obrađeni su računalnim programom Empower 2.

Svaki eksperiment proveden je u triplikatu te su logaritamske vrijednosti faktora zadržavanja (log k) supstancija za kalibraciju izračunate pojedinačno za svako mjerenje prema jednadžbi 7 (poglavlje 1.5.). Srednje vrijednosti logaritama faktora zadržavanja korištene su za daljnju obradu podataka. Linearna ovisnost log k vrijednosti o udjelu acetonitrila u pokretnoj fazi izračunata je račnalnim programom Microsoft® Office Excel 2016. Izračunate vrijednosti nagiba pravca (S) i odsječka pravca (log k_w) su dalje korištene za izračunavanje izokratnog

kromatografskog indeksa hidrofobnosti (φ_0). Izjednačavanjem vrijednosti log k s nulom, u jednadžbi 13 (poglavlje 1.5.4.1.), vrijednost φ_0 je izračunata prema sljedećoj jednadžbi:

$$\varphi_0 = \frac{-\log k_w}{S} \tag{18}$$

Gradijentna kromatografska analiza

Za određivanje lipofilnosti tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti gradijentnom analizom korištena je kolona Acquity UPLC BEH C18, 100 x 2,1 mm, čestice promjera 1,7µm.

Dva sustava otapala su korištena kao pokretna faza:

- 50 mM amonijev acetatni pufer pH 7,4 ± 0,05 (eluent A) i acetonitril (eluent B)
- 50 mM amonijev acetatni pufer pH 2,0 ± 0,05 (eluent A) i acetonitril (eluent B)

Određivanje vremena zadržavanja supstancija za kalibraciju i ispitivanih fitoestrogena provedeno je prema gradijentnom programu prikazanom u Tablici 1. Protok pokretne faze je iznosio 0,25 mL min^{-1}, temperatura kolone je bila 25 ± 1 °C, a injektirani volumen uzorka 0,2 µL.

Tablica 1. UHPLC gradijentni program

Vrijeme (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0,00	100	0
2,50	0	100
3,50	0	100
3,51	100	0
4,00	100	0

Kromatogrami pojedinog uzorka snimljeni su pri valnim duljinama maksimuma apsorpcije u UV spektru snimljenom u rasponu od 210-300 nm te su obrađeni računalnim programom Empower 2. Svaki eksperiment proveden je u triplikatu te su srednje vrijednosti vremena zadržavanja korištene za daljnju obradu podataka.

3.3.2. Ispitivanje interakcija skupine fitoestrogena s fosfolipidima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim umjetnim membranama (IAM-HPLC)

Priprema otopina

Pripremljena je otopina 50 mM amonijevog acetatnog pufera s pročišćenom vodom. Nakon otapanja pH je podešen na vrijednost 7,4 ± 0,05 dodatkom odgovarajuće količine otopine amonijevog hidroksida. Otopina natrijevog nitrita, standardne otopine fitoestrogena i supstancije za kalibraciju su pripremljene u otopini pufera i acetonitrila (1:1, v/v) u koncentraciji 0,5 mg mL^{-1}.

Izokratna kromatografska analiza

Za ispitivanje interakcija odabrane skupine fitoestrogena s fosfolipidima izokratnom HPLC analizom korištena je kolona IAM .PC.DD.2, 100 x 4,6 mm, čestice promjera 10 μm.
Sustav otapala korišten kao pokretna faza:

- 50 mM amonijev acetatni pufer pH 7,4 ± 0,05 (eluent A) i acetonitril (eluent B)

Volumni udio organskog otapala u pokretnoj fazi je iznosio 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 i 60%. Najmanje pet različitih koncentracija acetonitrila u pokretnoj fazi je korišteno za analizu pojedine supstancije za kalibraciju. Protok pokretne faze je iznosio 1,0 mL min^{-1}, temperatura kolone je bila 25±1 °C, a injektirani volumen uzorka 3,0 μL. Vrijeme zadržavanja nezadržanog spoja (mrtvo vrijeme) kromatografskog sustava mjereno je natrijevim nitritom. Kromatogrami pojedinog uzorka snimljeni su pri valnim duljinama maksimuma apsorpcije u UV spektru snimljenom u rasponu od 210-300 nm, a obrađeni su računalnim programom Empower 2.

Svaki eksperiment proveden je u triplikatu te su logaritamske vrijednosti faktora zadržavanja (log k_{IAM}) supstancija za kalibraciju izračunate pojedinačno za svako mjerenje prema jednadžbi 7 (poglavlje 1.5.). Srednje vrijednosti logaritama faktora zadržavanja korištene su za daljnju obradu podataka. Linearna ovisnost log k_{IAM} vrijednosti o udjelu acetonitrila u pokretnoj fazi izračunata je račnalnim programom Microsoft® Office Excel 2016. Izračunate vrijednosti nagiba pravca (S) i odsječka pravca (log k_{wIAM}) su dalje korištene za izračunavanje izokratnog kromatografskog indeksa hidrofobnosti (φ_{0IAM}) prema jednadžbi 18 (poglavlje 3.3.1.).

Gradijentna kromatografska analiza

Za ispitivanje interakcija odabrane skupine fitoestrogena s fosfolipidima gradijentnom HPLC analizom korištena je kolona IAM .PC.DD.2, 100 x 4,6 mm, čestice promjera 10 μm. Sustav otapala korišten kao pokretna faza:

- 50 mM amonijev acetatni pufer pH 7,4 ± 0,05 (eluent A) i acetonitril (eluent B)

Određivanje vremena zadržavanja supstancija za kalibraciju i ispitivanih fitoestrogena provedeno je prema gradijentnom programu prikazanom u Tablici 2 [67]. Protok pokretne faze je iznosio 1,0 mL min^{-1}, temperatura kolone je bila 25±1 °C, a injektirani volumen uzorka 3,0 μL.

Tablica 2. IAM - HPLC gradijentni program

Vrijeme (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0,00	100	0
1,50	100	0
10,50	0	100
11,50	0	100
12,50	100	0
15,00	100	0

Kromatogrami pojedinog uzorka snimljeni su pri valnim duljinama maksimuma apsorpcije u UV spektru snimljenom u rasponu od 210-300 nm te su obrađeni računalnim programom Empower 2. Svaki eksperiment proveden je u triplikatu te su srednje vrijednosti vremena zadržavanja korištene za daljnju obradu podataka.

3.3.3. Ispitivanje vezanja skupine fitoestrogena za humani serumski albumin primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim humanim serumskim albuminom (HSA-HPLC)

Priprema otopina

Pripremljena je otopina 50 mM amonijevog acetatnog pufera sa pročišćenom vodom. Nakon otapanja pH je podešen na vrijednost 7,4 ± 0,05 dodatkom odgovarajuće količine

otopine amonijevog hidroksida. Otopina natrijevog nitrita, standardne otopine fitoestrogena i supstancije za kalibraciju su pripremljene u otopini pufera i 2-propanola (1:1, v/v) u koncentraciji 0,5 mg mL^{-1}.

Gradijentna kromatografska analiza

Za ispitivanje vezanja odabrane skupine fitoestrogena za humani serumski albumin gradijentnom HPLC analizom korištena je kolona Chiralpak HSA, 50 x 3,0 mm, čestice promjera 5 μm.

Sustav otapala korišten kao pokretna faza:

- 50 mM amonijev acetatni pufer pH 7,4 ± 0,05 (eluent A) i 2-propanol (eluent B)

Određivanje vremena zadržavanja supstancija za kalibraciju i ispitivanih fitoestrogena provedeno je prema gradijentnom programu prikazanom u Tablici 3 [70]. Protok pokretne faze je iznosio 1,8 mL min^{-1}, temperatura kolone je bila 25±1 °C, a injektirani volumen uzorka 3,0 μL.

Tablica 3. HSA - HPLC gradijentni program

Vrijeme (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0,00	100	0
3,00	70	30
10,00	70	30
10,50	100	0
15,00	100	0

Kromatogrami pojedinog uzorka snimljeni su pri valnim duljinama maksimuma apsorpcije u UV spektru snimljenom u rasponu od 210-300 nm, a obrađeni su računalnim programom Empower 2.

Svaki eksperiment proveden je u triplikatu te su srednje vrijednosti vremena zadržavanja korištene za daljnju obradu podataka. Supstancije za kalibraciju kojima je poznat udio vezanja za humani serumski albumin su korištene za izračunavanje logaritamske vrijednosti prividnih konstanta afiniteta (log K_{lit}) prema jednadžbi 15 (poglavlje 1.5.4.2.). Linearna ovisnost logaritamske vrijednosti prividne konstante afiniteta (log K_{lit}) o logaritamskoj vrijednosti gradijentnog vremena zadržavanja (log t_{GHSA}) izračunata je račnalnim programom Microsoft®

Office Excel 2016. Izračunate vrijednosti nagiba pravca i odsječka pravca su dalje korištene za izračunavanje logaritamskih vrijednosti konstanta afiniteta (log *K*) ispitivane skupine fitoestrogena. Nadalje, njihov postotak vezanja za humani serumski albumin (%HSA) izračunat je prema jednadžbi 16 (poglavlje 1.5.4.2.).

3.3.4. Ispitivanje vezanja skupine fitoestrogena za alfa-1-kiseli glikoprotein primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim alfa-1-kiselim glikoproteinom (AGP-HPLC)

Priprema otopina

Pripremljena je otopina 50 mM amonijevog acetatnog pufera sa pročišćenom vodom. Nakon otapanja pH je podešen na vrijednost 7,4 ± 0,05 dodatkom odgovarajuće količine otopine amonijevog hidroksida. Otopina natrijevog nitrita, standardne otopine fitoestrogena i supstancije za kalibraciju su pripremljene u otopini pufera i 2-propanola (1:1, v/v) u koncentraciji 0,5 mg mL^{-1}.

Gradijentna kromatografska analiza

Za ispitivanje vezanja odabrane skupine fitoestrogena za alfa-1-kiseli glikoprotein gradijentnom HPLC analizom korištena je kolona Chiralpak AGP, 100 x 4,0 mm, čestice promjera 5 µm.

Sustav otapala korišten kao pokretna faza:

- 50 mM amonijev acetatni puffer pH 7,4 ± 0,05 (eluent A) i 2-propanol (eluent B)

Određivanje vremena zadržavanja supstancija za kalibraciju i ispitivanih fitoestrogena provedeno je prema gradijentnom programu prikazanom u Tablici 4. Protok pokretne faze je iznosio 1,8 mL min^{-1}, temperatura kolone je bila 25±1 °C, a injektirani volumen uzorka 3,0 µL.

Tablica 4. AGP - HPLC gradijentni program

Vrijeme (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0,00	100	0
2,50	75	25

4,50	75	25
4,60	100	0
6,00	100	0

Kromatogrami pojedinog uzorka snimljeni su pri valnim duljinama maksimuma apsorpcije u UV spektru snimljenom u rasponu od 210-300 nm, a obrađeni su računalnim programom Empower 2.

Svaki eksperiment proveden je u triplikatu te su srednje vrijednosti vremena zadržavanja korištene za daljnju obradu podataka. Supstancije za kalibraciju kojima je poznat udio vezanja za alfa-1-kiseli glikoprotein su korištene za izračunavanje logaritamske vrijednosti prividnih konstanta afiniteta (log K_{lit}) prema jednadžbi 15 (poglavlje 1.5.4.2.). Linearna ovisnost logaritamske vrijednosti prividne konstante afiniteta (log K_{lit}) o logaritamskoj vrijednosti gradijentnog vremena zadržavanja (log t_{GAGP}) izračunata je račnalnim programom Microsoft® Office Excel 2016. Izračunate vrijednosti nagiba pravca i odsječka pravca su dalje korištene za izračunavanje logaritamskih vrijednosti konstanta afiniteta (log K) ispitivane skupine fitoestrogena. Nadalje, njihov postotak vezanja z humani serumski albumin (%AGP) izračunat je prema jednadžbi 16 (poglavlje 1.5.4.2.).

3.3.5. Određivanje permeabilnosti primjenom Caco-2 stanica

Caco-2 stanice, stanice humanog adenokarcinoma, korištene su za određivanje permeabilnosti ispitivane skupine fitoestrogena i utvrđivanje da li su potencijalni supstrati za humani P-glikoprotein (P-gp). Svaki eksperiment za pojedinu supstanciju je proveden u duplikatu u dva smjera: apikalno-bazolateralnom smjeru (A2B) i bazolateralno-apikalnom smjeru (B2A). Nadalje, sve supstancije su ispitane u prisutnosti i odsutnosti elakridara (2 μM) specifičnog P-gp inhibitora.

Na Millicell-24 umetcima Caco-2 stanice nasađuju se u koncentraciji 0,5 x 10^6 stanica ml^{-1} (0,2 x 10^6 stanica / jažici). Stanice se inkubiraju u kontroliranim uvjetima (37 °C, 5% CO_2, relativna vlažnost od 90%) 21 dan prije korištenja u eksperimentima permeabilnosti, uz izmjenu medija svaka 2-3 dana. Na dan eksperimenta, stanice se pre-inkubiraju 45 minuta sa Dulbecco's fosfatnim puferom pH vrijednosti 7,4 koji sadrži 1% dimetilsulfoksida (DMSO), s ili bez P-gp inhibitora. Nakon toga, inkubacije su provedene s konačnim koncentracijama od 10 μM

ispitivane skupine fitoestrogena tijekom 60 minuta pri 37 °C uz blago miješanje u Dulbecco's fosfatnom puferu pH 7,4 koji sadrži Lucifer žuto (100 μM), 1% DMSO, s ili bez P-gp inhibitora. Lucifer žuto služi za provjeru integriteta staničnog monosloja. Amprenavir (0,5 μM) i diklofenak (10 μM) su korišteni za dodatnu kontrolu eksperimenta permeabilnosti. Amprenavir kao poznati P-gp supstrat, a diklofenak kao visoko permeabilni spoj. Nakon provedene inkubacije, alikvot iz svakog odjeljka razrijeđen je s tri volumena otopine acetonitrila i metanola (2:1, v/v) koja sadrži 10 ng mL^{-1} varfarina, koji ima svrhu internog standarda. Isti postupak je proveden na početku eksperimenta uzorkovanjem iz donorskih otopina kako bi se izmjerila inicijalna (C_0) koncentracija. Nakon kratkog miješanja i centrifugiranja pri 1800 okr. min^{-1} tijekom 15 minuta na temperaturi od 4 ºC, supernatant je prenesen u pločice sa 96 jažica (engl. *96-well plates*) i analiziran UHPLC-MS/MS metodom.

Permeabilnost ($P_{app,}$ [x10^{-6} cm sec^{-1}]) je izračunata prema sljedećoj jednadžbi:

$$P_{app} = \frac{\left(\frac{dQ}{dT}\right)}{A \; x \; C_0} \tag{19}$$

gdje je

$\frac{dQ}{dT}$ – brzina permeabilnosti

C_0 – inicijalna koncentracija u donorskom odjeljku

A – površina staničnog monosloja (0,7 cm^2).

Koncentracija se odnosi na omjer između površina analita i unutarnjeg standarda određenih UHPLC-MS/MS tehnikom.

Omjer efluksa u prisutnosti ili odsutnosti P-gp inhibitora je izračunat iz P_{app} vrijednosti, prema sljedećoj jednadžbi:

$$Omjer\ efluksa = \frac{P_{app}(\mathrm{B2A})}{P_{app}(\mathrm{A2B})} \tag{20}$$

Kada je dobiven omjer efluksa u odsutnosti inhibitora > 2, dok je u prisutnosti inhibitora značajno smanjen (≥50%), analit se smatra P-gp supstratom.

Masena bilanca (engl. *Mass Balance*, MB) je izračunata prema sljedećoj jednadžbi:

$$MB = \frac{(Md+Mr)}{M_0} \tag{21}$$

gdje je

Md – masa u odjeljku donora u vremenu 60 min

Mr – masa u prijemnom odjeljku u vremenu 60 min

M_0 - masa u odjeljku donora u vremenu 0 min.

Masa analita je izračunata kao produkt omjera između površina analita i unutarnjeg standarda i volumena donorskog ili prijemnog odjeljka. Prihvatljive vrijednosti masene bilance su između 80 i 120%.

UHPLC-MS/MS analiza uzoraka iz Caco-2 eksperimenta

Koncentracija svakog fitoestrogena u uzorcima iz eksperimenta određivanja permeabilnosti na Caco-2 stanicama je određena korištenjem spregnutih tehnika masene spektrometrije s trostrukim kvadrupolom (QQQ) i tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC-MS/MS).

U svrhu analize odabrane skupine fitoestrogena u uzorcima dobivenim nakon ispitivanja permeabilnosti na Caco-2 stanicama gradijentnom UHPLC-MS/MS analizom korištena je kolona Acquity UPLC BEH C18, 100 x 2,1 mm, čestice promjera 1,7μm.

Sustav otapala korišten kao pokretna faza:

- 0,1% otopina mravlje kiseline (eluent A) i acetonitril (eluent B)

Određivanje koncentracija ispitivanih fitoestrogena provedeno je prema gradijentnom programu prikazanom u Tablici 5. Protok pokretne faze je iznosio 0,4 mL min^{-1}, temperatura kolone je bila 30±1 °C, a injektirani volumen uzorka 5,0 μL.

Tablica 5. UHPLC-MS/MS gradijentni program

Vrijeme (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0,00	90	10
10,00	10	90
10,01	90	10
12,00	90	10

Uzorci su analizirani u negativnom načinu rada masenog spektrometra uz korištenje ionizacijske tehnike elektroraspršenjem. Dušik je korišten kao plin nosilac i kolizijski plin, a uvjeti na detektoru masa s trostrukim kvadrupolom bili su sljedeći:

- napon fragmentora: 380 V
- napon na kapilari: 3000 V
- temperatura plina: 250 °C
- protok plina: 15 L min^{-1}
- tlak raspršivača: 20 psi
- temperatura plina za formiranje kapljica (eng. *sheat gas*): 350 °C.

Za svaki analizirani fitoestrogen i interni standard praćen je jedan prijelaz (engl. *Selected Reaction Monitoring*, SRM), a kao ion prekursor odabran je deprotonirani molekulski ion $[M–H]^-$ (Tablica 6).

Tablica 6. Ionizacijski prijelazi korišteni za kvantifikaciju UHPLC-MS/MS metodom

Analit	Molekularni ion (m/z)	Prijelazi iona (m/z)
Biokanin A	283,0	267,8
Daidzein	253,2	223,0
Formononetin	267,1	252,0
Genistein	269,0	132,8
4,6,7-trihidroksi izoflavon	269,0	240,0
Genistin	431,1	269,0
Kumestrol	267,0	239,0
Prunetin	283,1	268,0
Sisotrin	445,1	283,1
3,4,7-trihidoksi izoflavon	269,1	212,9
Daidzin	415,1	252,9
Genistein-4,7-dimetileter	297,1	282,0
Ononin	429,1	267,0
Kumestrol dimetileter	297,1	239,0
Varfarin	307,1	161,0

U svrhu optimizacije MS/MS fragmentacije i odabira fragmentnog iona, za svaki analit je ispitano nekoliko kolizijskih energija od 10 eV do 40 eV. Nastankom fragmenata molekulskog iona, najintenzivniji fragmentni ion je odabran za SRM kvantitativnu analizu. Raspon MS/MS metode je potvrđen linearnom regresijom svakog analita u koncentracijama od 0,5 ng mL^{-1} do 8,0 ng mL^{-1} i dobiveni koeficijenti korelacija svake kalibracijske krivulje su bili veći od 0,98. Maseni spektri pojedinog uzorka su obrađeni računalnim programom MassHunter za QQQ.

3.3.6. *In-silico* predviđanje farmakokinetičkih parametara

Primjenom računalnih programa predviđeni su farmakokinetički parametri za skupinu ispitivanih fitoestrogena. Sljedeći parametri su određeni *in silico* pristupom: log *P*, udio vezanja za proteine plazme i Caco-2 permeabilnost. Primjenjeni su sljedeći programi koji se temelje na različitim teorijskim pristupima: ACD/Labs, Molinspiration, ChemExper, ChemAxon, pkCSM, preADMET i admetSAR. Molekularne strukture ili SMILES oznake korištene su za unos podataka u računalne programe.

Tablica 7. Primjenjeni računalni programi i predviđeni farmakokinetički parametri

Program	**Parametar**	**Oznaka parametra**
ACD/Labs	lipofilnost	log *P*
Molinspiration	lipofilnost	log *P*
ChemExper	lipofilnost	log *P*
ChemAxon	lipofilnost	log *P*
pkCSM	lipofilnost udio vezanja za proteine plazme Caco-2 permeabilnost	log *P* %PPB Caco-2
preADMET	lipofilnost udio vezanja za proteine plazme Caco-2 permeabilnost	log *P* %PPB Caco-2
admetSAR	Caco-2 permeabilnost	Caco-2

3.3.7. Razvoj metode QbD pristupom za istovremeno određivanje aglikonskih i glikozidnih oblika izoflavona primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-UHPLC)

Priprema standardnih otopina i otopina uzoraka

Temeljne standardne otopine pojedinog ispitivanog fitoestrogena su pripremljene u otopini acetonitrila i dimetilsulfoksida (9,5:0.5, v/v) u koncentraciji 0,5 mg mL^{-1} i čuvane u hladnjaku pri 4 °C. Radne standardne otopine korištene za razvoj, optimizaciju i validaciju metode pripremane su svježe svaki dan neposredno prije mjerenja dodatkom odgovarajuće količine temeljne standardne otopine fitoestrogena te razrjeđenjem do odgovarajuće koncentracije acetonitrilom.

Za analizu je korišteno devetnaest različitih pripravaka koji sadrže izoflavone i jedan pripravak koji ne sadrži izoflavone u svrhu slijepe probe. Pripravci analizirani u ovom radu su bili u različitim farmaceutskim oblicima što je uključivalo tablete i kapsule. Proizvodi su sadržavali biljni materijal kao što su ekstrakt soje i/ili ekstrakt crvene djeteline kao izvore izoflavonoida, a neki od njih su dodatno sadržavali i druge biljne materijale te kalcij, fosfor, magnezij i vitamin D.

Deset tableta je usitnjeno u tarioniku do finog praha koji je korišten u daljnjoj analizi. Sadržaj deset kapsula, tvrdih kapsula punjenih biljnim materijalom i mekih gel kapsula, kvantitativno je prenesen i homogeniziran. Točno je odvagano po 1,0 g homogeniziranog uzorka svakoga pojedinačnog pripravka i razrijeđen u 10,0 mL acetonitrila. Suspenzija je ekstrahirana u ultrazvučnoj kupelji pri sobnoj temperaturi 60 minuta. Nakon ekstrakcije suspenzija je filtrirana kroz Whatman Spartan 0,2 μm filter uz propuštanje prva dva mililitra uzorka. Nadalje, filtrirani uzorci su razrjeđeni acetonitrilom, ovisno o koncentraciji pojedinog izoflavonoida.

Dodatno je ispitana i učinkovitost ekstrakcije na kompozitnom uzorku pripremljenom od jednakih dijelova svakog pojedinog pripravka i provođenjem analize prema cjelokupnom analitičkom postupku bez i s dodatkom standarada izoflavonoida prije ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji. Svaki eksperiment je proveden u triplikatu.

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti vezana s detektorom s nizom fotosenzitivnih dioda

Pripremljena je otopina 10 mM fosfatnog pufera s pročišćenom vodom. Nakon otapanja pH je podešen na željene vrijednosti 3,0 ± 0,05, 4,0 ± 0,05 i 5,0 ± 0,05 dodatkom odgovarajuće količine fosforne kiseline.

Razvoj metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti vezane s detektorom s nizom dioda je proveden QbD pristupom korištenjem DryLab® računalnog programa. U tu svrhu ispitan je utjecaj nepokretne faze korištenjem tri kolone različite selektivnosti i hidrofobnosti kako bi se istražio utjecaj ortogonalnosti separacije. Zorbax RRHD Bonus RP Amide je polarna kolona s trostruko prekrivenim diizopropilnim-C14 skupinama vezanim za amidne funkcionalne skupine silikagela (Zorbax Rx-SIL). Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 kolona sadrži dvostruko prekrivene dimetil-*n*-oktadecilsilanolne skupine (C18) vezane za silikagel (Eclipse Plus silica). Cortecs UPLC C18+ kolona sadrži dvostruko prekrivene C18 skupine s pozitivno nabijenom površinom, vezane na čestice s čvrstom jezgrom (engl. *solid-core particles*).

Prije provođenja eksperimenata za unos u DryLab®, provedena je jedna probna analiza smjese odabranih fitoestrogena kako bi se osiguralo eluiranje svih pikova unutar trajanja kratkog vremena analize. DryLab® probna analiza je provedena na koloni Zorbax RRHD Eclipse Plus C18, 50 x 2,1 mm, čestice promjera 1,8µm, uz korištenje fosfatnog pufera pH 4,0 ± 0,05 (eluent A) i acetonitrila (eluent B), temperature kolone 30 °C i gradijentnog programa od 3 minute (5-90% eluenta B).

