

Mladi za napredek Maribora 2016

33. srečanje

**ANALIZA IN DOLOČANJE PRISOTNOSTI SKUPNIH
INDOLNIH SPOJIN V TREH VZORCIH PREHRANSKIH
DOPOLNIL MACE (*LEPIDIUM MEYENII*) Z UPORABO ATR
FTIR SPEKTROSKOPIJE**

Raziskovalno področje: ZDRAVSTVO

RAZISKOVALNA NALOGA

Prostor za nalepko

Avtor: MARTINA VELICHKOVSKA

Mentor: ZDENKA KEUC

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, januar 2016

Mladi za napredek Maribora 2016

33. srečanje

**ANALIZA IN DOLOČANJE PRISOTNOSTI SKUPNIH
INDOLNIH SPOJIN V TREH VZORCIH PREHRANSKIH
DOPOLNIL MACE (*LEPIDIUM MEYENII*) Z UPORABO ATR
FTIR SPEKTROSKOPIJE**

Raziskovalno področje: ZDRAVSTVO

RAZISKOVALNA NALOGA

Prostor za nalepko

Maribor, januar 2016

VSEBINA

1 UVOD.....	3
1.1 Cilji raziskave.....	6
1.2 Raziskovalno vprašanje.....	6
1.3 Hipoteze in njihove razlage	6
1.4 Raziskovalne metode	7
2 PREGLED LITERATURE	8
2.1 Zeliščni prehranski dodatki – kako učinkoviti so?.....	8
2.2 Maca-priljubljena prehransko dopolnilo na slovenskem trgu.....	9
2.3 Kemijska sestava Mace	10
2.6 Kemija Indol-3-karabinola.....	12
3 PRAKTIČNI DEL	13
3.1 MACA - opis vzorca	13
3.2 Snemanje IR spektrov	13
3.3 Umeritvena premica za kvantifikacijo Idol-3-karabinola	14
3.3.1 Priprava standardnih raztopin I3C	14
3.4 Interpretacija IR spektrov	15
4 REZULTATI MERITEV	15
3.2 IR spektri vzorcev Mace	17
4 ANALIZA ATR FT-IR SPEKTROV	18
4.1 Umeritvena premica za kvantifikacijo Idol-3-karabinola v vzorcih mace	20
5 RAZPRAVA	22
6 ZAKLJUČKI.....	23
7 DRUŽBENA ODGOVORNOST.....	25
Literatura.....	27

KAZALO SLIK

Slika 1 - Kemijska zgradba najpogostejših fitoestrogenov, ki se nahajajo v rastlinah –izoflavoni in koumestani ter primerjava z <i>17-β-estradiolom</i> (Yildiz, 2009).....	5
Slika 2-Indol-3-karabinol (I3C)z obkroženim indolnim obročem.....	5
Slika 3- Posušeni gomolji naravno posušeno črne (zgornji), rumene (na sredini) in rdeče (spodaj) Mace (Gonzales, 2011) ter (desno) Maca rastlina (Navitas naturals, 2016)	10
Slika 4 - <i>p</i> -metoksibenzil izocianat	10

Slika 5 -(od leve proti desni) β -sitosterol, campesterol in stigmasterol v primerjavi z estrogenom (skrajno desno).....	11
Slika 6 - Hidroliza glukobrasicina in nastanek I3C (Linus Pauling Institute, 2015).....	12
Slika 7 - nekaj možnih kondenzacijskih derivatov I3C (Linus Pauling Institute, 2015).....	12
Slika 8 - maca (v prahu).....	13
Slika 9 - IR spekter Indol-3-karbinola	16
Slika 10 - IR spekter Maca 500mg kapsule (PlanetBio).....	17
Slika 11 - IR spekter Maca 500mg kapsule (Now)	17
Slika 12 - IR spekter Maca Powder (Superfoods).....	18
Slika 13 - 4-metoksibenzilizocianat in njegov IR spekter (vir: NIST, 2016).....	23
Slika 14- strukturna podobnost seratonina (levo) in I3C (desno)	25

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1 - Osnovni botanični podatki o Maci	9
Preglednica 2 - Glukozinati (GS) v Maci (carlson in Daxenbichler, 1987).....	11
Preglednica 3 - Standardne raztopine I3C.....	14
Preglednica 4 - Absorpcijske signali za I3C.....	15
Preglednica 5 - Karakteristične absorbance za vzorce Mace	19
Preglednica 6 - Podatki za umeritveno premico	20
Preglednica 7 - Masa skupnih indolnih snovi v vzorcih mace (po I3C).....	21
Preglednica 8 - Masa skupnih indolnih snovi v 1.0 g Mace.....	21
Preglednica 9 - Zanesljivost metode (metoda standardnega dodatka)	22

KAZALO GRAFOV

Graf 1 - umeritvena premica.....	20
----------------------------------	----

ORGANIGRAMI

Organigram 1: NAČRT Raziskave	8
-------------------------------------	---

OTC) - Over The Counter (preko pulta)