Provedeno je dvanaest experimentalnih analiza za unos u DryLab® računalni program pod sljedećim uvjetima:

- vrijeme gradijentnog programa u trajanju 3 min i 20 min (5-90% eluenta B)
- temperature 25 °C i 45 °C za Cortecs kolonu te 30 °C i 60 °C za Bonus i Eclipse Plus kolonu
- pH vrijednosti 3,0, 4,0 i 5,0 eluenta A

Analizom rezultata DryLab® računalnog programa dobiveni su optimalni parametri metode te su odabrani radni uvjeti metode za validaciju i analizu pripravaka, a prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Parametri UHPLC-DAD metode razvijene DryLab® računalnim programom

Kolona	Zorbax RRHD Eclipse Plus C18, 50 x 2,1 mm, 1,8µm		
Eluent A	10 mM NaH_2PO_4, pH 3,5		
Eluent B	Acetonitril		
Gradijent	**Vrijeme (min)**	**Eluent A (%)**	**Eluent B (%)**
	0,00	90	10
	2,00	10	95
	2,01	90	10
	3,00	90	10
Volumen injektiranja	1 µL		
Protok	0,5 mL min^{-1}		
Detektor	DAD, 230 nm		
Temperatura kolone	45 °C		

S obzirom da su spektri svih osam ispitivanih izoflavonoida na valnoj duljini od 230 nm pokazali najmanju razliku u apsorbanciji, navedena valna duljina je odabrana za radne uvjete metode. Kromatogrami pojedinog uzorka su obrađeni računalnim programom Empower 2.

3.3.8. Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrom masa visokog razlučivanja (2D-UHPLC-QTOF)

Identifikacija ispitivane skupine izoflavona u uzorcima pripravcima provedena je korištenjem spregnute tehnike masene spektrometrije koja mjeri vrijeme preleta i tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti opisane u poglavlju 3.2.3.

U prvoj dimenziji kromatografski uvjeti bili su jednaki onima navedenim u Tablici 7.

U drugoj dimenziji kao eluent A korištena je 0,1 % mravlja kiselina (v/v) koja je pogodna za ionizaciju u MS-u, a kao eluent B je korišten acetonitril. Separacija je provedena na koloni Zorbax RRHD Eclipse Plus Phenyl Hexyl, 50 x 2,1 mm, čestice promjera 1,8 µm. Ostali parametri analize, gradijentni program, protok pokretne faze, temperature kolone i valna duljina, su jednaki onima u Tablici 7.

Uzorci su analizirani u pozitivnom načinu rada masenog spektrometra uz korištenje ionizacijske tehnike elektroraspršenjem. Dušik je korišten kao plin nosilac, a uvjeti na detektoru masa koji mjeri vrijeme preleta bili su sljedeći:

- kapilarni napon: 3500 V
- temperatura plina: 200 °C
- protok plina: 14 L min^{-1}
- tlak raspršivača: 35 psi
- temperatura plina za formiranje kapljica (engl. *sheat gas*): 350 °C
- protok plina za formiranje kapljica (engl. *sheat gas flow*): 11 L min^{-1}.

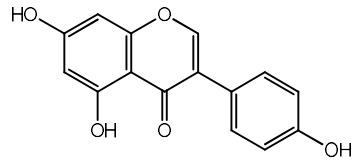
Sljedeći analiti su analizirani na spektrometru masa s odgovarajućim *m/z* vrijednostima: biokanin A 285; daidzein 255; formononetin 269; genistein 270; genistin 433; sisotrin 447; daidzin 417; ononin 431. Kromatogrami i maseni spektri pojedinog uzorka su obrađeni računalnim programima MassHunter za Q-TOF i OpenLab CDS ChemStation sa 2D-LC programskim dodatkom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

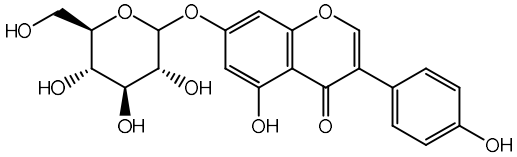
4.1. ODREĐIVANJE FARMAKOKINETIČKIH PARAMETARA

Određeni su farmakokinetički parametri za skupinu strukturno sličnih fitoestrogena iz grupe izoflavonoida i kumestana (Slika 6). Odabrane komponente uključuju devet aglikona i četiri glikozida iz grupe izoflavonoida te dva kumestana. Izbor navedenih fitoestrogena je temeljen na njihovoj širokoj prisutnosti u biljnim vrstama soje, crvene djeteline i lucerne te s obzirom na njihovu visoku biološku aktivnost. Izmjereni su lipofilnost/hidrofobnost, interakcije s fosfolipidima, vezanje za protein plazme i permeabilnost na Caco-2 staničnoj liniji.

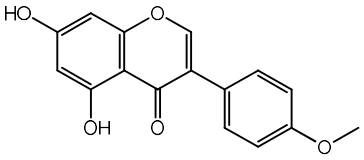
Tekućinska kromatografija ultravisoke i visoke djelotvornosti korištena je za određivanje parametara ispitivanih komponenata na osnovu kromatografskih vremena zadržavanja. Mjerenja za određivanje lipofilnosti/hidrofobnosti su provedena na ODS koloni. Biomimetičke nepokretne faze su korištene za mjerenja interakcije s fosfolipidima na IAM koloni, dok su za mjerenje vezanja za protein plazme korištene HSA i AGP kolone. Caco-2 stanice su korištene za predviđanje pasivne difuzije, aktivnog transporta i efluksa. Dobiveni eksperimentalni rezultati su uspoređeni s literaturnim i s *in silico* dobivenim podatcima.



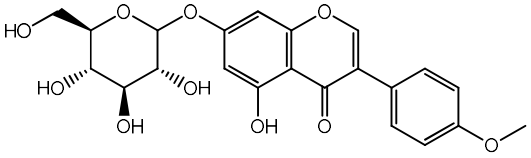
Genistein



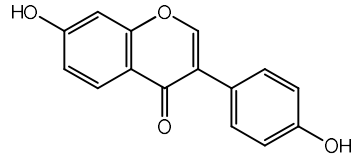
Genistin



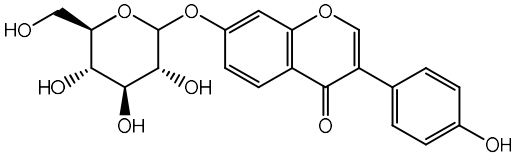
Biokanin A



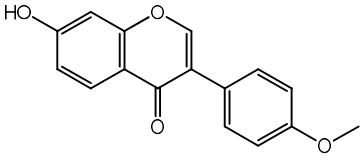
Sisotrin



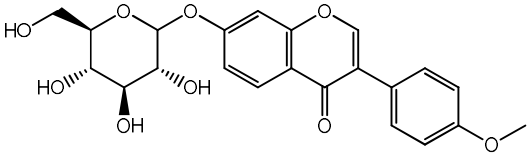
Daidzein



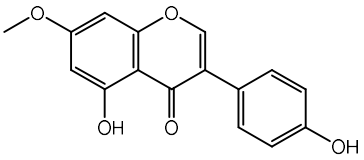
Daidzin



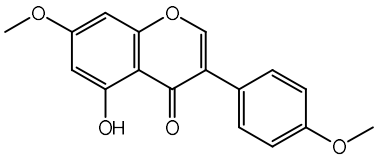
Formononetin



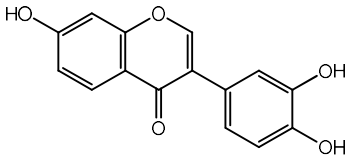
Oononin



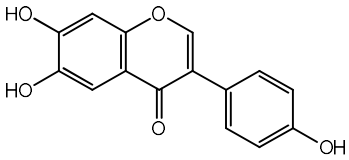
Prunetin



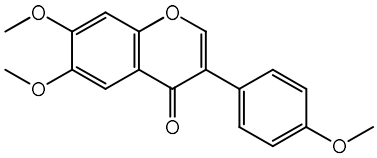
Genistein 4,7-dimetil eter



3,4,7-trihidroksi izoflavon

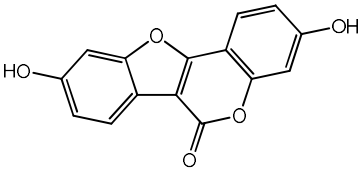


4,6,7-trihidroksi izoflavon

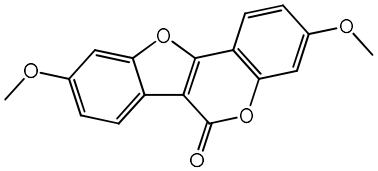


4,6,7-trimetoksi izoflavon

Izoflavoni



Kumestrol



Kumestrol dimetil eter

Kumestani

Slika 6. Strukture ispitanih fitoestrogena

4.1.1. Lipofilnost odabranih fitoestrogena određena primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (RP-UHPLC)

Određivanje kromatografskog indeksa hidrofobnosti (CHI), koji opisuje lipofilnost/ hidrofobnost molekule, provedeno je za ispitivane fitoestrogene primjenom tekućinske kromatografije. U svrhu povećanja učinkovitosti i brzine, te uštede otapala, umjesto literaturno opisanih HPLC metoda, lipofilnost je određena upotrebom UHPLC tehnike [99,100]. Mjerenja su provedena u sustavu obrnutih faza na ODS kromatografskoj koloni Acquity UPLC BEH C18. Korištena su dva sustava otapala kao pokretna faza; fosfatni pufer pri fiziološkom pH 7,4 i acetonitril te fosfatni pufer pH 2,0 i acetonitril. Fosfatni pufer pH 2,0 je dodatno korišten jer se pri toj pH vrijednosti svi ispitivani fitoestrogeni nalaze u neioniziranom obliku.

Odabrana je skupina od osam spojeva različite lipofilnosti koji su korišteni kao kalibracijski spojevi. Prvotno su kalibracijski spojevi analizirani izokratnim metodama gdje je najmanje pet različitih koncentracija acetonitrila u pokretnoj fazi korišteno za analizu pojedine supstancije za kalibraciju, kako je opisano u poglavlju 3.3.1. Teofilin, valerofenon i oktanofenon su odabrani za kalibraciju na temelju rada Valko i suradnika [64], dok su ostali spojevi odabrani s obzirom na njihove izračunate log *P* vrijednosti kako bi se pokrio raspon između najniže i najviše log *P* vrijednosti. Svaki eksperiment proveden je u triplikatu te je iz dobivenih kromatograma očitano izokratno vrijeme zadržavanja t_R.

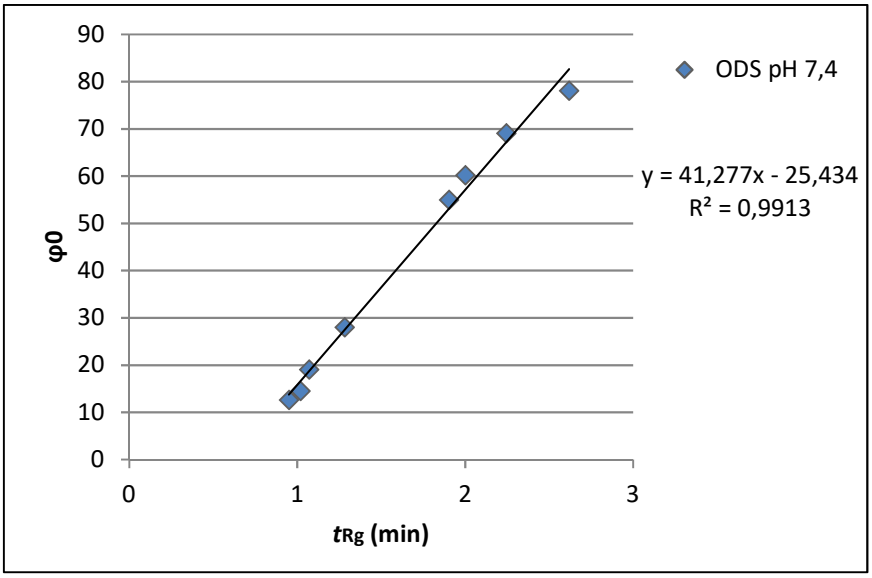
Logaritamske vrijednosti faktora zadržavanja (log *k*) supstancija za kalibraciju izračunate su prema jednadžbi 7 (poglavlje 1.5.). Linearnom regresijom logaritamske vrijednosti faktora zadržavanja (log *k*) i volumnog udjela acetonitrila u pokretnoj fazi, dobivene su vrijednosti nagiba pravca (S) i odsječka pravca (log k_w) za svaki kalibracijski spoj. Nadalje je kromatografski parametar φ_0 izračunat prema jednadžbi 18 (poglavlje 3.3.1.). log k_w opisuje ponašanje spoja u pokretnoj fazi bez organskog otapala, dok φ_0 predstavlja udio organskog otapala u pokretnoj fazi kod koje je log *k* vrijednost nula. U tablicama 9 i 10 su prikazani kromatografski parametri *S,* log *k*w i φ_0 dobiveni izokratnim metodama, te gradijentno vrijeme zadržavanja t_{Rg} dobiveno prema gradijentnoj RP-UHPLC metodi opisanoj u poglavlju 3.3.1. Kalibracijski spojevi su kod primijenjenih pH vrijednosti bili u neioniziranom obliku, stoga je i njihov koeficijent distribucije bio jednak njihovim log *P* vrijednostima.

Linearna regresija gradijentnog vremena zadržavanja t_{Rg} i vrijednosti φ_0 kalibracijskih spojeva pri pH 7,4 opisana je jednadžbom: $\varphi_0 = 41{,}28t_R - 25{,}43$, n=8, r=0,99 (Slika 7), dok je pri pH 2,0 opisana sljedećom jednadžbom: $\varphi_0 = 27{,}78t_R + 4{,}22$, n=7, r=0,98 (Slika 8). Dobiveni

koeficijenti korelacije su vrlo visoki i izvrsno se podudaraju s korelacijama drugih autora; r=0,97 i r=0,99 [64], r=0,99 [67].

Tablica 9. Kalibracijska skupina spojeva s izračunatim *S,* log *k*w i φ_0 vrijednostima određenim izokratnim metodama te gradijentno vrijeme zadržavanja t_{Rg} na ODS koloni pri pH 7,4

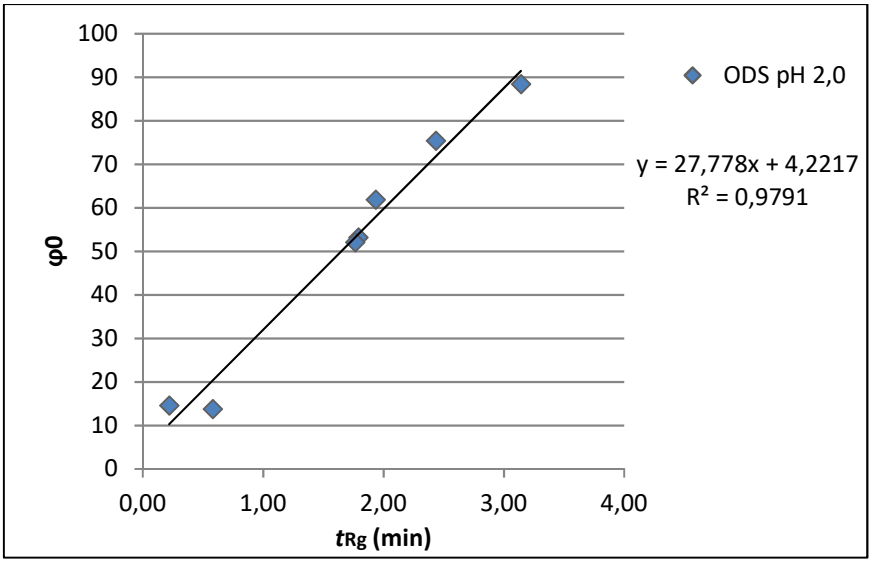
Standard	***S***	**log k_w**	**φ_0**	**t_{Rg}**
valerofenon	-0,033	2,54	78,13	2,62 ± 0,000
2,4,6-trikloropirimidin	-0,025	1,76	69,11	2,24 ± 0,001
propil p-hidroksibenzoat	-0,035	2,11	60,19	2,00 ± 0,000
propifenazone	-0,034	1,88	54,99	1,90 ± 0,000
trimetoprim	-0,024	0,68	28,00	1,28 ± 0,000
kofein	-0,063	1,21	19,09	1,07 ± 0,000
klorotiazid	-0,045	0,66	14,53	1,02 ± 0,000
teofilin	-0,081	1,03	12,68	0,95 ± 0,001



Slika 7. Linearna korelacija gradijentnih vremena zadržavanja i φ_0 vrijednosti za kalibracijsku skupinu spojeva na ODS koloni pri pH 7,4

Tablica 10. Kalibracijska skupina spojeva sa izračunatim *S,* log *k*w i φ_0 vrijednostima određenim izokratnim metodama, te gradijentno vrijeme zadržavanja t_{Rg} na ODS koloni pri pH 2,0

Standard	***S***	**log k_w**	**φ_0**	**t_{Rg}**
oktanofenon	-0,031	2,73	88,39	3,14 ± 0,000
valerofenon	-0,020	1,51	75,38	2,43 ± 0,001
2,4,6-trikloropirimidin	-0,015	0,95	61,87	1,93 ± 0,001
propil p-hidroksibenzoat	-0,019	1,01	53,15	1,79 ± 0,000
propifenazone	-0,019	0,98	52,03	1,76 ± 0,000
klorotiazid	-0,045	0,66	14,53	0,22 ± 0,001
teofilin	-0,015	0,21	13,76	0,58 ± 0,000



Slika 8. Linearna korelacija gradijentnih vremena zadržavanja i φ_0 vrijednosti za kalibracijsku skupinu spojeva na ODS koloni pri pH 2,0

Iz navedenih jednadžbi, vrijednosti nagiba pravca (A) i odsječka pravca (B) su dalje korišteni za izračun CHI vrijednosti ispitivanih fitoestrogena, prema jednadžbi 14 (poglavlje 1.5.4.1.). Ispitivani fitoestrogeni su analizirani prema gradijentnoj metodi opisanoj u poglavlju 3.3.1. pri pH 7,4 i pH 2,0. Sva mjerenja su provedena u triplikatu te su srednja vremena gradijentnog zadržavanja fitoestrogena korištena za izračun CHI vrijednosti (Tablica 11).

Tablica 11. Ispitivani fitoestrogeni i izračunate CHI_{ODS} vrijednosti i log *P* vrijednosti (ACD/Labs)

Analit	$t_{Rg\ ODS\ pH7,4}$	$CHI_{ODS\ pH7,4}$	$t_{Rg\ ODS\ pH2,0}$	$CHI_{ODS\ pH2,0}$	log *P*
Biokanin A	2,12 ± 0,000	62,11	1,95 ± 0,001	58,29	3.14
Daidzein	1,49 ± 0,000	36,11	1,68 ± 0,015	50,76	2.78
Formononetin	1,88 ± 0,000	52,08	1,69 ± 0,000	51,17	2.96
Genistein	1,68 ± 0,000	43,75	1,67 ± 0,000	50,61	2.96
Genistein-4,7-dimetileter	2,63 ± 0,000	83,17	1,98 ± 0,001	59,10	3.72
Prunetin	2,16 ± 0,000	63,77	1,96 ± 0,001	58,71	3.53
3,4,7-trihidoksi izoflavon	1,35 ± 0,001	30,15	1,51 ± 0,000	46,22	2.58
4,6,7- trihidoksi izoflavon	1,29 ± 0,003	27,85	1,26 ± 0,001	39,15	2.17
4,6,7- trimetoksi izoflavon	2,16 ± 0,000	63,68	1,98 ± 0,000	59,14	3.34
Daidzin	1,11 ± 0,001	20,18	0,87 ± 0,000	28,42	0.45
Genistin	1,23 ± 0,000	25,46	0,85 ± 0,000	27,69	0.79
Ononin	1,39 ± 0,000	32,11	1,20 ± 0,000	37,67	0.63
Sisotrin	1,55 ± 0,000	38,50	1,24 ± 0,000	38,58	0.97
Kumestrol	1,69 ± 0,002	44,39	1,96 ± 0,000	58,53	2.94
Kumestrol dimetileter	2,65 ± 0,008	83,83	2,58 ± 0,001	76,01	4.38

Eksperimentalno određene CHI vrijednosti pri pH 7,4

Gradijentna kromatografska mjerenja na ODS koloni pri pH 7,4 su rezultirala najdužim vremenom zadržavanja za genistein-4,7-dimetil eter i kumestrol dimetil eter. Time su izračunate i najviše CHI vrijednosti 83,17 i 83,83 za navedene analite koji pokazuju najvišu lipofilnost. Očekivano su dobivene najniže CHI vrijednosti za izoflavonoide s polarnim glikozidnim skupinama (daidzin 20,18, genistin 25,46, ononin 32,11 i sisotrin 38,50) i za 4,6,7-trihidroksi izoflavon (27,85) i 3,4,7-trihidroksi izoflavon (30,15). Dodatak glukoze povećava hidrofilnost molekule u značajnijoj mjeri od prisutnosti hidroksilne skupine u molekulskoj strukturi. log *P* vrijednost glikozidnog dijela molekule je -1,9 (izračunato računalnim programom ACD/Labs), dok je značajnije niža log *P* vrijednost od -0,27 za hidroksilnu skupinu [97]. Stoga su neočekivano dobivene vrlo niske CHI vrijednosti za skupinu spojeva trihidroksi izoflavona. Niske CHI vrijednosti se mogu objasniti prisutnošću negativnog naboja na navedenim spojevima pri pH 7,4 i posljedično imaju kraće vrijeme zadržavanja.

CHI vrijednosti daidzeina (36,11) i genisteina (43,75) su očekivano niže od njihovih analoga s metoksi umjesto hidroksi skupinom u molekulskoj strukturi biokanina A(62,11), prunetina (63,77) i formononetina (52,08). Još veća razlika se može vidjeti u CHI vrijednostima kumestrola (44,39) i 4,6,7-trihidroksi izoflavona (27,85) u usporedbi sa kumestrol dimetil eterom (83,83) i 4,6,7-trimetoksi izoflavonom (63,68) koji sadrže više metoksi skupina u svojoj molekulskoj strukturi.

Eksperimentalno određene CHI vrijednosti pri pH 2,0

U svrhu određivanja lipofilnosti neioniziranog oblika molekula ispitivanih fitoestrogena, provedena su mjerenja na ODS koloni pri pH 2,0. Najveća CHI vrijednost pri pH 2,0 je dobivena za kumestrol dimetil eter (Tablica 11), dok su najniže vrijednosti dobivene za glikozide genistin (27,69), daidzin (28,42), ononin (37,67) i sisotrin (38,58). Značajan porast CHI vrijednosti pri pH 2,0 u usporedbi s pH 7,4 uočen je za daidzein (50,76), genistein (50,61), 4,6,7- trihidroksi izoflavon (39,15), 3,4,7- trihidroksi izoflavon (46,22) i kumestrol (58,53), dok su se vrijednosti za biokanin A i formononetin neznatno promijenile u usporedbi s vrijednostima dobivenima pri pH 7,4, vjerojatno zbog prisutnosti lipofilne metoksi skupine u strukturi. CHI vrijednost genistein-4,7-dimetil etera se pri pH 2,0 značajno smanjila (59,10) u usporedbi sa CHI vrijednosti od 83,17 pri pH 7,4.

Usporedba eksperimentalno određenih CHI vrijednosti s literaturnim podatcima

U literaturi do sada nije opisano eksperimentalno određivanje lipofilnosti za genistein-4,7-dimethil eter, prunetin, 3,4,7- trihidroksi izoflavon, 4,6,7- trihidroksi izoflavon, 4,6,7-trihidroksi izoflavon, ononin, sisotrin i kumestrol dimetl eter, dok su za formononetin, kumestrol, genistin, daidzein i daidzin određene log *P* vrijednosti. Rothwell i suradnici [97], te Kato i suradnici [98] su odredili log *P* vrijednosti za genistein, genistin, daidzein i daidzin. Koristili su eksperimentalnu metodu izmućkavanja, a zatim su svaku frakciju analizirali korištenjem HPLC tehnike. Dobili su visoke log *P* vrijednosti za ispitivane aglikone, te značajno niže log *P* vrijednosti za glikozide, što je u skladu sa rezultatima dobivenim u ovom radu. Arnoldi i suradnici [99] su koristili izokratnu HPLC metodu s metanolom i vodom kao pokretnom fazom na ODS koloni za određivanje log *P* vrijednosti formononetina i kumestrola, usporedbom s referentnim supstancijama poznatih log *P* vrijednosti. Dobivene su vrlo slične log *P* vrijednosti za oba analita u području umjerene lipofilnosti, što se može usporediti s rezultatima u ovom radu. Yang i suradnici [100] su odredili log *P* vrijednost genisteina gradijentnom HPLC metodom, također s metanolom i vodom kao pokretnom fazom na ODS koloni, a dobivena log *P* vrijednost je u skladu sa rezultatom u ovom radu.

4.1.2. Interakcije odabranih fitoestrogena s fosfolipidima ispitane primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim umjetnim membranama (IAM-HPLC)

Određivanje kromatografskog indeksa hidrofobnosti CHI_{IAM}, koji opisuje interakciju molekule s fosfolipidima, provedeno je za ispitivane fitoestrogene primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Mjerenja su provedena na kromatografskoj koloni s vezanim fosfatidilkolinom IAM.PC.DD 2. Korišten je sustav otapala kao pokretna faza; acetatni pufer pri fiziološkom pH 7,4 i acetonitril.

Odabrana je skupina od osam spojeva različitih interakcija s fosfolipidima koji su korišteni kao kalibracijski spojevi. Prvotno su kalibracijski spojevi analizirani izokratnim metodama gdje je najmanje pet različitih koncentracija acetonitrila u pokretnoj fazi korišteno za analizu pojedine supstancije za kalibraciju, kako je opisano u poglavlju 3.3.2. Paracetamol, valerofenon i oktanofenon su odabrani za kalibraciju na temelju rada Valko i suradnika [67], dok su ostali spojevi odabrani s obzirom na njihova vremena zadržavanja kako bi se pokrio raspon između

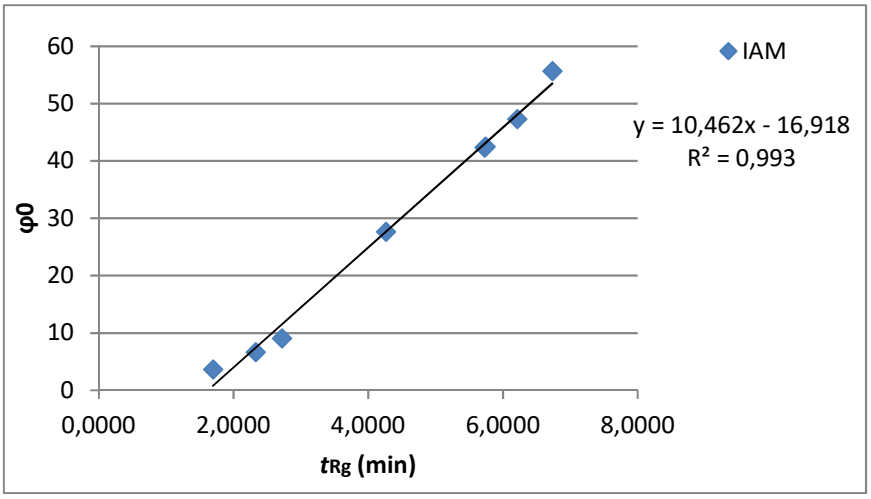
najniže i najviše CHI_{IAM} vrijednosti. Svaki eksperiment proveden je u triplikatu te je iz dobivenih kromatograma očitano izokratno vrijeme zadržavanja t_R.

Logaritamske vrijednosti faktora zadržavanja (log k_{IAM}) supstancija za kalibraciju izračunate su prema jednadžbi 7 (poglavlje 1.5.). Linearnom regresijom logaritamske vrijednosti faktora zadržavanja (log k_{IAM}) i volumnog udjela acetonitrila u pokretnoj fazi, dobivene su vrijednosti nagiba pravca (S_{IAM}) i odsječka pravca (log k_{wIAM}) za svaki kalibracijski spoj. Nadalje je kromatografski parametar φ_{0IAM} izračunat prema jednadžbi 18 (poglavlje 3.3.1.). log k_{wIAM} opisuje ponašanje spoja u pokretnoj fazi bez organskog otapala, dok φ_{0IAM} predstavlja udio organskog otapala u pokretnoj fazi kod koje je log k_{IAM} vrijednosti nula. U tablici 12 su prikazani kromatografski parametri S_{IAM}, log k_{wIAM} i φ_{0IAM} dobiveni izokratnim metodama te gradijentno vrijeme zadržavanja $t_{Rg\ IAM}$ dobiveno prema gradijentnoj RP-UHPLC metodi opisanoj u poglavlju 3.3.2.

Tablica 12. Kalibracijska skupina spojeva s izračunatim S_{IAM}, log k_{wIAM} i φ_{0IAM} vrijednostima određenim izokratnim metodama te gradijentno vrijeme zadržavanja $t_{Rg\ IAM}$ na IAM koloni pri pH 7,4

Standard	S_{IAM}	log k_{wIAM}	φ_{0IAM}	$t_{Rg\ IAM}$
oktanofenon	-0,0535	2,980	55,70	6,73 ± 0,000
2,3-diklorofenol	-0,0470	2,225	47,34	6,21 ± 0,001
valerofenon	-0,0529	2,250	42,54	5,74 ± 0,001
propil p-hidroksibenzoat	-0,0470	1,990	42,34	5,73 ± 0,000
propifenazon	-0,0453	1,253	27,66	4,26 ± 0,000
klorotiazid	-0,0430	0,391	9,08	2,72 ± 0,003
paracetamol	-0,0598	0,399	6,68	2,33 ± 0,000
teofilin	-0,0386	0,142	3,67	1,69 ± 0,004

Linearna regresija gradijentnog vremena zadržavanja $t_{Rg\ IAM}$ i vrijednosti φ_{0IAM} kalibracijskih spojeva pri pH 7,4 opisana je jednadžbom: $\varphi_{0IAM} = 10{,}46t_R\text{-}16{,}92$, n=8, r=0,99 (Slika 9). Dobiveni koeficijent korelacije je vrlo visok i izvrsno se podudaraju sa korelacijom (r=0,997) Valko i suradnika [67].



Slika 9. Linearna korelacija gradijentnih vremena zadržavanja i φ_0 vrijednosti za kalibracijsku skupinu spojeva na IAM koloni pri pH 7,4

Iz navedenih jednadžbi, vrijednosti nagiba pravca (A) i odsječka pravca (B) su dalje korišteni za izračun CHI_{IAM} vrijednosti ispitivanih fitoestrogena, prema jednadžbi 14 (poglavlje 1.5.4.1.). Ispitivani fitoestrogeni su analizirani prema gradijentnoj metodi opisanoj u poglavlju 3.3.2. pri pH 7. Sva mjerenja su provedena u triplikatu te su srednja vremena gradijentnog zadržavanja fitoestrogena korištena za izračun CHI_{IAM} vrijednosti (Tablica 13).

Eksperimentalno određene CHI vrijednosti pri pH 7,4

Ispitani fitoestrogeni su pokazali srednje jaku do jaku interakciju s fosfolipidima (Tablica 13). Niže CHI_{IAM} vrijednosti su dobivene za glikozilirane fitoestrogene daidzin (25,36), ononin (28,25), genistin (33,52) i sisotrin (35,43) od CHI_{IAM} vrijednosti dobivenih za analogne aglikone. Jednak međusobni odnos između glikozida i aglikona je uočen i na ODS koloni. Najviša CHI_{IAM} vrijednost je dobivena za kumestrol (65,10). Prisutnost metoksi grupe u strukturi molekule povećava CHI_{IAM} vrijednost u usporedbi s odgovarajućim strukturama bez metoksi grupe: ononin> daidzin, sisotrin>genistin, formononetin>daidzein. Međutim, to nije bio slučaj i s metoksi-analozima kumestrola, genisteina te 4,6,7-trihidroksi izoflavona s obzirom da su dobivene niže CHI_{IAM} vrijednosti od spojeva koji sadrže samo hidroksilne skupine.

Jaku interakciju s fosfolipidima su pokazali fitoestrogeni koji sadrže hidroksilnu skupinu na položaju 5 u strukturi (genistein, biokanin A, prunetin, genistein-4,7-dimetil eter), gdje su dobivene CHI_{IAM} vrijednosti 50 ili više. Srednje jaka interakcija s fosfolipidima (CHI_{IAM}

vrijednosti od 39,21 do 45,23) je dobivena za formononetin, daidzein, 3,4,7-trihidroksi izoflavon, 4,6,7-trihidroksi izoflavon i 4,6,7-trimetoksi izoflavon.

Tablica 13. Ispitivani fitoestrogeni i izračunate CHI_{IAM} vrijednosti

Analit	$t_{Rg\ IAM}$	CHI_{IAM}
Biokanin A	6,68 ± 0,001	52,95
Daidzein	5,86 ± 0,001	44,38
Formononetin	5,94 ± 0,001	45,23
Genistein	6,82 ± 0,001	54,40
Genistein-4,7-dimetileter	6,38 ± 0,001	49,83
Prunetin	6,52 ± 0,001	51,27
3,4,7-trihidoksi izoflavon	5,78 ± 0,001	43,55
4,6,7- trihidoksi izoflavon	5,39 ± 0,001	39,44
4,6,7- trimetoksi izoflavon	5,36 ± 0,001	39,21
Daidzin	4,04 ± 0,001	25,36
Genistin	4,82 ± 0,001	33,52
Ononin	4,32 ± 0,001	28,25
Sisotrin	5,00 ± 0,001	35,43
Kumestrol	7,84 ± 0,001	65,10
Kumestrol dimetileter	6,81 ± 0,001	54,34

Usporedba eksperimentalno određenih CHI vrijednosti s literaturnim podatcima

Uobičajeno je za očekivati da će hidroksilne skupine povećavati hidrofilnost molekule, međutim u slučajevima gdje se hidroksilna skupina nalazi na položaju 5 prstena A u strukturi, uočava se neobičan efekt. Movileanu i suradnici [135] te Kato i suradnici [98] su postavili hipotezu da navedena hidroksilna skupina stvara šesteročlani aromatski prsten koji rezultira povećanjem lipofilnosti, što odgovara rezultatima ovoga rada. U objavljenom radu, Kato i suradnici [98] su određivali afinitete polifenola za staničnu membranu mjerenjem količine inkorporirane u lipidni dvosloj liposoma. Udio aglikona daidzeina, genisteina i formononetina ugrađenih u lipidni dvosloj je bio viši od odgovarajućih glikozida daidzina, genistina i sisotrina. Usporedbom između daidzina, genistina i sisotrina, posljednji koji sadrži metoksi skupinu je pokazao i najviši afinitet za lipidni dvosloj. Nadalje, hidroksilne skupine na položaju 5 prstena

A u strukturi su povećali afinitet za lipidni dvosloj. Svi navedeni zaključci se slažu s rezultatima dobivenima na IAM nepokretnoj fazi u ovom radu.

Uekusa i suradnici [101] su odredili K_{IAM} vrijednosti za skupinu polifenola uključujući i biokanin A, genistein, formononetin, daidzein, sisotrin, genistin i daidzin. Mjerenja su provedena izokratnim metodama s pokretnom fazom koja je sadržavala acetonitril i pufer pH 2,5. Tsopelas i suradnici [102] su ispitali vrijeme zadržavanja flavonoida na IAM koloni. Kao pokretnu fazu su koristili acetonitril i fosfatni pufer pH 7,4. Izokratnim metodama su na dvije IAM kolone odredili log *k*w vrijednosti za flavonoide među kojima su i šest izoflavonoida zajedničkih ovom radu: biokanin A, daidzein genistein, formononetin, genistin i daidzin. Dobiveni rezultati objavljenoga rada su općenito u slaganju s rezultatima ovoga rada. Više vrijednosti su dobivene za aglikone i niže za glikozide u oba slučaja, iako su korištene različite metode i izračuni (izokratne metode s izračunatim log *k*w vrijednostima, nasuprot gradijentne metode s izračunatim CHI_{IAM} vrijednostima).

4.1.3. Interakcije odabranih fitoestrogena i proteina plazme određene biomimetičkom kromatografijom

Interakcije između fitoestrogena i proteina plazme su ispitane biomimetičkom kromatografijom na HSA i AGP kolonama. Prema hipotezi slobodnog lijeka [136], raspodjela u tijelu je ovisna o slobodnoj koncentraciji nevezanog lijeka u plazmi i samo nevezana frakcija može pokazati farmakološku aktivnost. Određeni strukturni elementi utječu na sklonost vezanja fitoestrogena za proteine plazme [137]:

- jedna ili više hidroksilnih skupina na prstenu B strukture flavonoida pojačava sklonost vezanja za proteine plazme, međutim, hidroksilna skupina na prstenu C strukture flavonoida će oslabiti interakciju s proteinima
- prisutnost nezasićene 2,3-veze u konjugaciji s 4-karboksilnom skupinom, karakteristika strukture flavonola, povezana je s jačom sklonosti vezanja za proteine plazme
- glikozilacijom se smanjuje sklonost vezanja za proteine plazme za 1-3 reda veličine
- metilacija hidroksilnih skupina pojačava sklonost vezanja za proteine plazme 2-16 puta

4.1.3.1. Vezanje odabranih fitoestrogena za humani serumski albumin određeno primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim humanim serumskim albuminom (HSA-HPLC)

Vezanje za humani serumski albumin je određeno za ispitivane fitoestrogene primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Mjerenja su provedena na kromatografskoj koloni s vezanim humanim serumskim albuminom Daicel, Chiralpak HSA. Korišten je sustav otapala kao pokretna faza; acetatni pufer pri fiziološkom pH 7,4 i 2-propanol.

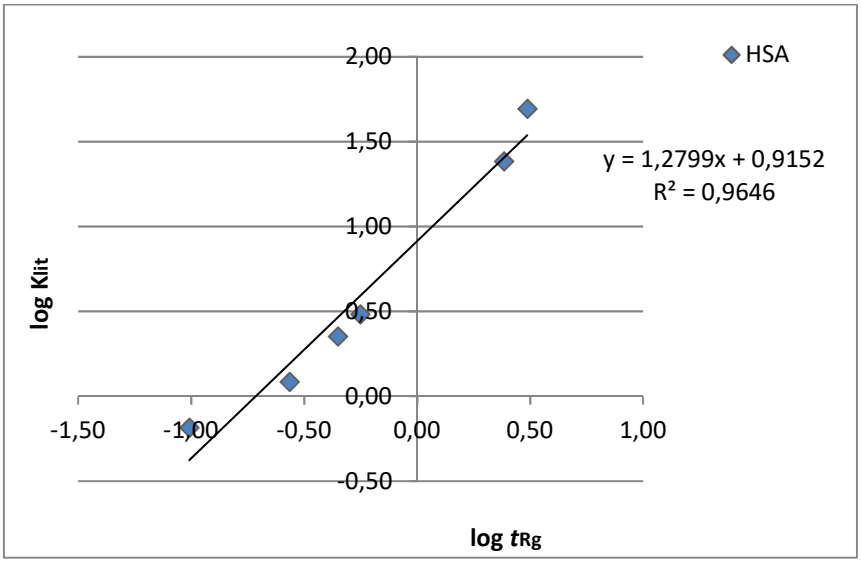
Odabrana je skupina od šest spojeva različitih literaturnih vrijednosti vezanja za HSA protein plazme, koji su korišteni kao kalibracijski spojevi (Tablica 14). Kalibracijski spojevi su analizirani gradijentnom metodom kako je opisano u poglavlju 3.3.3. Spojevi su odabrani za kalibraciju na temelju literaturnih vrijednosti vezanja za HSA protein plazme kako bi se pokrio široki raspon, između 40% (rivastigmin) i 99% (diklofenak) vezanja za HSA. Svaki eksperiment proveden je u triplikatu te je iz dobivenih kromatograma očitano gradijentno vrijeme zadržavanja $t_{Rg.}$

Supstancije za kalibraciju kojima je poznat udio vezanja za humani serumski albumin su korištene za izračunavanje logaritamske vrijednosti prividnih konstanta afiniteta (log K_{lit}) prema jednadžbi 15 (poglavlje 1.5.4.2.). U tablici 14 prikazani su literaturni (% HSA PB Lit i log K_{lit}) i kromatografski određeni (t_{Rg}) podatci za kalibracijske spojeve.

Tablica 14. Kalibracijska skupina spojeva s izračunatim t_{Rg}, log K_{lit}, log t_{Rg} vrijednostima i literaturnim podatcima vezanja za HSA protein plazme (% HSA PB Lit, [136])

Standard	t_{Rg}	**% HSA PB Lit**	**log K_{lit}**	**log t_{Rg}**
diklofenak	3,07 ± 0,001	99,0	1,69	0,49
celekoksib	2,42 ± 0,003	97,0	1,38	0,38
karbamazepin	0,56 ± 0,004	76,0	0,48	-0,25
buspiron	0,45 ± 0,004	70,0	0,35	-0,35
ezopiklon	0,27 ± 0,001	55,5	0,09	-0,57
rivastigmin	0,10 ± 0,004	40,0	-0,18	-1,01

Linearna regresija logaritamske vrijednosti vremena zadržavanja (log t_{Rg}) i logaritamske vrijednosti prividnih konstanta afiniteta (log K_{lit}), opisana je jednadžbom: log K_{lit} = 1,28 log t_R + 0,92, n=6, r=0,96 (Slika 10). Dobiveni koeficijent korelacije je vrlo visok i izvrsno se podudara s korelacijom (r=0,96) Valko i suradnika [70] te ukazuje na pouzdanost i prikladnost metode za ispitivanje interakcija lijekova s humanim serumskim albuminom.



Slika 10. Linearna korelacija logaritamskih gradijentnih vremena zadržavanja (log t_{Rg}) i logaritamske vrijednosti prividnih konstanta afiniteta (log K_{lit}), za kalibracijsku skupinu spojeva na HSA koloni

Iz navedene jednadžbe, vrijednosti nagiba pravca i odsječka pravca su dalje korišteni za izračun logaritamskih vrijednosti konstanta afiniteta (log K_{HSA}) ispitivane skupine fitoestrogena. Nadalje, njihov postotak vezanja za humani serumski albumin (%HSA PB) izračunat je prema jednadžbi 16 (poglavlje 1.5.4.2.) i rezultati su prikazani u tablici 15.

Tablica 15. Ispitivani fitoestrogeni i izračunate log $t_{Rg\ HSA}$, log K_{HSA} i %HSA PB vrijednosti

Analit	$t_{Rg\ HSA}$	log $t_{Rg\ HSA}$	log K_{HSA}	%HSA PB
Biokanin A	2,66 ± 0,001	0,424	1,458	97,60
Daidzein	1,81 ± 0,001	0,258	1,245	95,57
Formononetin	2,05 ± 0,001	0,311	1,314	96,32
Genistein	2,48 ± 0,003	0,395	1,421	97,31
Genistein-4,7-dimetileter	2,54 ± 0,002	0,405	1,434	97,41
Prunetin	2,53 ± 0,003	0,403	1,431	97,39
3,4,7-trihidoksi izoflavon	1,92 ± 0,006	0,284	1,279	95,95
4,6,7- trihidoksi izoflavon	1,63 ± 0,005	0,211	1,186	94,82
4,6,7- trimetoksi izoflavon	1,43 ± 0,001	0,154	1,112	93,76
Daidzin	0,57 ± 0,002	-0,247	0,599	80,70
Genistin	1,40 ± 0,000	0,145	1,100	93,57
Ononin	0,63 ± 0,001	-0,203	0,655	82,71
Sisotrin	1,46 ± 0,002	0,165	1,126	93,97
Kumestrol	2,82 ± 0,001	0,450	1,491	97,84
Kumestrol dimetileter	2,75 ± 0,001	0,439	1,478	97,75

Eksperimentalno određene %HSA PB vrijednosti

Izračunati postoci vezanja za humani serumski albumin (%HSA PB) upućuju na snažnu interakciju ispitivanih fitoestrogena s humanim serumskim albuminom vezanim na HSA kolonu. Nešto niže vrijednosti su dobivene za fitoestrogene koji sadrže glikozidnu skupinu, posebice daidzin (80,70) i ononin (82,71).

Za glikozide s metoksi skupinom u strukturi su dobivene više vrijednosti %HSA PB od glikozida s hidroksi skupinom (ononin > daidzin i sisotrin > genistin). Dobiveni rezultati se slažu s rezultatima objavljenim u radovima Xiao i suradnika te Cao i suradnika [103,104].

Usporedba eksperimentalno određenih %HSA PB vrijednosti s literaturnim podatcima

Eksperimentalno određeni postoci vezanja za humani serumski albumin su objavljeni u literaturi samo za biokanin A, daidzein, genistein, formononetin i genistin iz ispitivane skupine fitoestrogena u ovom radu. Xiao i suradnici su ispitivali odnos strukture i afiniteta flavonoida za HSA fluorescencijskom analizom [103]. Utvrdili su da se metilacijom hidroksilnih skupina pojačava afinitet za proteine plazme dok se glikozilacijom flavonoida smanjivao afinitet za

HSA, što se može usporediti sa rezultatima ovoga rada. Dodatno su Cao i suradnici ispitali učinak metilacije na afinitet za HSA te su zaključili da metilacija povećava afinitet za HSA što se slaže s prethodnim radom Xiao i suradnika.

4.1.3.2. Vezanje odabranih fitoestrogena za alfa-1-kiseli glikoprotein određeno primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s vezanim alfa-1-kiselim glikoproteinom (AGP-HPLC)

Vezanje za alfa-1-kiseli glikoprotein je određeno za ispitivane fitoestrogene primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Mjerenja su provedena na kromatografskoj koloni sa vezanim alfa-1-kiseli glikoproteinom Daicel, Chiralpak AGP. Korišten je sustav otapala kao pokretna faza; acetatni pufer pri fiziološkom pH 7,4 i 2-propanol.

Odabrana je skupina od šest spojeva različitih literaturnih vrijednosti vezanja za AGP protein plazme, koji su korišteni kao kalibracijski spojevi (Tablica 16). Kalibracijski spojevi su analizirani gradijentnom metodom kako je opisano u poglavlju 3.3.4. Spojevi su odabrani za kalibraciju na temelju literaturnih vrijednosti vezanja za AGP protein plazme kako bi se pokrio široki raspon, između 3% (paracetamol) i 87% (nikardipin) vezanja za AGP. Svaki eksperiment proveden je u triplikatu, te je iz dobivenih kromatograma očitano gradijentno vrijeme zadržavanja $t_{Rg.}$

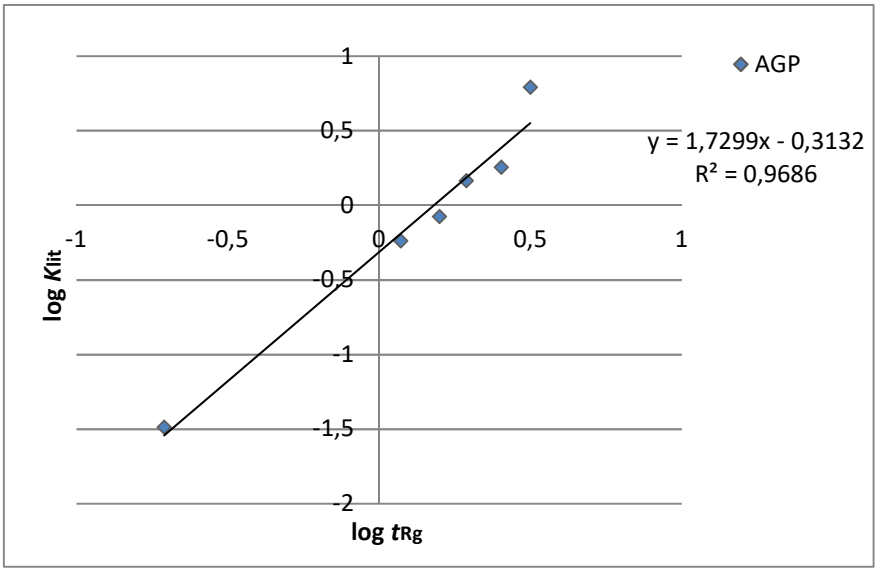
Tablica 16. Kalibracijska skupina spojeva sa izračunatim t_{Rg}, log K_{lit}, log t_{Rg} vrijednostima i literaturnim podatcima vezanja za AGP protein plazme (% AGP PB Lit, [138])

Standard	t_{Rg}	**% AGP PB Lit**	**log K_{lit}**	**log t_{Rg}**
nikardipin	3,16 ± 0,001	87,0	0,79	0,50
karbamazepin	2,53 ± 0,003	65,0	0,26	0,40
diklofenak	1,94 ± 0,008	60,0	0,17	0,29
trimetoprim	1,58 ± 0,002	46,2	-0,07	0,20
nizatidin	1,18 ± 0,011	37,1	-0,24	0,07
paracetamol	0,20 ± 0,007	3,2	-1,49	-0,71

Supstancije za kalibraciju kojima je poznat udio vezanja za alfa-1-kiseli glikoprotein korištene su za izračunavanje logaritamske vrijednosti prividnih konstanta afiniteta (log K_{lit})

prema jednadžbi 15 (poglavlje 1.5.4.2.). U tablici 16 prikazani su literaturni (% AGP PB Lit i log K_{lit}) i kromatografski određeni (t_{Rg}) podatci za kalibracijske spojeve.

Linearna regresija logaritamske vrijednosti vremena zadržavanja (log t_{Rg}) i logaritamske vrijednosti prividnih konstanta afiniteta (log K_{lit}), opisana je jednadžbom: log K_{lit} = 1,73 log t_R - 0,31, n=6, r=0,97 (Slika 11). Dobiveni koeficijent korelacije je nešto niži u usporedbi s korelacijom (r=0,986) Valko i suradnika [138], ali je zadovoljavajući te ukazuje na pouzdanost i prikladnost metode za ispitivanje interakcija lijekova s alfa-1-kiselim glikoproteinom.



Slika 11. Linearna korelacija logaritamskih gradijentnih vremena zadržavanja (log t_{Rg}) i logaritamske vrijednosti prividnih konstanta afiniteta (log K_{lit}), za kalibracijsku skupinu spojeva na AGP koloni

Iz navedene jednadžbe, vrijednosti nagiba pravca i odsječka pravca su dalje korišteni za izračun logaritamskih vrijednosti konstanta afiniteta (log K_{AGP}) ispitivane skupine fitoestrogena. Nadalje, njihov postotak vezanja za alfa-1-kiseli glikoprotein (%AGP PB) izračunat je prema jednadžbi 16 (poglavlje 1.5.4.2.) i rezultati su prikazani u tablici 17.

Tablica 17. Ispitivani fitoestrogeni i izračunate log $t_{Rg\ AGP}$, log K_{AGP} i %AGP PB vrijednosti

Analit	$t_{Rg\ AGP}$	log $t_{Rg\ AGP}$	log K_{AGP}	**%AGP PB**
Biokanin A	2,70 ± 0,001	0,432	0,430	73,66
Daidzein	1,92 ± 0,007	0,283	0,175	60,53
Formononetin	2,34 ± 0,002	0,370	0,324	68,53
Genistein	2,34 ± 0,027	0,369	0,322	68,41
Genistein-4,7-dimetileter	3,20 ± 0,001	0,505	0,557	79,09
Prunetin	3,03 ± 0,003	0,482	0,517	77,46
3,4,7-trihidoksi izoflavon	2,11 ± 0,003	0,324	0,246	64,41
4,6,7- trihidoksi izoflavon	1,85 ± 0,004	0,268	0,149	59,06
4,6,7- trimetoksi izoflavon	2,51 ± 0,000	0,399	0,375	71,02
Daidzin	0,97 ± 0,011	-0,015	-0,339	31,73
Genistin	1,33 ± 0,004	0,122	-0,103	44,56
Ononin	1,66 ± 0,003	0,221	0,068	54,44
Sisotrin	2,03 ± 0,001	0,308	0,218	62,91
Kumestrol	3,10 ± 0,001	0,491	0,532	78,07
Kumestrol dimetileter	3,35 ± 0,001	0,525	0,592	80,41

Eksperimentalno određene %AGP PB vrijednosti

Za ispitivanu skupinu fitoestrogena dobivene su niže vrijednosti postotka vezanja za alfa-1-kiseli glikoprotein nego vrijednosti za humani serumski albumin. Najviši postotak vezanja za AGP je uočen za kumestrol dimetil eter (80,41), a najniži za glikozid daidzin (31,73). Kao što je uočeno za %HSA PB vrijednosti, i za %AGP PB su vrijednosti bile više za glikozide s metoksi skupinom u usporedbi s glikozidima koji sadrže hidroksilnu skupinu (ononin > daidzin i sisotrin > genistin). Aglikoni su također pokazali jednako ponašanje, gdje su dobivene %AGP PB vrijednosti daidzeina (60,53) i genisteina (68,41) niže od njihovih analoga s metoksi umjesto hidroksilnom skupinom u molekulskoj strukturi biokanina A (73,66), prunetina (77,46) i formonentina (68,41).

4.1.4. Određivanje permeabilnosti odabranih fitoestrogena primjenom Caco-2 stanica

Permeabilnost ispitivane skupine fitoestrogena je određena na modelu Caco-2 stanica. S obzirom da Caco-2 stanice sadrže sustave za aktivni transport i enzime, ovaj model se smatra zlatnim standardom za *in vitro* ispitivanje permeabilnosti i jedan je od najčešće korištenih *in vitro* alata za predviđanje permeabilnosti.

Caco-2 permeabilnost (P_{app}) je ispitana u oba smjera, prijenos iz apikalnog u bazolateralni (A2B) i iz bazolateralnog u apikalni smjer (B2A) te je ispitan omjer efluksa kao pokazatelja aktivnog transporta.

Koncentracija svakog fitoestrogena u uzorcima iz eksperimenta određivanja permeabilnosti na Caco-2 stanicama određena je korištenjem spregnutih tehnika masene spektrometrije s trostrukim kvadrupolom (QQQ) i tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC-MS/MS). U svrhu UHPLC-MS/MS analize korištena je kolona Acquity UPLC BEH C18 i sustav otapala 0,1% otopina mravlje kiseline i acetonitrila, a parametri UHPLC i MS/MS metoda su opisani u poglavlju 3.3.5. Svaki eksperiment proveden je u duplikatu, a iz dobivenih kromatograma očitana je površina ispod pika u svrhu izračuna koncentracije ispitivanih fitoestrogena. Prema jednadžbi 19 (poglavlje 3.3.5.) izračunata je P_{app} vrijednost za svaki ispitivani fitoestrogen, dok je omjer efluksa izračunat prema jednadžbi 20 (poglavlje 3.3.5.) i svi rezultati su prikazani u tablici 18.

Tablica 18. Prividni koeficijenti permeabilnosti (P_{app}) određeni u Caco-2 staničnom modelu iz apikalne u bazolateralnu (AB) i iz bazolateralne u apikalnu (BA) stranu pri pH=7.4 bez i sa inhibicijom efluksne pumpe P-glikoproteina pomoću elakridara

Analit	Neinhibirani P-gp			Inhibirani P-gp		
	P_{app} (AB)	P_{app} (BA)	P_{app} omjer (BA/AB)	P_{app} (AB)	P_{app} (BA)	P_{app} omjer (BA/AB)
	cmx10^{-6}/s	cmx10^{-6}/s		cmx10^{-6}/s	cmx10^{-6}/s	
Biokanin A	13,9 ± 1,7	14,1 ± 0,5	1,0	12,1 ± 1,2	11,9 ± 4,8	1,0
Daidzein	19,1 ± 0,1	19,9 ± 0,8	1,0	19,8 ± 0,8	19,1 ± 2,7	1,0
Formononetin	16,1 ± 0,1	15,0 ± 0,7	0,9	22,9 ± 2,7	16,8 ± 0,6	0,7
Genistein	21,8 ± 1,8	19,7 ± 1,0	0,9	20,2 ± 0,4	18,4 ± 0,4	0,9
Genistein-4,7-dimetileter	3,7 ± 0,2	3,2 ± 1,5	0,9	6,1 ± 0,8	2,9 ± 0,0	0,5
Prunetin	2,3 ± 0,0	2,5 ± 0,7	1,1	7,2 ± 0,5	7,2 ± 0,4	1,0
3,4,7-trihidoksi izoflavon	2,6 ± 0,5	0,4 ± 0,1	0,2	3,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,1
4,6,7- trihidoksi izoflavon	5,2 ± 1,1	12,8 ± 0,5	2,4	4,7 ± 0,7	7,0 ± 1,1	1,5
4,6,7- trimetoksi izoflavon	30,2 ± 3,1	21,2 ± 3,7	0,7	31,1 ± 5,2	24,5 ± 5,1	0,8
Daidzin	0,1 ± 0,0	1,5 ± 0,1	25,4	0,2 ± 0,0	0,6 ± 0,1	2,6
Genistin	0,9 ± 0,3	3,2 ± 1,0	3,7	0,2 ± 0,1	1,9 ± 0,5	8,2
Ononin	1,1 ± 0,1	3,5 ± 0,8	3,1	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,1	4,5
Sisotrin	0,7 ± 0,2	7,2 ± 1,7	10,8	0,1 ± 0,1	2,9 ± 0,7	24,0
Kumestrol	4,0 ± 0,0	2,0 ± 1,2	0,5	5,3 ± 0,2	2,8 ± 2,2	0,5
Kumestrol dimetileter	15,3 ± 0,2	7,9 ± 0,1	0,5	25,7 ± 0,1	11,5 ± 0,1	0,4

Za 4,6,7-trimetoksi izoflavon je određena najviša AB permeabilnost s P_{app} (AB) vrijednosti od 30,2 cm x 10^{-6} s^{-1}. Biokanin A (13,9 cm x 10^{-6} s^{-1}), daidzein (19,1 cm x 10^{-6} s^{-1}), formononetin (16,1 cm x 10^{-6} s^{-1}), genistein (21,8 cm x 10^{-6} s^{-1}) i kumestrol dimetil eter (15,3 cm x 10^{-6} s^{-1}) su pokazali visoku AB permeabilnost.

S obzirom na strukture, analiti s glikozidnom skupinom, daidzin, genistin, ononin i sisotrin su pokazali nisku permeabilnost na Caco-2 modelu. Također su za njih određene i slabije interakcije sa fosfolipidima određene na IAM koloni. Iz navedenih rezultata se može očekivati i niska intestinalna apsorpcija glikozidnih izoflavonoida. U *in vivo* uvjetima, glikozidi su podvrgnuti hidrolizi djelovanjem enzima glukozidaze i laktaza-florizin hidrolaze (LPH), u usnoj šupljini i tankom crijevu što rezultira nastajanjem aglikona daidzeina, genisteina, biokanina A i formononetina. U obliku aglikona, lipofilnost im se značajno povećava i dodatno zbog niske molekulske mase, permeabilnost na Caco-2 stanicama je visoka te se može usporediti s dobivenim jakim interakcijama s fosfolipidima, odnosno visokim CHI_{IAM} vrijednostima.

4,6,7-trihidroksi izoflavon i kumestrol su rezultirali umjerenom Caco-2 permeabilnošću, dok su njihovi metoksi analozi 4,6,7-trimetoksi izoflavon i kumestrol dimetil eter pokazali visoku permeabilnost. Rezultati dobiveni na IAM koloni za navedene spojeve se nisu razlikovali ovisno o funkcionalnim skupinama u strukturi, ali su dobivene najviše vrijednosti za kumestrol (CHI_{IAM} 65,10), visoke za kumestrol dimetil eter i umjerene za 4,6,7-trihidroksi izoflavon i 4,6,7-trimetoksi izoflavon.

Za ostale ispitivane fitoestrogene su dobivene umjerene Caco-2 permeabilnosti i umjerene do visoke CHI_{IAM} vrijednosti bez značajnih utjecaja s obzirom na strukturne razlike.

Usporedbom omjera efluksa u prisutnosti i odsutnosti inhibitora P-glikoproteina (P-gp) moguće je identificirati da li je ispitivana supstancija P-gp supstrat. Dodatak elakridara, inhibitora P-gp efluksne pumpe, rezultirao je povišenom P_{app} (AB) i sniženom P_{app} (BA) vrijednosti samo za daidzin. Ovakav zaključak se može objasniti kao lažno pozitivan rezultat zbog vrlo niske permeabilnosti daidzina.

Za svaki pokus je izračunata i masena bilanca prema jednadžbi 21 (poglavlje 3.3.5.) te su dobivene prihvatljive vrijednosti između 80% i 120% uz izuzetak biokanina A, prunetina i kumestrola. Nespecifično vezanje ili membranska retencija je literaturno poznata pojava i opisuje vezanje lijeka za Caco-2 monosloj, a rezultira nepotpunom masenom bilancom i podcijenjenim rezultatima permeabilnosti [139].

Litaraturno je u nekoliko studija opisano određivanje Caco-2 permeabilnosti za određene fitoestrogene (biokanin A, genistein, daidzein, formononetin, prunetin, genistin i daidzin) koji

su zajednički ovom radu [100,105-107]. Određena je umjerena do visoka Caco-2 permeabilnost gdje su glikozidi pokazali nižu permeabilnost od odgovarajućih aglikona. Autori su zaključili da većina flavonoida prolazi Caco-2 stanični monosloj pasivnom difuzijom, iako su Tian i suradnici predložili da mehanizam efluksa može postojati, ali nije bio ispitan inhibicijom P-glikoproteina.

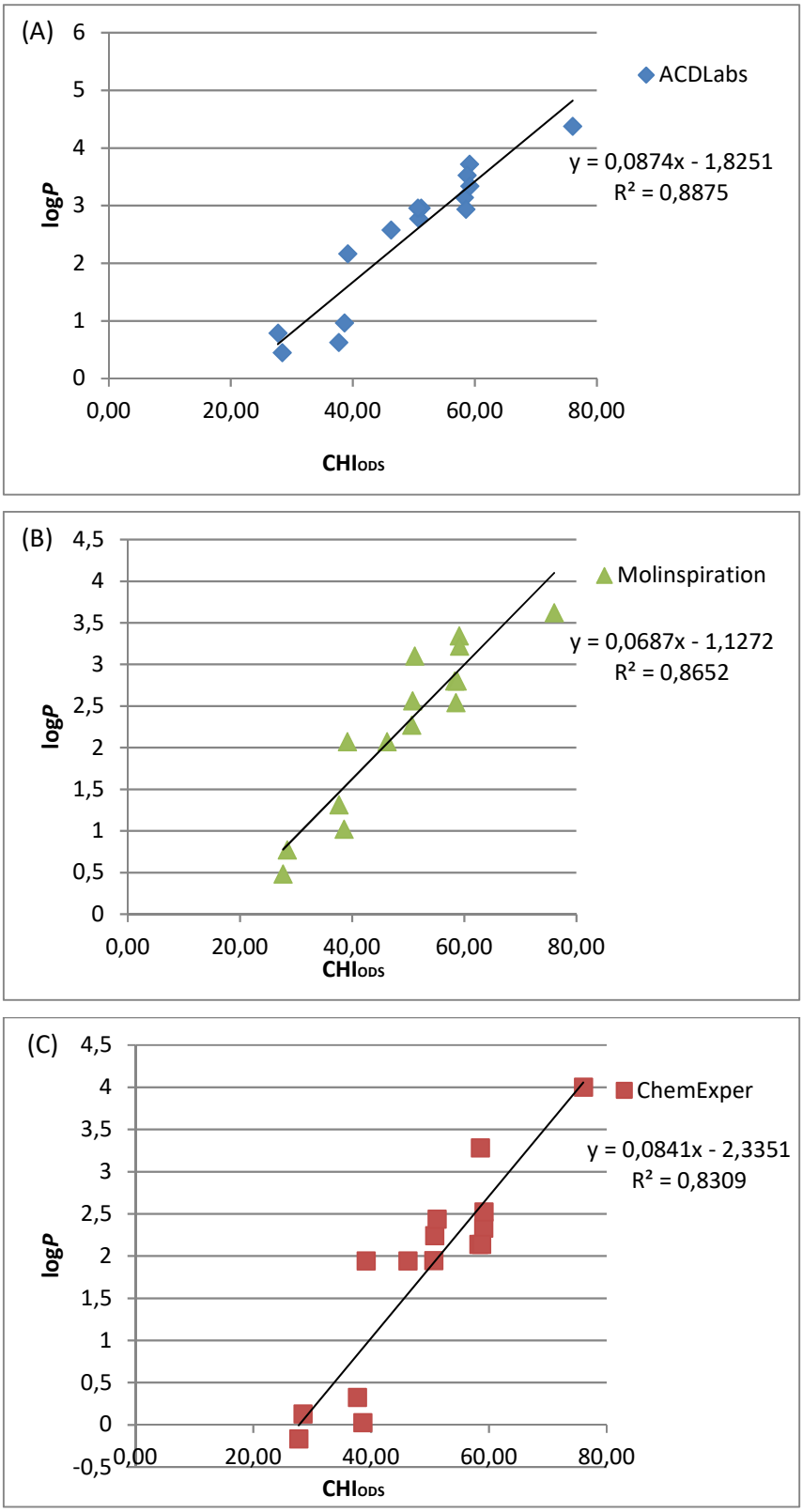
4.1.5. Usporedba eksperimentalno određenih farmakokinetičkih parametara i ADME parametara predviđenih računalnim programima

Eksperimentalno određeni kromatografski parametri i rezultati Caco-2 permeabilnosti su uspoređeni s *in silico* predviđenim ADME parametrima; log *P*, udio vezanja za proteine plazme i Caco-2 permeabilnost.

Usporedba eksperimentalno određenih CHI vrijednosti pri pH 7,4 i pH 2,0 s *in silico* izračunatim log *P* vrijednostima

Za odabranu skupinu fotoestrogena ispitan je odnos između kromatografski dobivenih CHI vrijednosti pri pH 7,4 i *in silico* računalnim programom (ACD/Labs) izračunatih log *P* vrijednosti. Dobivena je osrednja korelacija s koeficijentom korelacije r = 0,69 (log *P* = 0,0503 x CHI_{ODS} + 0,1196) što se može pripisati činjenici da je dio ispitivanih fitoestrogena djelomično ili potpuno ioniziran pri pH 7,4. Stoga i kromatografska vremena zadržavanja predstavljaju raspodjelu ioniziranog i neioniziranog oblika molekule, dok log *P* predstavlja raspodjelu neioniziranog oblika molekule između oktanola i vode. U ovom radu, biokanin A, daidzein, formononetin, genistein, 3,4,7-trihidroksi izoflavon, 4,6,7- trihidroksi izoflavon i kumestrol su u ioniziranom obliku. Navedeni fitoestrogeni su slabe kiseline s pKa vrijednostima između 6,5 i 7,1 pa imaju negativan naboj pri pH 7,4, a time i slabo zadržavanje na ODS nepokretnoj fazi. Zbog navedenoga, dobivene su niže kromatografske CHI_{ODS} vrijednsoti u usporedbi sa izračunatim log *P* vrijednostima.

Za odabranu skupinu fotoestrogena ispitan je odnos između kromatografski dobivenih CHI vrijednosti pri pH 2,0 i *in silico* računalnim programima (ACD/Labs, Molinsipration, ChemExper, ChemAxon, pkCSM i preADMET) izračunatih log *P* vrijednosti. Dobivene su vrlo dobre korelacije za log *P* vrijednosti predviđene ACD/Labs, Molinsipration i ChemExper računalnim programima s koeficijentima korelacije u rasponu od 0,83 do 0,89 budući da su svi ispitivani fitoestrogeni bili u neioniziranom obliku pri pH 2,0 (Slika 12). Korelacije s računalnim programima ChemAxon, pkCSM i preADMET bile su niže od 0,77.



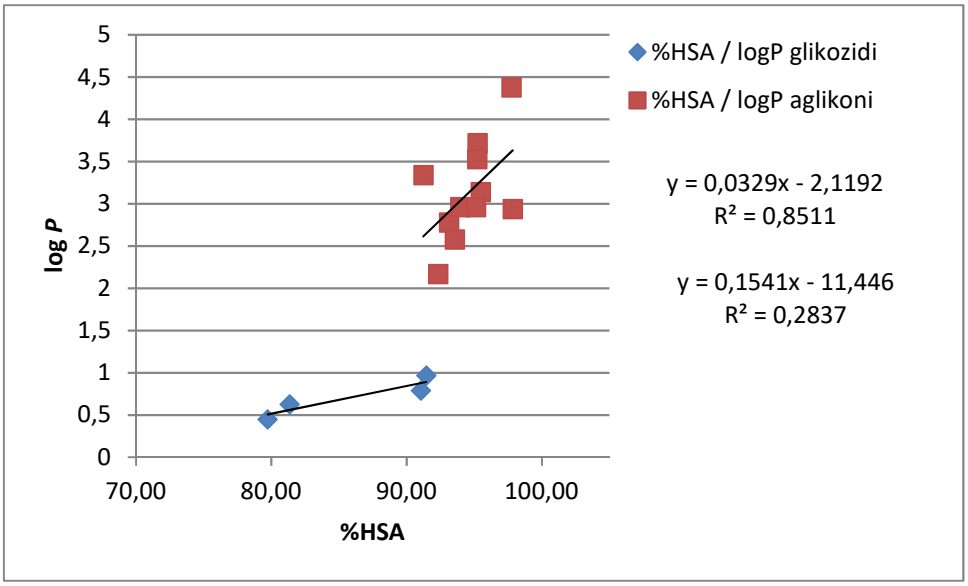
Slika 12. Linearne korelacije kromatografski određenih CHI_{ODS} vrijednosti pri pH 2,0 i predviđenih log*P* vrijednosti računalnim programima: (A) ACDLabs, (B) Molinspiration i (C) ChemExper za ispitivanu skupinu fitoestrogena.

Usporedba eksperimentalno određenih CHI_{IAM}, %HSA PB i %AGP PB vrijednosti s *in silico* izračunatim log *P* vrijednostima

S obzirom da je interakcija lijekova s IAM, HSA i AGP kolonama ovisna o lipofilnosti, s razlikama zbog prisutnosti naboja, dobiveni rezultati su također uspoređeni s log *P* vrijednostima predviđenim ACD/Labs računalnim programom (dobivena najbolja korelacija). Umjerena korelacija je dobivena između eksperimentalno određenih CHI_{IAM} vrijednosti i predviđenih log *P* vrijednosti opisana jednadžbom: log *P* = 0,09 CHI_{IAM} – 1,54, n = 15, r = 0,66. Jedna vrijednost, za kumestrol, odstupa od ostalih i time značajno smanjuje korelaciju, zbog dobivene više CHI_{IAM} vrijednosti od očekivane s obzirom na prisutnost negativnog naboja djelomično ioniziranog spoja pri pH 7,4.

Očekivano su određene niže vrijednosti vezanja glikozida za HSA sukladno njihovim log *P* vrijednostima koje su <1 (Tablica 11). Najviša vrijednost %HSA PB je dobivena za kumestrol (97,84) iako su postoci vezanja za humani serumski albumin za sve ispitivane aglikone fitoestrogena i kumestane vrlo visoki, između 95% i 98%. Osim toga, kumestrol, biokanin A, daidzein, formononetin, genistein, 3,4,7-trihidroksi izoflavon i 4,6,7-trihidroksi izoflavon su rezultirali snažnijim vezanjem za HSA nego što bi se očekivalo, s obzirom na smanjenu lipofilnost zbog negativnog naboja pri pH 7,4. Ispitivanjem odnosa eksperimentalno određenih %HSA PB vrijednosti i log *P* vrijednosti predviđenih ACD/Labs računalnim programom, dobivena je sljedeća jednadžba: log P = 0,19 %HSA – 15,02, n = 15, s koeficijentom korelacije 0,70. Međutim, uočeno je da eksperimentalno određene vrijednosti %HSA PB glikozida značajno bolje koreliraju s ACD/Labs izračunatim log *P* vrijednostima s dobivenim koeficijentom korelacije 0,85 (Slika 13).

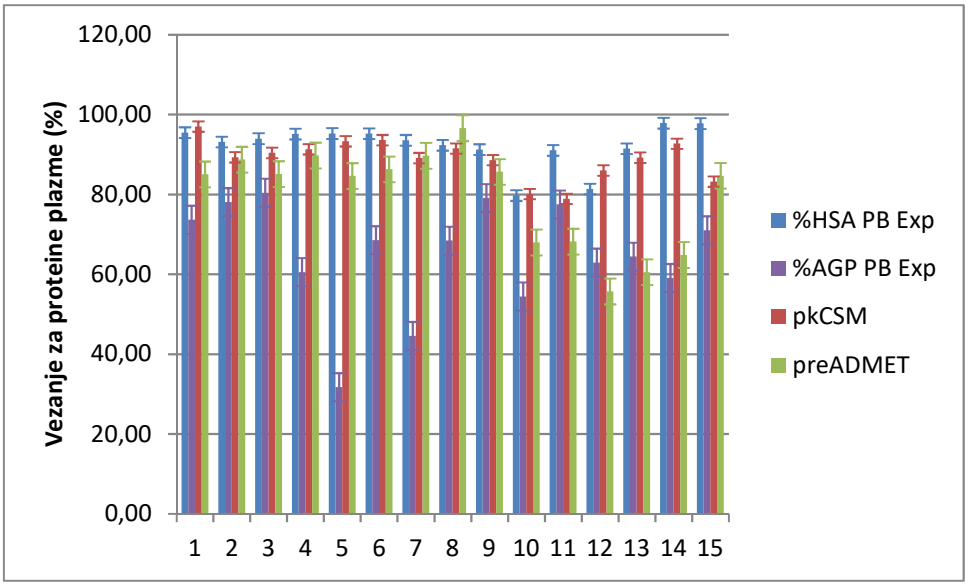
Ispitivanjem odnosa eksperimentalno određenih %AGP PB vrijednosti i log *P* vrijednosti predviđenih ACD/Labs računalnim programom, dobivena je sljedeća jednadžba: log P = 0,08 %AGP – 2,65, n = 15, s koeficijentom korelacije 0,77.



Slika 13. Linearne korelacije kromatografski određenih %HSA PB vrijednosti i predviđenih log*P* vrijednosti (ACDLabs) za ispitivanu skupinu fitoestrogena

Usporedba eksperimentalno određenih vrijednosti vezanja za HSA i AGP s *in silico* izračunatim vrijednostima vezanja za proteine plazme

Izmjerene vrijednosti vezanja za proteine plazme su uspoređene s predviđenim vezanjem za proteine plazme kako je prikazano na slici 14. Dobivene su vrlo slične izračunate vrijednosti vezanja za proteine plazme računalnim programom pkCSM i eksperimentalno određene %HSA PB vrijednosti (RSD = 0,33-11,37%). Nižu korelaciju su pokazali eksperimentalno određene %AGP PB vrijednosti i predviđene vrijednosti vezanja za proteine plazme (RSD = 1,30-69,64%), što je očekivano s obzirom da AGP veže kemijski vrlo različite lijekove u usporedbi s HSA. Računalnim programom preADMET predviđene su vrijednosti vezanja za proteine plazme sličnije eksperimentalno određenim %AGP PB od onih predviđenim pkCSM računalnim programom.



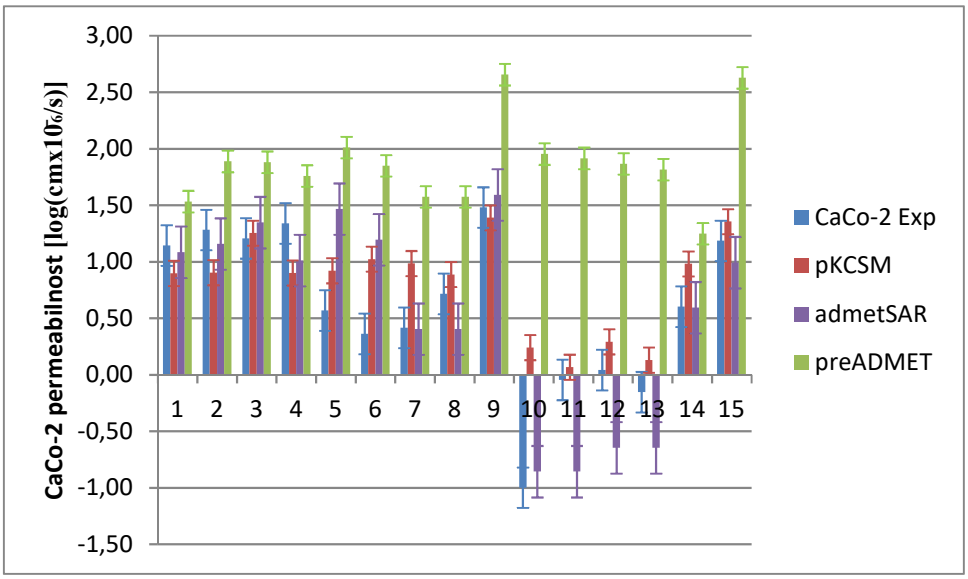
Slika 14. Vezanje za protein plazme (%) ispitivane skupine fitoestrogena određeno eksperimentalno (%HSA PB Exp, %AGP PB Exp) i izračunato računalnim programima pkCSM i preADMET (brojevi predstavljaju fitoestrogene sljedećim redom: 1, biokanin A; 2, daidzein; 3, formononetin; 4, genistein; 5, genistein-4,7-dimetileter; 6, prunetin; 7, 3,4,7-trihidoksi izoflavon; 8, 4,6,7- trihidoksi izoflavon; 9, 4,6,7- trimetoksi izoflavon; 10, daidzin; 11, genistin; 12, ononin; 13, sisotrin; 14, kumestrol; 15, kumestrol dimetileter.

Usporedba eksperimentalno određene Caco-2 permeabilnosti s *in silico* izračunatim vrijednostima

Ispitivanjem odnosa eksperimentalno određene Caco-2 permeabilnosti i predviđene računalnim programima, utvrđena je značajna razlika između eksperimentalnih rezultata i rezultata predviđenih preADMET računalnim programom. Bolja interkorelacija je dobivena s pkCSM i admetSAR računalnim programima (Slika 15). Nadalje, relativne standardne devijacije su bile više za sve glikozide, genistein-4,7-dimetil eter i prunetin, dok su za ostale aglikone predviđene vrlo slične vrijednosti.

Ispitivanjem odnosa eksperimentalno određene Caco-2 permeabilnosti i predviđene humane intestinalne apsorpcije pkCSM i preADMET računalnim programima nije utvrđena značajna korelacija.

Ispitivanjem odnosa eksperimentalno određene Caco-2 permeabilnosti i predviđene log *P* vrijednosti ACD/Labs računalnim programom, dobivena je umjerena korelacija (r = 0,60).



Slika 15. Caco-2 permeabilnost [log(cmx10^{-6}/s)] ispitivane skupine fitoestrogena određeno eksperimentalno (Caco-2 Exp) i Caco-2 permeabilnost [log(cmx10^{-6}/s)] izračunata računalnim programima pkCSM, admetSAR i preADMET (brojevi predstavljaju fitoestrogene sljedećim redom: 1, biokanin A; 2, daidzein; 3, formononetin; 4, genistein; 5, genistein-4,7-dimetileter; 6, prunetin; 7, 3,4,7-trihidoksi izoflavon; 8, 4,6,7- trihidoksi izoflavon; 9, 4,6,7- trimetoksi izoflavon; 10, daidzin; 11, genistin; 12, ononin; 13, sisotrin; 14, kumestrol; 15, kumestrol dimetileter.

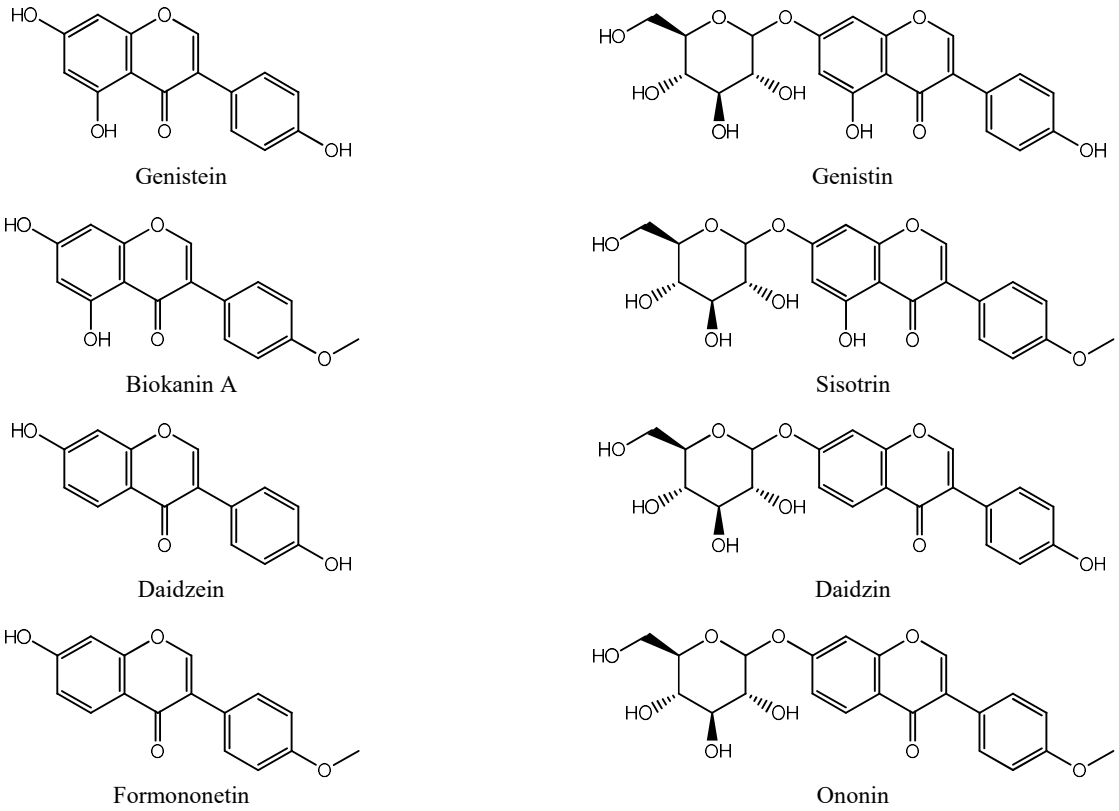
4.2. RAZVOJ UHPLC METODE ZA ISTOVREMENU ANALIZU AGLIKONA I GLIKOZIDA IZOFLAVONA

U svrhu istovremene kvantifikacije skupine izoflavona, u obliku aglikona i glikozida, razvijena je nova i brza UHPLC-DAD metoda. Odabrani spojevi uključuju četiri aglikona (geinstein, biokanin A, daidzein i formononetin) i četiri njihova glikozida (genistin, sisotrin, daidzin i ononin) iz grupe izoflavona (Slika 16) vrlo različitih lipofilnosti koje su prethodno određene opisanim metodama u poglavlju 4.1.1.

Metoda je razvijena pristupom kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) uz pomoć DryLab® računalnog programa s kojim je istražen utjecaj nepokretne faze, gradijentnog vremena, temperature kolone i pH vrijednosti eluenta A u pokretnoj fazi.

Nova metoda je validirana prema ICH Q2(R1) smjernicama i primjenjena je za kvantifikaciju odabranih izoflavona u pripravcima, različitih farmaceutskih oblika, namijenjenim ženama u postmenopauzi.

Dodatno uz identifikaciju primjenom vanjskog standarda, identitet odabrane skupine izoflavona u vrlo složenom matriksu uzorka potvrđen je korištenjem dvodimenzionalne tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnute s masenim detektorom (2D-UHPLC-MS).



Slika 16. Strukture izoflavona

4.2.1. p*K*a i log *D* parametri predviđeni računalnim programom

Konstantu disocijacije (p*K*a) i logaritamsku vrijednost koeficijenta distribucije pri određenoj pH vrijednosti (log *D*) pojedinog analita potrebno je odrediti na samom početku razvoja metode. Na taj način se može odabrati odgovarajuća pH vrijednost eluenta A pokretne faze, kako bi se osigurala selektivnost metode i dobar oblik pikova.

pKa i log D vrijednosti svakog izoflavona su izračunate korištenjem računalnog programa ChemAxon. Najniže izračunate p*K*a vrijednosti su dobivene za aglikone, p*K*a = 6,5, stoga će se odabrati pH vrijednost eluenta A za najmanje jednu pH jedinicu udaljenu od p*K*a vrijednosti. Za sve ispitivane izoflavone, ravan dio log D krivulje je imao pozitivnu vrijednost pri pH nižem od 5,0, što upućuje na stabilno vrijeme zadržavanja u tom području kao funkcije pH vrijednosti. S obzirom na navedeno, odabrane su tri pH vrijednosti ispod 5,0 za eksperimente razvoja metode.

4.2.2. Razvoj UHPLC-DAD metode primjenom QbD pristupa

Razvoj brze i robusne UHPLC metode za istovremenu analizu aglikona i glikozida izoflavona vrlo različitih fizikalno-kemijskh parametara predstavlja izazovan zadatak. Stoga je primijenjen QbD pristup tijekom razvoja i optimizacije metode. Ključni parametar QbD pristupa je kreiranje vizualnog dizajna u prostoru (*Design Space*) unutar kojeg je metoda robusna [91,94]. Osnovni cilj je bio razviti i optimizirati UHPLC metodu s kratkim vremenom analize koja omogućuje razlučivanje Rs > 2,0 između pikova svih osam izoflavona. Određeni su sljedeći kritični parametri koji utječu na razlučivanje: nepokretna faza, gradijentno vrijeme (t_G), temperatura kolone (T) i pH vrijednost eluenta A.

Odabrane su tri kolone različitih selektivnosti i hidrofobnosti kako bi se istražio utjecaj nepokretne faze. Ispitane su sljedeće kolone: Zorbax RRHD Bonus RP Amide, Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 te Cortecs UPLC C18+.

DryLab® može biti primijenjen za formiranje 1-, 2- ili 3-dimenzionalnog modela promijenom 1, 2 ili 3 parametra kako bi predvidio vrijeme zadržavanja ispitivanih spojeva pri različitim uvjetima i kako bi se izračunalo kritično razlučivanje između pojedinih kromatografskih pikova. U ovom radu je primijenjen 3D model gdje su ispitani parametri gradijenta pokretne faze, temperature i pH te su podatci od 12 provedenih eksperimenata na svakoj koloni korišteni za predviđanje DryLab® računalnim programom. Odabir eksperimenata je temeljen na DryLab® preporukama:

- gradijentna vremena bi se trebala razlikovati za faktor 3, međutim, u ovom slučaju je veći faktor odabran zbog razlika u kemijskom sastavu nepokretnih faza kako bi se osiguralo razlučivanje svih osam analita bez probnih analiza. Odabrana su gradijentna vremena t_{G1} = 3 min i t_{G2} = 20 min.
- temperature kolona bi se trebale razlikovati za 20 °C – 40 °C, uzimajući u obzir najvišu dopuštenu temperaturu za pojedinu kolonu, što je u ovom slučaju 45 °C za Cortecs i 60 °C za Bonus i Eclipse Plus kolonu. Zbog navedenoga, odabrane su razlike od 20 °C za Cortecs kolonu (T_1 = 20 °C, T_2 = 40 °C) i 30 °C za preostale kolone (T_1 = 30 °C, T_2 = 60 °C).
- pH intervali bi se trebali razlikovati za najviše 1 pH jedinicu. Prema tome su odabrane 3 pH vrijednosti eluenta A s najvišom vrijednosti 5,0 poštivajući predviđene p*K*a i log *D* vrijednosti analita (pH_1 = 3,0, pH_2 = 4,0, pH_3 = 5,0).

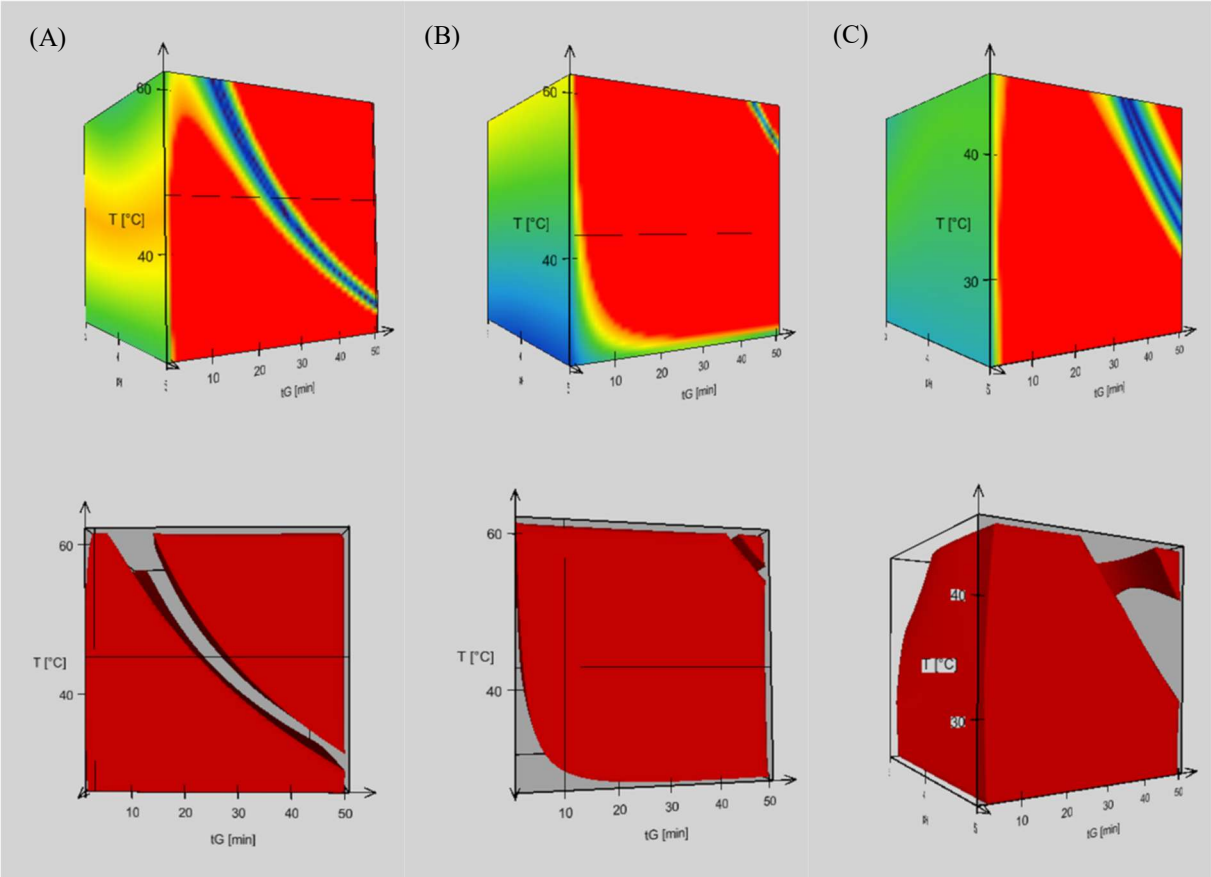
U računalni program su unešeni parametri instrumenta na kojem su napravljena mjerenja poput mrtvog volumena, volumena kolone i volumena injektiranja. Dodatno su unešene

dimenzije i karakteristike kolone na kojima su napravljena mjerenja. Nakon toga su unešeni kromatogrami provedenih eksperimenata te su uspoređeni s DryLab® predviđenim kromatogramima u PeakMatch modulu i uspješno verificirani.

Za svaku kolonu je generiran trodimenzionalni model (3-D) kocke. Vrijednost kritičnog razlučivanja je prikazan bojama. Tople crvene boje predstavljaju visoke vrijednosti razlučivanja (R_S > 2,0), a hladne plave boje predstavljaju niske vrijednosti razlučivanja ili koeluaciju pikova (R_S = 0,0) [140]. Na slici 12 su prikazane 3-D kocke za sve tri kolone iz kojih su vidljiva prostrana područja crvene boje gdje su vrijednosti razlučivosti veće od 2,0. Crvena područja prikazuju zonu robusnosti metode, odnosno višedimenzionalno područje unutar kojega varijacije kritičnih procesnih parametara ne uzrokuju značajne promjene kritičnih značajki kvalitete.

Na Eclipse Plus koloni je za sve analite postignuto potpuno razdvajanje pikova u svakom od 12 eksperimenata. Redosljed eluiranja pikova bio je jednak tijekom eksperimenata, osim tijekom gradijentnog vremena od 20 min i temperature kolone 60 °C pri sve tri ispitivane pH vrijednosti. Tijekom tih analiza, dva para pikova su mijenjala redosljed eluiranja ovisno o temperaturi i gradijentnom vremenu; ononin - sisotrin i daidzein - genistein. Navedena koeluiranja pikova se mogu prepoznati kao plava područja unutar kocke (Slika 17 (A)), gdje nije dobiveno zadovoljavajuće razlučivanje između jednog od navedenih parova pikova.

Tijekom svih 12 eksperimenata na Bonus koloni, dobivena su zadovoljavajuća razlučivanja za sve ispitivane glikozide. Međutim, od aglikona, genistein i formononetin su koeluirali pri temperaturi kolone od 30 °C i oba gradijentna vremena pri sve tri ispitivane pH vrijednosti. Redosljed eluiranja je ostao isti kod svih analiza.



Slika 17. Grafički prikazi 3-D modela, kocke i zone rousnosti, predviđenih računalnim programom DryLab®, za ispitivanu skupinu fitoestrogena. x, y i z osi predstavljaju gradijentno vrijeme tG[min], temperaturu kolone T[ºC] i pH eluenta A na tri kolone: (A) Zorbax RRHD Eclipse Plus C18, (B) Zorbax RRHD Bonus RP Amide i (C) Cortecs UPLC C18+

Na Cortecs koloni su dobivena zadovoljavajuća razlučivanja za sve ispitivane glikozide i aglikone tijekom 9 eksperimenata. Pri gradijentnom vremenu od 20 min i temperaturi kolone 60 °C, pri sve tri ispitivane pH vrijednosti, dva para pikova su koeluirala: ononin - daidzein i sisotrin - genistein.

Iz dobivenih grafičkih prikaza 3-D modela, na sve tri kolone, moguće je odabrati veliki broj potencijalnih radnih točaka. Također je eksperimentima razjašnjeno o kojim faktorima ovisi vrijeme zadržavanja analita. Temperatura kolone i gradijentno vrijeme utječu na vrijeme zadržavanja analita, dok pH raspon od 3 do 5 nema utjecaja na vrijeme zadržavanja analita. Vizualnim pregledom dobivenih 3-D modela, imajući u vidu glavne zadane ciljeve razvoja brze i robusne UHPLC metode, Eclipse Plus kolona je odabrana zbog malo šireg robusnog prostora u području kraćeg gradijentnog vremena i također nešto bolje simetrije pikova.

U svrhu dodatne verifikacije odabranog modela, pored usporedbe pikova u PeakMatch modulu, eksperimentalna verifikacija je provedena primjenom predviđene analize računalnim programom te usporedbom između *in silico* i eksperimentalno dobivenog rezultata. Iz dobivenog grafičkog prikaza, odabrana je optimalna točka gradijentnog vremena 10 min (5-90% eluenta B), temperature kolone 45 °C pri pH 3,5. Napravljena je procjena usporedbom *in silic*o predviđenih i eksperimentalno određenih vremena zadržavanja (Tablica 19). Dobivena eksperimentalna vremena zadržavanja su se značajno slagala s onima dobivenim *in silico*, gdje je dobivena najviša razlika od 2,61% što se slaže s prethodno objavljenim rezultatima za DryLab® [141].

Tablica 19. Ispitivani fitoestrogeni i izračunate greške vremena zadržavanja između *in silico* predviđenih računalnim programom (DryLab®) i eksperimentalno određenih

Analit	t_R (min)		greška[a] (%)	t_R (min)		greška[a] (%)
	DryLab (t_G 10 min)	eksperiment (t_G 10 min)		DryLab (t_G 2 min)	eksperiment (t_G 2 min)	
Daidzin	1,53	1,57	2,61	0,67	0,66	- 0,90
Genistin	1,92	1,96	2,08	0,77	0,78	1,04
Ononin	2,52	2,57	1,98	0,92	0,94	1,85
Sisotrin	2,60	2,65	1,92	0,97	0,99	2,37
Daidzein	3,07	3,13	1,95	1,05	1,07	1,90
Genistein	3,21	3,25	1,25	1,12	1,15	2,77
Formononetin	3,83	3,86	0,78	1,27	1,31	3,07
Biokanin A	4,61	4,64	0,65	1,46	1,50	2,74

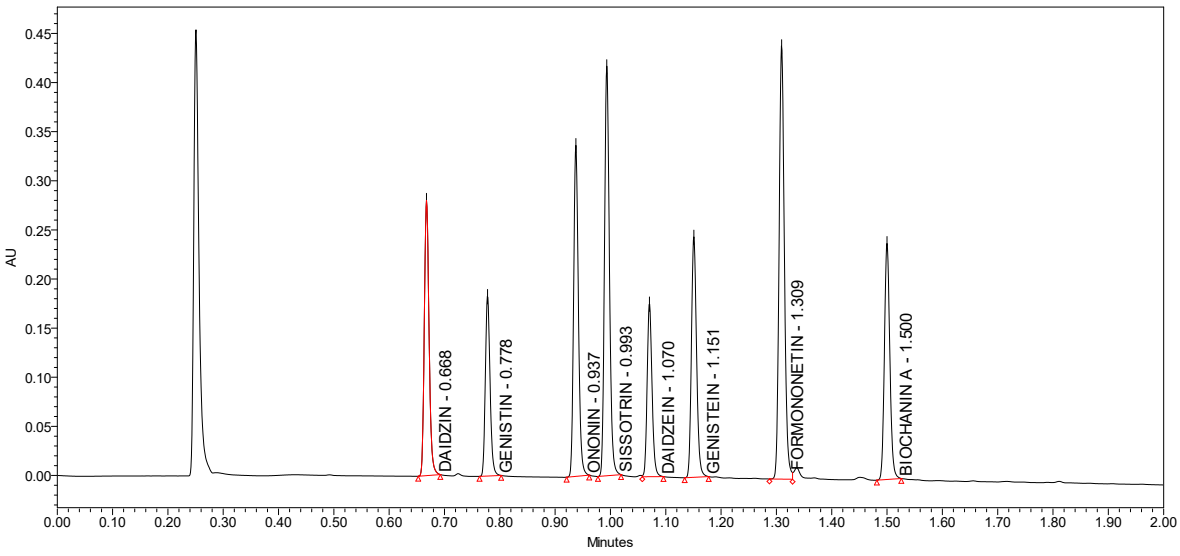
[a] greška (%) = [(eksperiment – DryLab)/DryLab] x 100

Nakon uspješne verifikacije modela, inicijalno je odabrana radna točka s brzim gradijentnim vremenom od 3 min, temperaturom kolone 45 °C pri pH 3,5 te je dobiveno predviđeno razlučivanje 3,4 između kritičnog para pikova ononina i sisotrina. S obzirom na dobiveno razlučivanje koje je znatno više od zadanog zahtjeva razlučivanja od 2,0, postojalo je dovoljno mjesta za dodatnu optimizaciju gradijentnog vremena uz pomoć DryLab®računalnog programa i skraćivanja vremena analize. Time su odabrani konačni radni uvjeti na Eclipse Plus koloni: linearno gradijentno vrijeme 0,0 - 2,0 min, 10-95% eluenta B, temperatura kolone 45 °C pri pH 3,5 (Tablica 8, poglavlje 3.3.7.), uz dobiveno predviđeno razlučivanje od 2,6 između

ononina i sisotrina. Napravljena je verifikacija modela provođenjem eksperimenta pri odabranim radnim uvjetima te su uspoređena eksperimentalno dobivena vremena zadržavanja s *in silico* predviđenima gdje je dobivena najveća razlika od 3,07% (Tablica 19).

Slika 18 prikazuje reprezentativni kromatogram otopine radnog standarda koncentracije 30,0 μg mL^{-1} svih osam odabranih izoflavona analiziranih novom UHPLC metodom. Iz kromatograma se može vidjeti da su dobivena zadovoljavajuća razlučivanja između svih parova pikova. Kritični par pikova je bio između ononina i sisotrina s najniže dobivenim razlučivanjem od 3,6, koja je viša od zadane najniže vrijednosti (2,0).

Kako je očekivano, s obzirom na određene lipofilnosti fitoestrogena [142], izoflavoni s polarnom glikozidnom skupinom su eluirali prije aglikona zbog njihove niže lipofilnosti. Daidzin i genistin su prvi eluirali budući da se samo hidrofilne hidroksi skupine nalaze u strukturama molekula, iako bi se očekivalo da genistin eluira prvi jer sadrži jednu hidroksi skupinu više od daidzina. Zatim eluiraju ononin i sisotrin kao metoksilirani analozi daidzina i genistina. Nakon glikozida, aglikoni eluiraju očekivanim redoslijedom. Prvo genistein s tri hidroksi skupine kao najhidrofilniji, zatim daidzein s dvije hidroksi skupine, biokanin A s jednom metoksi i dvije hidroksi skupine i zadnji formononetin, kao najlipofilniji, s jednom metoksi i jednom hidroksi skupinom.



Slika 18. Kromatogram smjese standarda skupine izoflavona dobiven s DAD detektorom

Razvijena UHPLC metoda sposobna je učinkovito razlučiti svih osam odabranih izoflavona tijekom samo 1,6 min što omogućuje kvantifikaciju aglikona i glikozidnih oblika u vrlo kratkom vremenu uz nisku potrošnju otapala.

4.2.3. Validacija UHPLC-DAD metode

Razvijena UHPLC-DAD metoda za kvantifikaciju osam odabranih izoflavona je validirana u skladu sa ICH smjernicama [143]. Validacijom su potvrđena sljedeća svojstva metode: selektivnost, linearnost, granice kvantifikacije i dokazivanja, točnost, preciznost, robusnost i stabilnost otopine.

Selektivnost

Selektivnost nove UHPLC metode potvrđena je korištenjem pripravka kao slijepog uzorka koji ne sadrži ispitivane izoflavone. Slijepi uzorak je pripremljen u koncentraciji 50 mg mL^{-1} te je dodana otopina radnog standarda svih osam izoflavona kako bi se postigla konačna koncentracija 30 µg mL^{-1}. Selektivnost metode je potvrđena s obzirom da je dobiveno potpuno razlučivanje svih osam izoflavona u prisutnosti slijepog uzorka, bez interferencija na mjestu eluiranja analita.

Linearnost

Linearnost metode za osam ispitivanih izoflavona je ispitana u rasponu od 0,25 µg mL^{-1} – 70,0 µg mL^{-1}. Standardne otopine za linearnost su pripremljene razrjeđenjem temeljnih standardnih otopina na sedam koncentracijskih razina dodatkom acetonitrila. Dobivena je značajna korelacija između površine pikova i odgovarajućih koncentracija analita s koeficijentima korelacije u rasponu od 0,9995 do 1,0000 za sve ispitivane izoflavone (Tablica 20).

Granica kvantifikacije i dokazivanja

Granice kvantifikacije (LOQ) i granice dokazivanja (LOD) su određene za sve analite kao koncentracije pri kojima je omjer visine signala i šuma iznosio $s/n \geq 10$, odnosno $s/n \geq 3$. LOQ je za sve analite jednak i iznosi 0,2 µg mL^{-1}, dok LOD iznosi 0,1 µg mL^{-1} za sve analite Tablica 20).

Tablica 20. Kalibracijski parametri te granice dokazivanja i određivanja nove UHPLC metode

Analit	Linearno područje (μg mL^{-1})	Koeficijent korelacije (*r*)	Odsječak (A)	Nagib (B)	LOD (μg mL^{-1})	LOQ (μg mL^{-1})
Daidzin	0,2 - 70	0,9997	3043,6	$4,4 \cdot 10^6$	0,1	0,2
Genistin	0,2 - 70	1,0000	1134,8	$3,8 \cdot 10^6$	0,1	0,2
Ononin	0,2 - 86	0,9999	1062,6	$4,5 \cdot 10^6$	0,1	0,2
Sisotrin	0,2 - 70	0,9999	763,9	$3,5 \cdot 10^6$	0,1	0,2
Daidzein	0,2 - 67	0,9999	1137,5	$9,6 \cdot 10^6$	0,1	0,2
Genistein	0,2 - 70	0,9999	1069,0	$6,5 \cdot 10^6$	0,1	0,2
Formononetin	0,2 - 71	0,9999	1223,7	$8,8 \cdot 10^6$	0,1	0,2
Biokanin A	0,2 - 72	0,9995	3448,0	$5,2 \cdot 10^6$	0,1	0,2

Točnost

Točnost metode je potvrđena dodavanjem otopine standarda u otopinu kompozitnog uzorka nakon provedene ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji. Određivanje je provedeno na tri koncentracijske razine, 0,2 μg mL^{-1} (LOQ), 30,0 μg mL^{-1} i 70,0 μg mL^{-1} u triplikatu. Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost analitičkog prinosa (*engl. Recovery*) u tablici 21.

Preciznost

Preciznost metode je potvrđena zasebnom pripremom šest otopina slijepog uzorka uz dodavanje otopine standarda osam ispitivanih izoflavona u koncentraciji 30,0 μg mL^{-1}. Dobivene su vrijednosti relativne standardne devijacije (RSD) za svih osam izoflavona unutar 1,02% - 2,01%. Provedena je i srednja preciznost metode pripremom dodatnih šest priprema od strane drugog analitičara, mjereno drugi dan na drugom sustavu. Najviša dobivena RSD vrijednost je bila 0,63% što ukazuje na visoku preciznost metode (Tablica 22).

Tablica 21. Točnost nove UHPLC metode za određivanje fitoestrogena

Analit	Koncentracija (µg/mL)	Analitički prinos (%) ± RSD
Daidzin	0,2	100,7 ± 1,0
	30	101,6 ± 0,2
	70	100,5 ± 0,1
Genistin	0,2	101,3 ± 1,2
	30	101,8 ± 0,5
	70	99,9 ± 0,5
Ononin	0,2	100,9 ± 1,4
	30	97,5 ± 0,9
	86	99,2 ± 0,8
Sisotrin	0,2	100,1 ± 1,1
	30	99,9 ± 0,2
	70	101,2 ± 0,2
Daidzein	0,2	98,0 ± 0,9
	30	98,2 ± 0,9
	67	100,9 ± 0,3
Genistein	0,2	100,6 ± 1,1
	30	98,7 ± 1,1
	70	101,1 ± 0,5
Formononetin	0,2	99,0 ± 1,2
	30	100,5 ± 0,7
	71	98,9 ± 0,5
Biokanin A	0,2	102,4 ± 1,0
	30	99,0 ± 1,0
	72	101,4 ± 0,2

Tablica 22. Preciznost nove UHPLC metode za određivanje fitoestrogena

Analit	Preciznost (RSD%)	Srednja preciznost (RSD%)
Daidzin	1,51	0,18
Genistin	1,25	0,52
Ononin	1,12	0,41
Sisotrin	1,84	0,63
Daidzein	1,50	0,43
Genistein	2,01	0,20
Formononetin	1,32	0,47
Biokanin A	1,02	0,53

Robusnost

U svrhu ispitivanja robusnosti metode, promijenjeni su sljedeći parametri: protok pokretne faze (0,4 mL min^{-1} i 0,6 mL min^{-1}), pH eluenta A (3,25 i 3,75) i temperatura kolone (40 °C i 50 °C). Tijekom svih ispitivanja u izmijenjenim uvjetima dobivene su zadovoljavajuće vrijednosti razlučivanja veće od 1,5 između svih izoflavona. Najniža vrijednost razlučivanja 1,7 dobivena je za ononin i daidzein pri temperaturi kolone 50 °C ili pri protoku pokretne faze 0,6 mL min^{-1}), što ukazuje na prihvatljivu robusnost metode i slaže se s in *silico* predviđenim rezultatima.

Stabilnost

Stabilnost otopina je ispitana na kompozitnom uzorku i standardnoj otopini nakon 24 h na sobnoj temperaturi. Rezultati su pokazali da su otopine stabilne s izračunatim omjerima između inicijalnih površina pikova i površina nakon 24 h od 0,97 – 1,03. Stabilnost otopina je potvrđena unutar 24 h bez značajnog raspada analita.

4.2.4. Analiza pripravaka s fitoestrogenima primjenom nove UHPLC-DAD metode

Novorazvijena metoda je primijenjena za analizu osam ispitivanih izoflavona u pripravcima s fitoestrogenima namijenjenima ženama u postmenopauzi (Tablica 23). Svi su komercijalno dostupni, a odabrani su proizvodi različitih proizvođača kako bi se osigurao reprezentativan pregled uzoraka s tržišta. Pripravci analizirani u ovom radu su obuhvaćali različite farmaceutske oblike, što je uključivalo tablete i kapsule. Proizvodi su sadržavali biljni materijal kao što su ekstrakt soje i/ili ekstrakt crvene djeteline kao izvore izoflavonoida, a neki od njih su dodatno sadržavali i druge biljne materijale, vitamine i minerale.

Tablica 23. Uzorci analiziranih pripravaka s fitoestrogenima

Naziv proizvoda	Proizvođač	Formulacijski oblik	Sastav
Pausa	Specchiasol S.r.l, Bussolengo, Italy	kapsula	sjeme soje (*Soya hispida*) d.e. titrirano na 40% izoflavona (34.5 mg) 86 mg; crvena djetelina (*Trifolium pratense* L.) titrirana na 8% izoflavona (6 mg) 75 mg
Meno-Guide	Erba VitaS.p.A., San Marino, Italy	Vegetal jelly VCAPS ®	ekstrakt sjemena soje (*Glycine max*) sjeme (standardiziranog na 40% - 7 mg izoflavona, kao genistein => 36% (6mg))
Soy Flavon ®	Dietpharm, Rakitje, Croatia	kapsula	ekstrakt sjemena soje - Novasoy (*Glycine max*) 82 mg sadrži 32 mg izoflavona
Menopause	Helvetia Direct Marketing s.r.o., Praha, Czech Republic	tableta	ekstrakt crvene djeteline - najmanje 20% izoflavona (10 mg) 50 mg
Maxi Life Mega Soy	Twinlab, Hauppauge, NY, USA	kapsula	ekstrakt sjemena soje (Novasoy) 200 mg (sadrži 40% izoflavona - 80 mg izoflavona, od toga 40 mg genistina, 31 mg daidzina i 9 mg glicitina)
PhytoEstrogen one daily	Solaray, Park City, UT, USA	kapsula	koncentrat sjemena soje (*Glycine max*) (zajamčeno 60 mg [40%] ukupnih izoflavona, od toga 33 mg genistin i 25.5 mg daidzin) 150 mg
Soy Isoflavones	Natural Wealth, Bohemia, NY, USA	kapsula	750 mg koncentrata soje - sadrži 3% izoflavona: daidzin i daidzein 12 mg, glicitin i glicitein 7 mg, genistin i genistein 2.5 mg
Menopause Relief	Natural Wealth, Bohemia, NY, USA	tableta	koncentrat soje (standardiziran na 40% izoflavona - 21 mg izoflavona) 52.3 mg
Feminal	Jadran - Galenski Laboratorij, Rijeka, Croatia	kapsula	100 mg ekstrakta crvene djeteline standardiziran na 40% izoflavona
Red Clover Blossom	Solaray, Park City, UT, USA	kapsula	cvijet crvene djeteline (*Trifolium pratense*) 375 mg
Herbal Female Complex	Solgar, Leonia, NJ, USA	kapsula	ekstrakt sojinih klica, nije genetski modificirano (2% izoflavona) 100mg

4.2.4.1. Ekstrakcijska učinkovitost

S obzirom na različitost svojstava ispitivane skupine izoflavona i zbog vrlo složenog sastava pripravaka, ispitana je ekstrakcijska učinkovitost. Ekstrakcijska učinkovitost je provedena na kompozitnom uzorku koji predstavlja reprezentativni uzorak pripremljen od jednakih dijelova svakog pojedinog pripravka. Otopini kompozitnog uzorka prije provedene ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji dodana je otopina standarda konačne koncentracije 30,0 μg mL^{-1}. Eksperiment je proveden u triplikatu, a rezultati su iskazani kao srednja vrijednost analitičkog prinosa (%) u tablici 24. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je ekstrakcijska učinkovitost vrlo visoka. Iako je sastav matriksa pripravaka vrlo složen, tijekom analize nije bilo interferencija s analitima nakon provedene ekstrakcije.

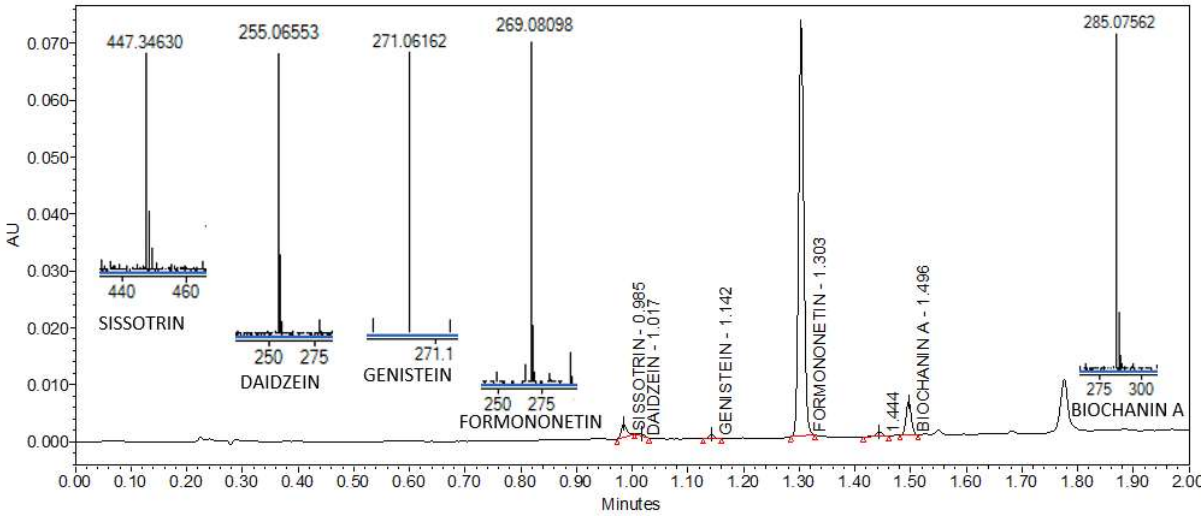
Tablica 24. Ekstrakcijska učinkovitost iskazana kao analitički prinos

Analit	**Analitički prinos nakon provedene ekstrakcije (RSD%)**
Daidzin	100,50
Genistin	100,03
Ononin	98,40
Sisotrin	100,11
Daidzein	99,51
Genistein	99,40
Formononetin	99,23
Biokanin A	100,93

4.2.4.2. Identifikacija izoflavona u složenom matriksu pripravaka s fitoestrogenima primjenom 2D-UHPLC-MS metode

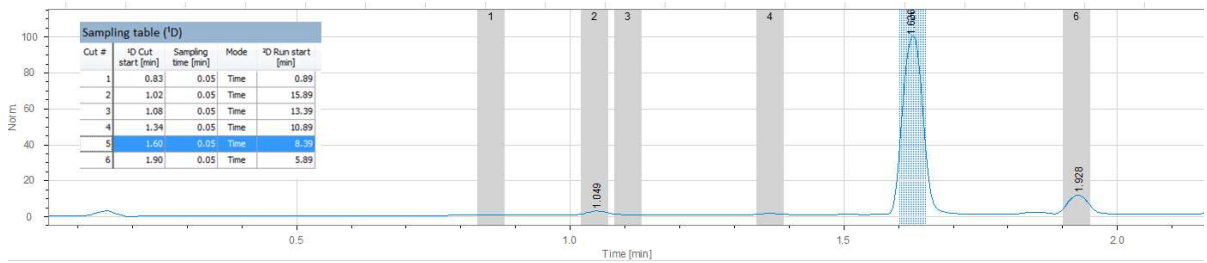
Identifikacija izoflavona prisutnih u pripravcima je provedena usporedbom vremena zadržavanja analita s otopinom standarda. Međutim, zbog složenog matriksa ispitivanih uzoraka dodatno je u svrhu identifikacije korištena i 2D-UHPLC-MS metoda (Slike 19 i 20). Maseni detektor je u ovom slučaju izrazito pogodan zbog puno bolje osjetljivosti i specifičnosti

u usporedbi s DAD detektorom. Maseni detektor je korišten za potvrdu očekivanih masa analita s obzirom na vrijeme zadržavanja analita na koloni te s obzirom na redosljed eluiranja. U slučaju potencijalnog kromatografskog preklapanja pikova određenih sastavnica iz pripravaka s analitima, uz pomoć masenog detektora moguće je izolirati molekulske ione analita i time potvrditi identitet analita sa značajno većom sigurnosti.

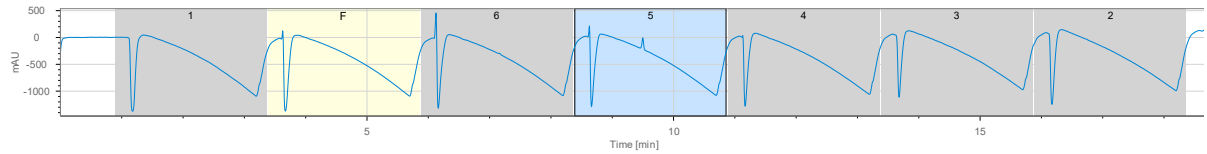


Slika 19. Kromatogram pripravka s pripadajućim MS spektrima aglikona i glikozida identificiranih u Uzorku 5

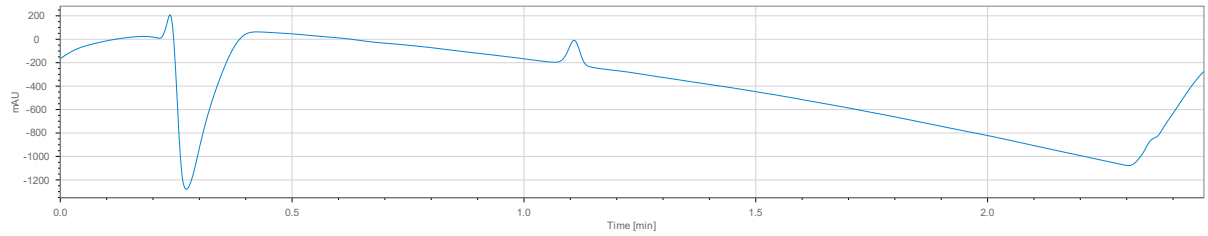
(A)



(B)



(C)



Slika 20. Kromatogram pripravka Uzorka 5: 1D kromatogram s označenih šest dijelova injektiranih u drugu dimenziju, od kojih je prvi dio slijepa proba i ostalih pet su izoflavoni (A); pregled svih 2D kromatograma šest odabranih dijelova analiziranih u drugoj dimenziji, žuti dio je ispiranje (B); 2D kromatogram petog dijela – formononetin, označen plavom bojom na A i B kromatogramima (C)

Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija odabrana je zbog mogućnosti odvajanja komponenata vrlo složenih smjesa, stoga se pokazala kao tehnika izbora za analizu pripravaka s vrlo složenim matriksom. Također, fosfatni pufer eluenta A nove UHPLC metode nije kompatibilan s MS detektorom zbog precipitacije fosfatnih soli u izvoru detektora, što je dodatni razlog odabira 2D-UHPLC-MS tehnike.

U prvoj dimenziji je postavljena nova UHPLC metoda razvijena QbD pristupom sa Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 kolonom koja sadrži dvostruko prekrivene dimetil-*n*-oktadecilsilanolne skupine (C18) vezane za silikagel. U drugoj dimenziji kao eluent A je korištena otopina 0,1% mravlje kiseline, koja je pogodna za primjenu sa masenim detektorom zbog svoje hlapljivosti. Kao nepokretna faza je upotrebljena kolona različitog kemijskog sastava od one u prvoj dimenziji, Zorbax RRHD Eclipse Plus Phenyl Hexyl, koja sadrži gusti

monosloj dimetil-fenil-heksilsilanolne skupine kemijski vezan za silikagel. Kromatografija na Phenyl Hexyl nepokretnoj fazi predstavlja ortogonalnu selektivnost kromatografiji na C18 nepokretnoj fazi. Ortogonalnost podrazumijeva drugačije mehanizme razdvajanja od onih na kojima se bazira inicijalna tehnika, što upravo i predstavlja razlika selektivnosti i hidrofobnosti navedene dvije kolone. Primjenom ortogonalnog razdvajanja povećava se vjerojatnost određivanja svih analita u složenim uzorcima [49]. kako bi se postigla ortogonalnost i dodatno osiguralo razdvajanje analita od matriksa. Uzorci su analizirani prema parametrima metoda opisanim u poglavlju 3.3.8.

4.2.4.3. Kvantitativno određivanje odabranih izoflavona u uzorcima pripravaka primjenom UHPLC-DAD metode

U tablici 25 prikazani su rezultati analize dvanaest različitih pripravaka s fitoestrogenima novom UHPLC-DAD metodom razvijenom QbD pristupom. Određen je sadržaj pojedinih izoflavona u obliku aglikona i glikozida u svakom ispitivanom proizvodu. Dodatno je izračunat postotak pronađenog u odnosu na deklarirani sadržaj ukupnih izoflavona. Uzorak 11 nije imao deklariran sadržaj na proizvodu.

Analizom je nađena velika varijabilnost između pronađenih i deklariranih vrijednosti fitoestrogena u pripravcima. Postotak pronađenog u odnosu na deklarirani sadržaj ukupnih izoflavona kretao se od 23,1% do 282,5%. Od šest proizvoda u kojima je nađena značajno manja količina izoflavona, u pet proizvoda su identificirani glikozidi kao većinske komponente. To je važno istaknuti s obzirom na vrlo veliku razliku u bioraspoloživosti izoflavona u obliku glikozida i aglikona, gdje šećerna skupina glikozida smanjuje lipofilnost molekule i tek nakon hidrolize u usnoj šupljini ili tankom crijevu djelovanjem enzima može doći do učinkovite apsorpcije u obliku aglikona. Uz dobiveni niski sadržaj izoflavona u pripravcima u usporedbi s deklariranim sadržajem, izoflavoni u obliku glikozida dodatno smanjuju bioraspoloživu količinu.

U tablici 25 prikazana je i ukupna količina izoflavona prema preporučenoj dnevnoj dozi proizvođača. Očigledno je da će se konzumiranjem različitih proizvoda unijeti u organizam značajno različite količine izoflavona.

Tablica 25. Rezultati sadržaja ispitivanih aglikona i glikozida izoflavona u uzorcima pripravaka analizirani UHPLC-DAD metodom.

Uzorak	Daidzin	Genistin	Ononin	Sisotrin	Daidzein	Genistein	Formononetin	Biokanin A	Izoflavoni	Izoflavoni deklarirano	Ukupna količina izoflavona[a]	Nađeno / deklarirano
					(mg/g)				(mg/g)	(mg/g)	(mg)	(%)
1	1.89				33.23	9.04	3.53		47.69	40.20	30.15	118.63
2	0.68	0.11		1.38	0.04	1.81	2.39	1.10	7.51	5.40	4.75	139.07
3	9.67	2.06			0.56				12.29	35.63	9.31	34.49
4	12.69	14.35			0.53				27.57	37.26	23.68	73.99
5					0.71	0.65	8.37	1.50	11.23	10.07	11.16	111.52
6	34.89	43.46			1.00				79.35	167.40	37.92	47.40
7	29.36	47.46			4.53	0.80			82.15	81.08	60.79	101.32
8	8.00	1.78	0.16	0.19					10.13	20.93	7.01	48.40
9	7.60	9.25							16.85	33.88	10.45	49.73
10				8.43			26.23	22.42	57.08	247.07	9.24	23.10
11		0.95	0.41	1.22		0.22	0.57	0.84	4.21	-	-	-
12			8.53						8.53	3.02	16.96	282.45

[a] ukupna količina izoflavona u preporučenoj dnevnoj dozi

U svrhu ispitivanja ujednačenosti kvalitete pripravaka s fitoestrogenima, analizirane su različite serije istog proizvoda. Dobivene su razlike od 2,4% do 22,9%, ali su također neočekivano dobivene visoke razlike u sadržaju izoflavona između dvije serije istog proizvoda u dva slučaja. Druga je serija uzorka 8 sadržavala dva puta manju količinu daidzina, dok ononin i sisotrin nisu uopće dokazani što daje razliku u sadržaju izoflavona od 51,8%. Također, za drugu seriju uzorka 10 dobivena je razlika od 85,2% u usporedbi s prvom serijom. Nađen je trinaest puta viši sadržaj biokanina A (281,0 mg/g), tri puta viši sadržaj formononetina (75,93 mg/g), dok sisotrin nije dokazan, a dodatno je nađena prisutnost ononina (5,20 mg/g) i daidzeina (22,77 mg/g). Nadalje, obje su serije uzorka 12 sadržavale gotovo tri puta viši sadržaj od deklariranog što dovodi u pitanje sigurnost pacijenta zbog visokog unosa izoflavona.

Sadržaji samo tri uzorka su se nalazila u području od 80% do 120% vrijednosti nađenog/deklariranog sadržaja što svakako ukazuje na nedostatak standardizacije i kontrole kvalitete pripravaka s fitoestrogenima.

4.2.5. Usporedba nove UHPLC-DAD metode s postojećim metodama za određivanje fitoestrogena

RP-HPLC je najčešće korištena analitička tehnika za određivanje izoflavona u hrani, pripravcima, biljnim ekstraktima i u biološkim uzorcima [11,108-110,144]. U literaturi je opisano nekoliko UHPLC metoda za određivanje izoflavona koji su ispitivani u ovom radu [111-122]. Međutim, vrijeme analize je kod šest opisanih metoda trajalo čak 10 do 20 min [111-116]. Nadalje, većina opisanih metoda razvijena je samo u svrhu kvantitativnog određivanja izoflavona u obliku aglikona pa je analizi prethodio dugotrajan postupak hidrolize glikozidnih oblika izoflavona [112, 118-120].

Samo tri brze UHPLC metode su opisane u literaturi s vremenom analize 5 min ili manje. Magiera i suradnici su razvili brzu UHPLC metodu s UV detekcijom u trajanju od 5 min, za koju je napravljena cjelokupna validacija [119]. Međutim, samo aglikoni genistein, daidzein i biokanin A su analizirani u biljnim pripravcima, dok glikozidne forme nisu uzete u obzir iako se većina izoflavona u prirodi nalazi u tom obliku. Klejdus i suradnici su opisali brzu HPLC-DAD metodu spregnutu s ESI-MS detektorom u svrhu razdvajanja izoflavona u obliku aglikona i glikozida [120]. Metoda je primijenjena samo u analizi soje i biljnih ekstrakta, i to bez potpune validacije. Isti autori su kasnije razvili niz metoda na C18 koloni i/ili polarnijim cijanopropil i fenil nepokretnim fazama za UHPLC određivanje izoflavona i fenolnih kiselina s UV

detekcijom [121]. Autori su dobili učinkovito razdvajanje svih izoflavona i odabranih fenolnih kiselina u vremenu analize od 1,9 min, ali je razlučivanje u nekim slučajevima bilo ispod 1,5, što je niže od dobivenog razlučivanja u ovom radu za odabrane izoflavone koje je veće od 2,0. Osim toga, cjelokupna validacija primijenjenih metoda kvantitativnog određivanja analita u biljnim ekstraktima nije provedena, kao ni potvrda identifikacije analita MS detektorom.

Naposljetku, potrebno je naglasiti da primjena QbD pristupa tijekom sistematičnog razvoja metode za određivanje glikozida i aglikona izoflavona, kako je opisano u ovom radu, nije do sada objavljena u literaturi. Također, do sada dvodimenzionalna kromatografija nije primjenjivana za identifikaciju fitoestrogena u složenim uzorcima pripravaka.

5. ZAKLJUČAK

Kromatografski indeks hidrofobnosti, koji opisuje lipofilnost 15 strukturno sličnih fitoestrogena, određen je RP-UHPLC gradijentnom metodom. Pri pH 7,4 i pH 2,0 najvišu lipofilnost je pokazao kumestrol dimetil eter s CHI_{ODS} vrijednostima 83,83 i 76,01. Najniže CHI_{ODS} vrijednosti su određene za izoflavonoide s polarnim glikozidnim skupinama (daidzin 20,18, genistin 25,46, ononin 32,11 i sisotrin 38,50). Vrlo dobra korelacija eksperimentalno određenih parametara lipofilnosti neioniziranih oblika fitoestrogena pri pH 2,0 i *in silico* izračunatih log *P* vrijednosti ukazuju na pouzdanost određivanja lipofilnosti razvijenom RP-UHPLC metodom.

Fitoestrogeni su pokazali srednje jaku (glikozilirani izoflavonoidi) do jaku interakciju (aglikoni izoflavonoida i kumestani) s fosfolipidima primjenom IAM-HPLC metode, što upućuje na zaključak da lipofilnost fitoestrogena utječe na interakcije s fosfolipidima pri čemu niža lipofilnost smanjuje njihovu interakciju.

Fitoestrogeni su pokazali raznoliku permeabilnost primjenom Caco-2 stanica. Nisku permeabilnost su pokazali glikozidi, dok su aglikoni pokazali srednju do visoku permeabilnost. S obzirom na dobru korelaciju između Caco-2 permeabilnosti i kromatografski određenih parametara primjenom IAM-HPLC metode, moguće je zaključiti kako je lipofilnost važan parametar koji utječe na apsorpciju fitoestrogena u gastrointestinalnom traktu. Na temelju provedenih istraživanja može se pretpostaviti da se ispitivana skupina fitoestrogena apsorbira pasivnom difuzijom s obzirom da se nisu pokazali P-gp supstratima.

Kromatografski određeno vezanje za proteine plazme, primjenom HSA-HPLC metode, ukazuje da se ispitivani fitoestrogeni u velikoj mjeri vezuju za humani serumski albumin. Najviša vrijednost vezanja za HSA je određena za kumestrol (97,84%) dok je najniža vrijednost određena za daidzin (80,70%). Na temelju ovih rezultata može se pretpostaviti kako će zbog navedenih interakcija s proteinima plazme, bioraspoloživost fitoestrogena biti smanjena.

Fitoestrogeni se umjereno vežu za alfa-1-kiseli glikoprotein što je pokazano primjenom AGP-HPLC metode. Najviši postotak vezanja za AGP je uočen za kumestrol dimetil eter (80,41), a najniži za glikozid daidzin (31,73). Dobiveni rezultati vezanja za humani serumski albumin i alfa-1-kiseli glikoprotein ukazuju na mogućnost pojašnjenja interferencija između različitih fitoestrogena.

Uspoređeni su eksperimentalno određeni farmakokinetički parametri s ADME parametrima izračunatim različitim računalnim programima. Dobra korelacija dobivena je za parametre koji opisuju lipofilnost fitoestrogena (r = 0,83-0,89) i udio vezanja za HSA (RSD = 0,33-11,37%), dok je veća razlika uočena za kromatografski određeno vezanje fitoestrogena za alfa-1-kiseli glikoprotein (RSD = 1,30-69,64%) te za rezultate određivanja permeabilnosti primjenom Caco-2 stanica (r = 0,05-0,72), što ukazuje na povezanost *in silico* predviđanja sa složenošću pojedinog parametra.

Razvijena je nova UHPLC-DAD metoda za istovremenu analizu osam izoflavona u obliku glikozida (daidzin, genistin, ononin, sisotrin) i aglikona (daidzein, genistein, biokanin A, formononetin). Sistematičnim razvojem metode primjenom kvalitete ugrađene u dizajn uz korištenje DryLab® računalnog programa, omogućeno je razdvajanje ispitivanih izoflavona u vrlo kratkom vremenu analize. Osam odabranih izoflavona s vrlo različitim fizikalno-kemijskim svojstvima učinkovito je odijeljeno (razlučivanje veće od 2,0) tijekom samo 1,6 min što omogućuje istovremenu kvantifikaciju aglikona i glikozidnih oblika bez prethodno provedenog dugotrajnog postupka hidrolize.

Novorazvijena metoda je validirana u skladu s ICH smjernicama u području primjene metode od 0,25 μg mL^{-1} do 70,0 μg mL^{-1} s granicom kvantifikacije od 0,2 μg mL^{-1} i granicom dokazivanja od 0,1 μg mL^{-1}. Metodu je moguće primijeniti tijekom rutinskih analiza pripravaka koji sadrže ispitivane izoflavone.

U svrhu identifikacije i dodatne potvrde selektivnosti novorazvijene UHPLC-DAD metode, primijenjena je 2D-UHPLC-MS tehnika zbog prisutnosti vrlo složenog matriksa u pripravcima s fitoestrogenima.

Analizom pripravaka s fitoestrogenima namijenjenim ženama u postmenopauzi, primjenom nove UHPLC-DAD metode, dobivena su velika odstupanja između kromatografski određenog i deklariranog sadržaja ispitivanih izoflavona. Također su značajna odstupanja pronađena između pojedinih serija istog proizvoda. Dobiveni rezultati ukazuju na nedostatak kontrole kvalitete pripravaka s fitoestrogenima, što dovodi u pitanje sigurnost pacijenta zbog mogućeg visokog unosa izoflavona.

6. LITERATURA

[1] J. Hays, J.K. Ockene, R.L. Brunner, J.M. Kotchen, J.E. Manson, R.E. Patterson, A.K. Aragaki, S.A. Shumaker, R.G. Brzyski, A.Z. LaCroix, I.A. Granek, B.G. Valanis, Effects of Estrogen plus Progestin on Health-Related Quality of Life, N. Engl. J. Med. 348 (2003) 1839–1854. doi:10.1056/NEJMoa030311.

[2] T. Cornwell, W. Cohick, I. Raskin, Dietary phytoestrogens and health, Phytochemistry. 65 (2004) 995–1016. doi:10.1016/j.phytochem.2004.03.005.

[3] A. V. Sirotkin, A.H. Harrath, Phytoestrogens and their effects, Eur. J. Pharmacol. 741 (2014) 230–236. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.057.

[4] J.A. Eden, Phytoestrogens for menopausal symptoms: A review, Maturitas. 72 (2012) 157–159. doi:10.1016/j.maturitas.2012.03.006.

[5] M. Soni, T.B.W. Rahardjo, R. Soekardi, Y. Sulistyowati, Lestariningsih, A. Yesufu-Udechuku, A. Irsan, E. Hogervorst, Phytoestrogens and cognitive function: a review, Maturitas. 77 (2014) 209–220. doi:10.1016/j.maturitas.2013.12.010.

[6] S. Mukund Vidya, Mukund Dhruv, A.A. Vinay, Mannarapu Mastan, Genistein: its role in metabolic diseases and cancer, Crit. Rev. Oncol. / Hematol. (2017). doi:https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.09.004.

[7] P. Albertazzi, D.W. Purdie, The nature and utility of the phytoestrogens: A review of the evidence, Maturitas. 42 (2002) 173–185. doi:10.1016/S0378-5122(02)00024-5.

[8] T. C.B., B. E.-K., L. S., T. G., R. F., C. H.S., Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature, Fertil. Steril. 87 (2007) 1243–1249. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.01.120.

[9] G. Eisenbrand, Isoflavones as phytoestrogens in food supplements and dietary foods for special medical purposes, Mol. Nutr. Food Res. 51 (2007) 1035–1312. doi:10.1002/mnfr.200700217.

[10] A. Cassidy, B. Hanley, R.M. Lamuela-Raventos, Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health, J. Sci. Food Agric. 80 (2000) 1044–1062. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1044::AID-JSFA586>3.0.CO;2-N.

[11] A.L. Ososki, E.J. Kennelly, Phytoestrogens : a Review of the Present State of Research, Phyther. Res. 17 (2003) 845–869. doi:10.1002/ptr.1364.

[12] L. Pilsková, I. Riecanský, F. Jagla, The physiological actions of isoflavone phytoestrogens, Physiol. Res. 59 (2010) 651–664. doi:931902 [pii].

[13] V.R. Preedy, Isoflavones : Chemistry, Analysis, Function and Effects, Royal Society Of Chemistry, Cambridge, United Kingdom, 2012. https://doi.org/10.1039/9781849735094.

[14] H.B. Franke AA, Lai JF, Absorption, distribution, metabolism, and excretion of isoflavonoids after soy intake, Arch Biochem Biophys. (2014). doi:10.1016/j.abb.2014.06.007.

[15] L. Pilšáková, I. Riečanský, F. Jagla, The physiological actions of isoflavone phytoestrogens, Physiol. Res. 59 (2010) 651–654.

[16] B. Testa, H. van de Waterbeemd, G. Folkers, R. Guy, Pharmacokinetic Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies, Wiley-

VCH, Zurich, 2001. doi:10.1002/9783906390437.

[17] H. van de Waterbeemd, B. Testa, R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers, Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability, Wiley-VCH, 2008.

[18] R.A. Prentis, Y. Lis, S.R. Walker, Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985)., Br J Clin Pharmacol. 25 (1988) 387–396. doi:10.1111/j.1365-2125.1988.tb03318.x.

[19] T. Kennedy, Managing the drug discovery/development interface, Drug Discov. Today. 2 (1997) 436–444. doi:10.1016/s1359-6446(97)01099-4.

[20] A.P. Li, Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties, 2 (2005) 179–185. doi:10.1016/j.ddtec.2005.05.024.

[21] F. Plavšić, A. Stavljenić, B. Vrhovac, Osnove kliničke farmakokinetike, Školska knjiga, Zagreb, 1992.

[22] A. Mälkiä, L. Murtomäki, A. Urtti, K. Kontturi, Drug permeation in biomembranes In vitro and in silico prediction and influence of physicochemical properties, Eur. J. Pharm. Sci. 23 (2004) 13–47. doi:10.1016/j.ejps.2004.05.009.

[23] K. Sugano, M. Kansy, P. Artursson, A. Avdeef, S. Bendels, L. Di, G.F. Ecker, B. Faller, H. Fischer, G. Gerebtzoff, H. Lennernaes, F. Senner, Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport, Nat. Rev. Drug Discov. 9 (2010) 597–614. doi:10.1038/nrd3187.

[24] A. Avdeef, Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability and Charge State, Wiley, 2012.

[25] M.D. Hämäläinen, A. Frostell-Karlsson, Predicting the intestinal absorption potential of hits and leads, Drug Discov. Today Technol. 1 (2004) 397–405. doi:10.1016/j.ddtec.2004.09.004.

[26] R.B. Van Breemen, Y. Li, Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption, Expert Opin Drug Metab Toxicol. 1 (2005) 175–185. doi:10.1517/17425255.1.2.175.

[27] J. Gao, E.D. Hugger, M.S. Beck-Westermeyer, R.T. Borchardt, Estimating Intestinal Mucosal Permeation of Compounds Using Caco-2 Cell Monolayers, in: Curr Protoc Pharmacol., Wiley, 2001.

[28] R.E. Fessey, R.P. Austin, P. Barton, A.M. Davis, M.C. Wenlock, The Role of Plasma Protein Binding in Drug Discovery, in: Pharmacokinet. Profiling Drug Res., Wiley, Zurich, 2006: pp. 119–141. doi:10.1002/9783906390468.

[29] M. Bteich, An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics_ highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions, Heliyon. 5 (2019). doi:https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02879.

[30] W.M. Pardridge, Blood – brain barrier delivery, Drug Discov. Today. 12 (2007) 54–61. doi:10.1016/j.drudis.2006.10.013.

[31] D.E. Clark, In silico prediction of blood – brain barrier permeation, Drug Discov. Today. 8 (2003) 927–933. https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02827-7.

[32] B. Neugnot, M. Bossant, F. Caradec, B. Walther, Metabolic Studies in Drug Research and Development, in: Pharmacokinet. Profiling Drug Res., Wiley, Zurich, 2006.

[33] P.D. Leeson, A.M. Davis, J. Steele, Lead optimization Drug-like properties : guiding

principles for design – or chemical prejudice ?, Drug Discov. Today. 1 (2004) 189–195. doi:10.1016/j.ddtec.2004.11.005.

[34] S.D. Kramer, H. Wunderli-Allenspach, Physicochemical properties in pharmacokinetic lead optimization, Farmaco. 56 (2001) 145–148.

[35] E.H. Kerns, L. Di, Lead profiling Physicochemical profiling : overview of the screens, Drug Discov. Today. 1 (2004). doi:10.1016/j.ddtec.2004.08.011.

[36] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, Adv. Drug Deliv. Rev. 23 (1997) 3–25. doi:https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1.

[37] C.A. Lipinski, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 44 (2000) 235–249. doi:10.1016/s1056-8719(00)00107-6.

[38] U. Norinder, M. Haeberlein, Computational approaches to the prediction of the blood – brain distribution, Adv. Drug Deliv. Rev. 54 (2002) 291–313. doi:10.1016/s0169-409x(02)00005-4.

[39] J.A. Arnott, S.L. Planey, The influence of lipophilicity in drug discovery and design, Expert Opin. Drug Discov. 7 (2012) 863–875. doi:10.1517/17460441.2012.714363.

[40] B. Testa, P. Crivori, M. Reist, P. Carrupt, The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs : Concepts and examples, Perspect. Drug Discov. Des. 19 (2000) 179–211. doi:https://doi.org/10.1023/A:1008741731244.

[41] V. Pliška, B. Testa, H. van de Waterbeemd, Lipophilicity : The Empirical Tool and the Fundamental Objective, in: Lipophilicity Drug Action Toxicol., Wiley-VCH, 1996: pp. 1–6.

[42] C. Hansch, T. Fujita, ρ-σ-π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure, J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 1616–1626. doi:10.1021/ja01062a035.

[43] T. Fujita, J. Iwasa, C. Hansch, A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients, J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 5175–5180. doi:https://doi.org/10.1021/ja01077a028.

[44] K. Valko, D.P. Reynolds, High-Throughput Physicochemical and In Vitro ADMET Screening A Role in Pharmaceutical Profiling, 3 (2005) 83–100.

[45] H. van de Waterbeemd, E. Gifford, ADMET in silico modelling: towards prediction paradise?, Nat. Rev. Drug Discov. 2 (2003) 192–204. doi:10.1038/nrd1032.

[46] J.C. Madden, In Silico APPROACHES FOR PREDICTING ADME PROPERTIES, in: Recent Adv. QSAR Stud., Springer, Dordrecht, 2010: pp. 283–304. doi:10.1007/978-1-4020-9783-6.

[47] P. Jandera, G. Henze, Liquid Chromatography, 1. Fundamentals, History, Instrumentation, Materials, in: ULLMANN'S Encycl. Ind. Chem., Wiley-VCH, 2000. doi:10.1002/14356007.b05.

[48] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003.

[49] M.W. Dong, HPLC and UHPLC for Practicing Scientists, Wiley, 2019.

[50] Y. Kazakevich, R. LoBrutto, HPLC for Pharmaceutical Scientists, Wiley, 2006.

[51] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th ed., Cengage Learning, 2013.

[52] M. Taleuzzaman, S. Ali, S. Gilani, S. Imam, Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review, Austin J. Anal. Pharm. Chem. 2 (2015).

[53] E. Heftmann, ed., Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods - Part A: Fundamentals and techniques, in: Chromatography, 6th ed., Elsevier Science, 2004.

[54] B.W.J. Pirok, D.R. Stoll, P.J. Schoenmakers, Recent Developments in Two-Dimensional Liquid Chromatography: Fundamental Improvements for Practical Applications, Anal. Chem. 91 (2019) 240–263. doi:10.1021/acs.analchem.8b04841.

[55] J.C. Giddings, Concepts and Comparisons in Multidimensional Separation, J. High Resolut. Chromatogr. 10 (1987).

[56] P.W. Carr, D.R. Stoll, Two-Dimensional Liquid Chromatography: Principles, Practical Implemenatation and Applications, Agilent Technologies, Germany, 2015.

[57] R. Put, Y. Vander Heyden, Review on modelling aspects in reversed-phase liquid chromatographic quantitative structure – retention relationships, Anal Tica Chim. Acta. 602 (2007) 164–172. doi:10.1016/j.aca.2007.09.014.

[58] J.F.K. Huber, C.A.M. Meijers, J.A.R.J. Hulsman, New Method for Prediction of Partition Coefficients in Liquid-Liquid Systems and Its Experimental Verification for Steroids by Static and Chromatographic Measurements, Anal. Chem. 44 (1972) 111–116.

[59] K. Valko, C. Du, C. Bevan, D. Reynolds, M. Abraham, Rapid Method for the Estimation of Octanol / Water Partition Coefficient (Log Poct) from Gradient RP-HPLC Retention and a Hydrogen Bond Acidity Term (Sigma alpha2H), Curr. Med. Chem. 8 (2001) 1137–1146. doi:10.2174/0929867013372643.

[60] OECD, Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method, OECD Publishing, 2004. doi:10.1787/9789264069824-en.

[61] A. Mornar, Fizikalno-kemijski parametri bioraspoloživosti polifenola, 2007.

[62] C.M. Du, K. Valko, C. Bevan, D. Reynolds, M.H. Abraham, Rapid Gradient RP-HPLC Method for Lipophilicity Determination : A Solvation Equation Based Comparison with Isocratic Methods, Anal. Chem. 70 (1998) 4228–4234. doi:https://doi.org/10.1021/ac980435t.

[63] S.K. Poole, C.F. Poole, Separation methods for estimating octanol – water partition coefficients, J. Chromatogr. B. 797 (2003) 3–19. doi:10.1016/j.jchromb.2003.08.032.

[64] K. Valkó, C. Bevan, D. Reynolds, Chromatographic Hydrophobicity Index by Fast-Gradient RP-HPLC: A High-Throughput Alternative to log P/log D, Anal. Chem. 69 (1997) 2022–2029. doi:10.1021/ac961242d.

[65] C. Pidgeon, U.V. Venkataram, Immobilized artificial membrane chromatography: Supports composed of membrane lipids, Anal. Biochem. 176 (1989) 36–47. doi:10.1016/0003-2697(89)90269-8.

[66] B.T. A. Taillardat-Bertschinger, P.-A. Carrupt, F. Barbato, Immobilized Artificial Membrane HPLC in Drug Research_2003.pdf, J.Med. Chem. 46 (2003) 655.

doi:10.1021/jm020265j.

[67] K. Valko, C.M. Du, C.D. Bevan, D.P. Reynolds, M.H. Abraham, Rapid-gradient HPLC method for measuring drug interactions with immobilized artificial membrane: Comparison with other lipophilicity measures, J. Pharm. Sci. 89 (2000) 1085–1096. doi:10.1002/1520-6017(200008)89:8<1085::AID-JPS13>3.0.CO;2-N.

[68] P.R. Tiller, I.M. Mutton, S.J. Lane, C.D. Bevan, Immobilized human serum albumin: Liquid chromatography/mass spectrometry as a method of determining drug-protein binding, Rapid Commun. Mass Spectrom. 9 (1995) 261–263. doi:10.1002/rcm.1290090403.

[69] D.S. Ashton, C.R. Beddell, G.S. Cockerill, K. Gohil, C. Gowrie, J.E. Robinson, M.J. Slater, K. Valko, Binding measurements of indolocarbazole derivatives to immobilised human serum albumin by high-performance liquid chromatography, 677 (1996) 194–198.

[70] K. Valko, S. Nunhuck, C. Bevan, M.H. Abraham, D.P. Reynolds, Fast Gradient HPLC Method to Determine Compounds Binding to Human Serum Albumin. Relationships with Octanol/Water and Immobilized Artificial Membrane Lipophilicity, J. Pharm. Sci. 92 (2003) 2236–2248. doi:10.1002/jps.10494.

[71] N.A. Kratochwil, M. Kansy, P.R. Gerber, W. Huber, F. Mu, Predicting plasma protein binding of drugs : a new approach, 64 (2002).

[72] M. Chrysanthakopoulos, T. Vallianatou, C. Giaginis, A. Tsantili-kakoulidou, Investigation of the retention behavior of structurally diverse drugs on alpha 1 acid glycoprotein column : Insight on the molecular factors involved and correlation with protein binding data, 60 (2014) 24–31. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.015.

[73] K.L. Valkó, Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery, J. Pharm. Biomed. Anal. 130 (2016) 35–54. doi:10.1016/j.jpba.2016.04.009.

[74] L. Mondello, A.C. Lewis, K.D. Bartle, Multidimensional Chromatography, Wiley, 2001. doi:10.1002/0470845775.

[75] D. Wu, M. Berna, G. Maier, J. Johnson, An automated multidimensional screening approach for rapid method development in high performance liquid chromatography, J. Pharm. Biomed. Anal. 16 (1997) 57–68.

[76] K. Zhang, Y. Li, M. Tsang, N.P. Chetwyn, Analysis of pharmaceutical impurities using multi-heartcutting 2D LC coupled with UV-charged aerosol MS detection, J. Sep. Sci. 36 (2013) 2986–2992. doi:10.1002/jssc.201300493.

[77] J.G. Shackman, B.L. Kleintop, Peak purity assessment in a triple-active fixed-dose combination drug product related substances method using a commercial two-dimensional liquid chromatography system, J. Sep. Sci. 37 (2014) 2688–2695. doi:10.1002/jssc.201400515.

[78] J. Iredale, I.W. Wainer, Determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in plasma using sequential achiral-chiral high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. 573 (1992) 253–258. doi:10.1016/0378-4347(92)80126-b.

[79] E. Eklund, C. Norsten-Höög, T. Arvidsson, Determination of free concentration of sameridine in blood plasma by ultrafiltration and coupled-column liquid chromatography, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 708 (1998) 195–200.

doi:10.1016/s0378-4347(97)00671-3.

[80] T. Miyabayashi, T. Okuda, M. Motohashi, K. Izawa, T. Yashiki, Quantitation of a new potent angiotensin II receptor antagonist, TCV-116, and its metabolites in human serum and urine, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 677 (1996) 123–132. doi:https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00405-X.

[81] M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa : osnove metodologije i primjene, Medicina (B. Aires). 45 (2009) 218–232.

[82] J.-C. Rochet, Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists, 3rd ed., Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh, 2012.

[83] N. Galić, Elektroraspršenje - blagi način ionizacije u spektrometriji masa, Kem. u Ind. 3 (2003) 117–123.

[84] E. De Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd ed., Wiley, 2007.

[85] W.M.A. Niessen, Liquid chromatography-mass spectrometry, 3rd ed., Taylor & Francis, 2006.

[86] M. Runje, Razvoj analitičkih metoda za određivanje onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj tvari nepafenaku, 2018.

[87] F.G. Vogt, A.S. Kord, Development of Quality-By-Design Analytical Methods, J. Pharm. Sci. 100 (2011) 797–812. doi:10.1002/jps.

[88] S. Orlandini, S. Pinzauti, S. Furlanetto, Application of quality by design to the development of analytical separation methods, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 443–450. doi:10.1007/s00216-012-6302-2.

[89] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, Quality: Quality by Design (QbD), (n.d.).

[90] A. Dispas, H.T. Avohou, P. Lebrun, P. Hubert, C. Hubert, 'Quality by Design' approach for the analysis of impurities in pharmaceutical drug products and drug substances, Trends Anal. Chem. 101 (2018) 24–33. doi:https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.028.

[91] A. Schmidt, I. Molnar, Using an innovative Quality-by-Design approach for development of a stability indicating UHPLC method for ebastine in the API and pharmaceutical formulations, J Pharm Biomed Anal. 78–79 (2013) 65–74. doi:10.1016/j.jpba.2013.01.032.

[92] J.W. Dolan, D.C. Lommen, L.R. Snyder, DryLab computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development. II. Gradient elution., J. Chromatogr. 485 (1989) 91–112. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2696740.

[93] C. Horváth, W. Melander, I. Molnár, Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, J. Chromatogr. A. 125 (1976) 129–156. doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)93816-0.

[94] I. Molnár, H.-J. Rieger, K.E. Monks, Aspects of the "Design Space" in high pressure liquid chromatography method development, J. Chromatogr. A. 1217 (2010) 3193–3200. doi:10.1016/j.chroma.2010.02.001.

[95] I. Molnár, Computerized Design of Separation Strategies in Reversed-phase Liquid

Chromatography: Development of DryLab software, J. Chromatogr. A. 965 (2002) 175–194. doi:10.1016/s0021-9673(02)00731-8.

[96] H.-J. Rieger, R. Kormany, I. Molnar, Application of Quality by Design Principles to a Pharmaceutical Sample Using UHPLC Method Development with Modeling Technologies, LC-GC. 31 (2013) 20–27.

[97] J.A. Rothwell, A.J. Day, M.R.A. Morgan, Experimental Determination of Octanol−Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 4355–4360. doi:10.1021/jf0483669.

[98] R. Kato, K. Kajiya, H. Tokumoto, K. S., N. T., Affinity of isoflavonoids for lipid bilayers evaluated with liposomal systems, BioFActors. 19 (2003) 179–187. doi:https://doi.org/10.1002/biof.5520190311.

[99] A. Arnoldi, L. Merlini, Lipophilicity-antifungal activity relationships for some isoflavonoid phytoalexins, J. Agric. Food Chem. 38 (1990) 834–838. doi:10.1021/jf00093a052.

[100] Y. Yang, L. Bai, X. Li, J. Xiong, P. Xu, C. Guo, M. Xue, Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: An evaluation using the blood–brain barrier cell and Caco-2 cell models, Toxicol. Vitr. 28 (2014) 388–396. doi:10.1016/j.tiv.2013.12.002.

[101] Y. Uekusa, Y. Takeshita, T. Ishii, T. Nakayama, Partition coefficients of Polyphenols for Phosphatidylcholine Investigated by HPLC with an Immobilized Artificial Membrane Column, Biosci. Biotechnol. Biochem. 72 (2014).

[102] G.C. Tsopelas F, Tsagkrasouli M, Poursanidis P, Pitsaki M, Vasios G, Danias P, Panderi I, Tsantili-Kakoulidou A, Retention behavior of flavonoids on immobilized artificial membrane chromatography and correlation with cell-based permeability, Biomed. Chromatogr. 32 (2017). doi:10.1002/bmc.4108.

[103] J. Xiao, T. Chen, H. Cao, L. Chen, F. Yang, Molecular property-affinity relationship of flavanoids and flavonoids for HSA in vitro, Mol. Nutr. Food Res. 55 (2011) 310–317. doi:10.1002/mnfr.201000208.

[104] H. Cao, X. Jing, D. Wu, Y. Shi, Methylation of genistein and kaempferol improves their affinities for proteins, Int. J. Food Sci. Nutr. 64 (2013) 437–443. doi:10.3109/09637486.2012.759186.

[105] X. Tian, X. Yang, X. Yang, K. Wang, Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model, 367 (2009) 58–64. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.09.023.

[106] M. Oitate, R. Nakaki, N. Koyabu, H. Takanaga, H. Matsuo, H. Ohtani, Y. Sawada, Transcellular transport of genistein, a soybean-derived isoflavone, across human colon carcinoma cell line (Caco-2), Biopharm. Drug Dispos. 22 (2001) 23–29. doi:10.1002/bdd.253.

[107] A. Steensma, H.P.J.M. Noteborn, R.C.M. Van Der Jagt, T.H.G. Polman, M.J.B. Mengelers, H.A. Kuiper, Bioavailability of genistein, daidzein, and their glycosides in intestinal epithelial Caco-2 cells, Environ. Toxicol. Pharmacol. 7 (1999) 209–212. doi:10.1016/S1382-6689(99)00015-0.

[108] C.-C. Wang, J.K. Prasain, S. Barnes, Review of the methods used in the determination of phytoestrogens, J. Chromatogr. B. 777 (2002) 3–28. doi:10.1016/S1570-0232(02)00341-0.

[109] Q. Wu, M. Wang, J.E. Simon, Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds, J. Chromatogr. B. 812 (2004) 325–355. doi:10.1016/j.jchromb.2004.08.008.

[110] J. Fibigr, D. Šatínský, P. Solich, Current trends in the analysis and quality control of food supplements based on plant extracts, Anal. Chim. Acta. 1036 (2018) 1–15. doi:10.1016/j.aca.2018.08.017.

[111] C.T. Srigley, E.A. Haile, Quantification of plant sterols/stanols in foods and dietary supplements containing added phytosterols, J. Food Compos. Anal. 40 (2015) 163–176. doi:https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.008.

[112] H. Adlercreutz, J. van der Wildt, J. Kinzel, H. Attalla, K. Wähälа, T. Mäkelä, T. Hase, T. Fotsis, Lignan and isoflavonoid conjugates in human urine, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 52 (1995) 97–103. doi:https://doi.org/10.1016/0960-0760(94)00146-D.

[113] I. da Costa César, F.C. Braga, C.D.V. Soares, E. de Aguiar Nunan, G.A. Pianetti, F.A. Condessa, T.A.F. Barbosa, L.M.M. Campos, Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts, J. Chromatogr. B. 836 (2006) 74–78. doi:10.1016/j.jchromb.2006.03.030.

[114] C. Boniglia, B. Carratù, R. Gargiulo, S. Giammarioli, M. Mosca, E. Sanzini, Content of phytoestrogens in soy-based dietary supplements, Food Chem. 115 (2009) 1389–1392. doi:10.1016/j.foodchem.2009.01.062.

[115] H. Ha, Y.-S. Lee, J.H. Lee, H. Choi, C. Kim, High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones in medicinal herbs, Arch. Pharm. Res. 29 (2006) 96–101. doi:10.1007/BF02977475.

[116] G. Montero, G. Günther, K. Valdés, F. Arriagada, J. Morales, An HPLC Method for the Determination of Isoflavones and the Evaluation of Their Antioxidant Capacity in Both Homogeneous and Microheterogeneous Systems, J. AOAC Int. 101 (2018) 235–241. doi:10.5740/jaoacint.17-0104.

[117] D.B. Clarke, V. Bailey, A.S. Lloyd, Determination of phytoestrogens in dietary supplements by LC-MS/MS, Food Addit. Contam. Part A. 25 (2008) 534–547. doi:10.1080/02652030701658340.

[118] T.R. Chen, L.A. Chen, Q.K. Wei, Evaluation of quality of Radix Puerariae herbal medicine by isoflavonoids, J. Pharm. Pharmacol. 62 (2010) 644–650. doi:10.1211/jpp.62.05.0013.

[119] S. Magiera, I. Baranowska, A. Lautenszleger, UHPLC–UV method for the determination of flavonoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities, J. Pharm. Biomed. Anal. 102 (2015) 468–475. doi:10.1016/j.jpba.2014.10.004.

[120] B. Klejdus, J. Vacek, L. Benešová, J. Kopecký, O. Lapčík, V. Kubáň, Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts, Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 2277–2285. doi:10.1007/s00216-007-1606-3.

[121] B. Klejdus, J. Vacek, L. Lojková, L. Benešová, V. Kubáň, Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases, J. Chromatogr. A. 1195 (2008) 52–59. doi:10.1016/j.chroma.2008.04.069.

[122] K. Markham, T. McGhie, Separation of Flavones by Capillary Electrophoresis: The Influence of pKa on Electrophoretic Mobility, Phytochem. Anal. 7 (1996) 300–304.

[123] K.D.R. Setchell, M.B. Welsh, C.K. Lim, High-performance liquid chromatographic analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection, J. Chromatogr. A. 386 (1987) 315–323.

[124] E. Moretón-Lamas, M. Lago-Crespo, M.A. Lage-Yusty, J. López-Hernández, Comparison of methods for analysis of resveratrol in dietary vegetable supplements, Food Chem. 224 (2017) 219–223. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.060.

[125] J. Fritsche, R. Angoelal, M. Dachtler, On-line liquid-chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy–mass spectrometry coupling for the separation and characterization of secoisolariciresinol diglucoside isomers in flaxseed, J. Chromatogr. A. 972 (2002) 195–203. doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01110-X.

[126] E.A. Prokudina, L. Havlíček, N. Al-Maharik, O. Lapčík, M. Strnad, J. Gruz, Rapid UPLC–ESI–MS/MS method for the analysis of isoflavonoids and other phenylpropanoids, J. Food Compos. Anal. 26 (2012) 36–42. doi:10.1016/j.jfca.2011.12.001.

[127] B. Redruello, L. Guadamuro, I. Cuesta, J.R. Álvarez-Buylla, B. Mayo, S. Delgado, A novel UHPLC method for the rapid and simultaneous determination of daidzein, genistein and equol in human urine, J. Chromatogr. B. 1005 (2015) 1–8. doi:10.1016/j.jchromb.2015.09.029.

[128] Y.-S. Shim, W.-J. Yoon, J.-B. Hwang, H.-J. Park, D. Seo, J. Ha, Rapid method for the determination of 14 isoflavones in food using UHPLC coupled to photo diode array detection, Food Chem. 187 (2015) 391–397. doi:10.1016/j.foodchem.2015.04.077.

[129] O. Martínez-Cruz, O. Paredes-López, Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (Salvia hispanica L.) by ultra high performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A. 1346 (2014) 43–48. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.007.

[130] G. Du, H. Zhao, Y. Song, Q. Zhang, Y. Wang, Rapid simultaneous determination of isoflavones in Radix puerariae using high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with novel shell-type column, J. Sep. Sci. 34 (2011) 2576–2585. doi:10.1002/jssc.201100295.

[131] P. Vila-Donat, G. Caprioli, F. Maggi, M. Ricciutelli, E. Torregiani, S. Vittori, G. Sagratini, Effective clean-up and ultra high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for isoflavone determination in legumes, Food Chem. 174 (2015) 487–494. doi:10.1016/j.foodchem.2014.11.047.

[132] G. Du, H.Y. Zhao, Q.W. Zhang, G.H. Li, F.Q. Yang, Y. Wang, Y.C. Li, Y.T. Wang, A rapid method for simultaneous determination of 14 phenolic compounds in Radix Puerariae using microwave-assisted extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1217 (2010) 705–714. doi:10.1016/j.chroma.2009.12.017.

[133] G. Fiechter, I. Opacak, B. Raba, H.K. Mayer, A new ultra-high pressure liquid chromatography method for the determination of total isoflavone aglycones after enzymatic hydrolysis: Application to analyze isoflavone levels in soybean cultivars, Food Res. Int. 50 (2013) 586–592. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.038.

[134] M.C. Nemitz, F.K.J. Yatsu, J. Bidone, L.S. Koester, V.L. Bassani, C. V. Garcia, A.S.L. Mendez, G.L. von Poser, H.F. Teixeira, A versatile, stability-indicating and high-throughput ultra-fast liquid chromatography method for the determination of isoflavone

aglycones in soybeans, topical formulations, and permeation assays, Talanta. 134 (2015) 183–193. doi:10.1016/j.talanta.2014.10.062.

[135] L. Movileanu, I. Neagoe, M.L. Flonta, Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers, Int. J. Pharm. 205 (2000) 135–146.

[136] J.G. Hardman, A. Gilman, L.S. Goodman, The pharmacological basis of therapeutics, in: 2011: pp. 892-894,896-897.

[137] J. Xiao, G. Kai, A Review of Dietary Polyphenol-Plasma Protein Interactions: Characterization, Influence on the Bioactivity, and Structure-Affinity Relationship, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 52 (2012) 85–101.

[138] K. Valko, bio-mimetic chromatography, (n.d.). http://www.bio-mimetic-chromatography.com/calibration-mixtures (accessed March 22, 2018).

[139] P. V. Balimane, Y.-H. Han, S. Chong, Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction, AAPS J. 8 (2006) E1–E13. doi:10.1208/aapsj080101.

[140] S.E. Monks K, Molnár I, Rieger HJ, Bogáti B, Quality by Design: Multidimensional exploration of the design space in high performance liquid chromatography method development for better robustness before validation, J. Chromatogr. A. 1232 (2012) 218–230. doi:10.1016/j.chroma.2011.12.041.

[141] S. Fekete, J. Fekete, I. Molnár, K. Ganzler, Rapid high performance liquid chromatography method development with high prediction accuracy, using 5cm long narrow bore columns packed with sub-2μm particles and Design Space computer modeling, J. Chromatogr. A. 1216 (2009) 7816–7823. doi:10.1016/j.chroma.2009.09.043.

[142] K. Lasić, A. Bokulić, A. Milić, B. Nigović, A. Mornar, Lipophilicity and bio-mimetic properties determination of phytoestrogens using ultra-high-performance liquid chromatography, Biomed. Chromatogr. (2019) e4551. doi:10.1002/bmc.4551.

[143] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology, Int. Conf. Harmon. (2005).

[144] M. Masullo, P. Montoro, A. Mari, C. Pizza, S. Piacente, Medicinal plants in the treatment of women's disorders: Analytical strategies to assure quality, safety and efficacy, J. Pharm. Biomed. Anal. 113 (2015) 189–211. doi:10.1016/j.jpba.2015.03.020.

ŽIVOTOPIS

Kornelija Lasić (djevojačko prezime Juhas) rođena je 15. travnja 1979. u Osijeku gdje je završila osnovnu i srednju školu. Studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu upisuje 1999. godine. Diplomirala je 2004. godine te odradila stručno usavršavanje u ljekarni. 2005. godine je položila stručni ispit za magistre farmacije pri Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi RH nakon čega se zapošljava u Gradskoj ljekarni Zagreb. Od rujna 2005. godine zaposlena je u Plivi, u odjelu Istraživanja i razvoja, laboratorij za tekućinsku kromatografiju. Od 2007. godine radi u odjelu Analitike aktivnih farmaceutskih supstancija. Poslijediplomski doktorski studij „Farmaceutske znanosti“ na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu upisuje 2007. godine. Do sada je u koautorstvu objavila 4 znanstvena rada citirana u bazi Current Contents.

Znanstveni radovi

1) **Lasić K**, Bokulić A, Milić A, Nigović B, Mornar A. Lipophilicity and bio-mimetic properties determination of phytoestrogens using ultra-high-performance liquid chromatography. Biomedical Chromatography. 2019;33:e4551. https://doi.org/10.1002/bmc.4551

2) **Lasić K**, Mornar A, Nigović B. Quality by Design (QbD) approach for the development of a rapid UHPLC method for simultaneous determination of aglycone and glycoside forms of isoflavones in dietary supplements. Analytical Methods. 2020, 12, 2082-2092. https://doi.org/10.1039/C9AY02778E

3) Šagud I, Maček Hrvat N, Grgičević A, Čadež T, Hodak J, Dragojević M, **Lasić K**, Kovarik Z, Škorić I. (2020) Design, synthesis and cholinesterase inhibitory properties of new oxazole benzylamine derivatives. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 35:1, 460-467. DOI: 10.1080/14756366.2019.1707197

4) Petruševska V, **Lasić K**, Mornar A. Compatibility investigation for a new antituberculotic fixed dose combination with an adequate drug delivery. Drug Development and Industrial Pharmacy. 2020 Aug; 6(8):1-30. DOI: 10.1080/03639045.2020.1788066

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

FARMAKOKINETIČKI PARAMETRI FITOESTROGENA

Kornelija Lasić

SAŽETAK

Primjena fitoestrogena se kontinuirano povećava zbog njihove biološke aktivnosti i potencijalno korisnih učinaka. Na tržištu se nalazi sve veći broj pripravaka koji sadrže različite fitoestrogene namijenjene ženama u postmenopauzi kao posebno rizičnoj skupini. Osim što se razlikuju kvantitativno s obzirom na ukupni sadržaj fitoestrogena, dodatno se razlikuju i kvalitativno s obzirom na zastupljenost pojedinih fitoestrogena.
Cilj je ovog rada odrediti farmakokinetičke parametre skupini 15 strukturno sličnih fitoestrogena (genistein, biokanin A, daidzein, formononetin, genistin, sisotrin, daidzin, ononin, prunetin, 3,4,7-trihidroksi izoflavon, 4,6,7-trihidroksi izoflavon, 4,6,7-trimetoksi izoflavon, genistein 4,7-dimetil eter, kumestrol, kumestrol dimetil eter) u svrhu boljeg razumijevanja njihove bioraspoloživosti i učinaka na organizam. Zatim, na temelju kromatografski određene lipofilnosti razviti novu, brzu, selektivnu i osjetljivu analitičku metodu za određivanje 8 najznačajnijih fitoestrogena iz skupine izoflavona u obliku aglikona i njihovih glikozida.
Određeni su parametri koji opisuju lipofilnost skupine strukturno sličnih fitoestrogena primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti obrnutih faza (RP-UHPLC). Ispitane su njihove interakcije s fosfolipidima staničnih membrana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kolona s vezanim umjetnim membranama. Određeni su udjeli vezanja fitoestrogena za najzastupljenije proteine plazme primjenom biomimetičke kromatografije. Permeabilnost fitoestrogena i način prijenosa kroz sluznicu gastrointestinalnog trakta određeni su primjenom modela Caco-2 stanica. Dobiveni rezultati diferenciraju fitoestrogene sukladno njihovoj strukturi, gdje su aglikoni pokazali značajno višu lipofilnost, jaču interakciju s fosfolipidima, viši udio vezanja za alfa-1-kiseli glikoprotein i višu permeabilnost u usporedbi s glikozidima. Međutim, udio vezanja za humani serumski albumin bio je visok za sve ispitivane fitoestrogene. Eksperimentalno određeni farmakokinetički parametri uspoređeni su s izračunatim različitim računalnim programima.
Razvijena je nova RP-UHPLC metoda primjenom QbD pristupa za istovremenu kvntifikaciju najznačajnijih fitoestrogena iz skupine izoflavona u obliku glikozida (genistin, sisotrin, daidzin, ononin) i aglikona (genistein, biokanin A, daidzein, formononetin) bez prethodno provedenog dugotrajnog postupka hidrolize. Metoda je validirana prema ICH smjernicama i primijenjena u analizi pripravaka različitih dozirnih oblika Razvijena je i dvodimenzionalna metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnute s masenom spektrometrijom (2D-UHPLC-MS) za pouzdanu identifikaciju fitoestrogena iz skupine izoflavona u složenom matriksu ispitivanih uzoraka. Analiza pripravaka s fitoestrogenima namijenjenim ženama u postmenopauzi novom metodom pokazala je velika odstupanja između kromatografski određenog i deklariranog sadržaja ispitivanih izoflavona.

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

Rad sadrži: 126 stranica, 20 slika, 25 tablica, 144 literaturnih navoda, izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: fitoestrogeni, izoflavoni, lipofilnost, biomimetička kromatografija, Caco-2 permeabilnost, kromatografija visoke djelotvornosti, kromatografija ultravisoke djelotvornosti, kvaliteta ugrađena u dizajn, dvodimenzionalna tekućinska kromatografija, masena spektrometrija

Mentor: **Prof. dr. sc. Biljana Nigović**, *Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Sanda Vladimir Knežević**, *Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Prof. dr. sc. Jelena Filipović-Grčić, *Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Nasl. izv. prof. dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek*, Pliva Hrvatska d.o.o., Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Rad prihvaćen: 17. studenog 2020.

Basic documentation card

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

Doctoral dissertation

PHARMACOKINETIC PARAMETERS OF PHYTOESTROGENS

Kornelija Lasić

SUMMARY

The use of phytoestrogens has increased remarkably due to their biological activity and potential beneficial effects. An increasing number of dietary supplements containing different phytoestrogens are widely present in the market targeting postmenopausal women as a particular risk group. The content of isoflavones in dietary supplements not only differ quantitatively concerning their total isoflavone content, but also qualitatively concerning their isoflavone spectrum.

The aim of the present study was to obtain data on pharmacokinetic properties for a set of 15 structurally related phytoestrogens (biochanin A, daidzein, formononetin, genistein, genistein-4,7-dimethylether, prunetin, 3,4,7-trihydroxyisoflavon, 4,6,7-trihydroxyisoflavon, 4,6,7-trimethoxyisoflavon, daidzin, genistin, ononin, sissotrin, coumestrol, coumestrol dimethylether) for the purpose of better understanding their biological activity and effects. Thereafter, based on the chromatographically determined lipophilicity, a novel, fast, selective and sensitive analytical method for simultaneous quantification of the 8 most important isoflavones in the aglycone and glycoside forms was developed.

Lipophilicity of structurally related phytoestrogens was measured using reversed phase ultra-high performance liquid chromatography (RP-UHPLC). The phospholipid binding measurements were carried out using high performance liquid chromatography (HPLC) on a column with a stationary phase that contains phosphatidylcholine. The protein binding measurements were carried out using biomimetic chromatography. Caco-2 cells were used to estimate the intestinal permeability and the way of transport across the membrane of phytoestrogens test compounds. Obtained results differentiate phytoestrogens according to their structure where aglycones show significantly higher lipophilicity, IAM partitioning, AGP binding and Caco-2 permeability comparing to glucosides. However, HSA binding was very high for all investigated compounds. Experimentally obtained pharmacokinetic parameters were compared with i*n silico* predicted data by different computer platforms.

A new RP-UHPLC method was developed for simultaneous determination of the most significant phytoestrogens from isoflavone family in aglycone (genistein, daidzein, biochanin A and formononetin) and glycoside (genistin, daidzin, sissotrin, ononin) forms without prior time-consuming process of hydrolysis. The method was validated as per ICH recommendations and was successfully applied to the analysis of various dietary supplements. Additionally to identification using external standard, the identity of selected compounds in samples was confirmed by using two-dimensional ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (2D-UHPLC-MS). Analysis of dietary supplements containing phytoestrogens intended for use in postmenopausal women, using newly developed method, revealed significant deviations between measured and labelled content of investigated isoflavones.

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

Dissertation includes: 126 pages, 20 figures, 25 tables, 144 references, original is in Croatian language

Keywords: phytoestrogens, isoflavones, lipophilicity, biomimetic chromatography, Caco-2 permeability, ultra-high performance liquid chromatography, quality by design, two dimensional liquid chromatography, mass spectrometry

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

Reviewers: **Sanda Vladimir Knežević, Ph.D.,** *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.*

Jelena Filipović-Grčić, Ph.D., *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.*

Biserka Cetina-Čižmek, Ph.D., *Pliva Croatia Ltd., Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.*

Dissertation accepted: November, 17th, 2020.