(I3C) - Indol-3-karabinol

(HRT) - Hormone Replacement Therapy (nadomestna hormonska terapija)

ATR –FTIR Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy

POVZETEK

Hormonske težave običajno zdravimo z nadomestno hormonsko terapijo (HRT), vendar prosti trg ponuja tudi prehranska dopolnila na rastlinski osnovi, ki naj bi imela podobno učinkovitost vendar večjo varnost pri uporabi. Ena od teh je Maca (*Lepidium meyenii*). Kemijska sestava Mace še ni povsem poznana, kot tudi ne aktivna učinkovina, ki bi lahko imela učinke na hormonsko ravnovesje. Postavila sem postavila hipotezo, da bi to lahko bil Indol-3-Karbinol (I3C), zato me je zanimalo »*Ali so v vzorcih Mace, ki je dostopna na slovenskem trgu (Maca v prahu (Superfoods®); 500mg tablete Maca (PlanetBio®) in 500mg tablete Maca (Now®)) prisotne tudi indolne spojine in v kakšnem obsegu?*«

S pomočjo ATR-FTIR spektroskopije je bilo ugotovljeno, da se vzorci Mace razlikujejo v svoji kemijski zgradbi. Delež skupnih indolnih spojin se je gibal od 2.43 mg/g do 0.96 mg/g ($\pm 0,02$ mg). Samo za en vzorec od treh lahko predvidevamo, da vsebuje I3C. Izračunane količine I3C ne dosegajo terapevtskih vrednosti, zato I3C ne more biti najpomembnejša aktivna učinkovina v Maci. Da bi dobljene rezultate potrdili, bi morali izvesti še referenčno analizo (npr. GC-MS).

Število besed: 179

1 UVOD

Po Lewis s sodel. (2010) je hormonsko neravnovesje prisotno pri 20-30 % moških in 40-45 % žensk po celem svetu. To ni le problem žensk v obdobju po menopavzi, ampak tudi mladostnikov. Zato ni nenavadno, da se prodaja in uporaba prehranskih dopolnil za izboljšanje spolne funkcije ali vzpostavljanja t.i. hormonskega ravnovesja v zadnjem desetletju drastično povečuje (Corazza s sodel., 2013). Temu dejstvu je potrebno prišteti še dostopnost do vedno večje količin zdravil, za katere ne potrebujemo zdravniškega recepta (*OTC- ang. Over the counter*). Tudi ta naj bi bila učinkovita pri lajšanju simptomov povezanim s hormonskim neravnovesjem. Zato je vpogled v stanje na tem področju izziv tudi iz perspektive kliničnih raziskav in javnega zdravja.

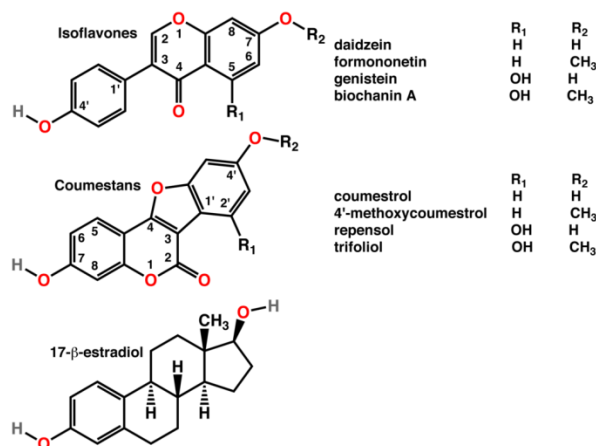
Najpogostejši izdelki za t.i. »samozdravljenje« hormonskih težav vsebujejo izvlečke iz naslednjih rastlin: *Yohimbine*,¹ *Maca*, *Gozdna svetlika*, *Črna detelja*, *soja*, *Vimček* (*Epimedium*) in *Ginkgo biloba* (Corazza s sodel., 2013). Vsi se reklamirajo kot "naravna" in s tem avtomatsko "varna" alternativa za farmacevtske izdelke, ki vsebujejo bioidentične ali sintetičnih hormone. Ali je temu res tako? Kaj so njihove aktivne učinkovine? Odgovori na ta vprašanja so bili osnovna motivacija za to raziskavo. Pri tem sem osredotočila le na eno prehransko dopolnilo za obnavljanje/vzpostavljanje hormonskega ravnovesja, ki je dostopno na slovenskem trgu, to je *Maca* (*Lepidium meyenii*)². *Maca*, ki je uvoz iz Latinske Amerike, je pri nas dostopna v zadnjih desetih letih.

Literatura, ki obravnava *Maco*, kot razlog za njeno učinkovitost navaja večjo vsebnost fitoestrogenov (t.i. ksenoestrogeni)³, ki predstavljajo zelo raznoliko skupino naravnih nesteroidnih spojin, strukturno podobnih estradiolu (17- β -estradiol). Zato lahko povzročajo estrogene ali/in antiestrogne učinke (Yildiz, 2005; Campbell s sodel., 2013).

¹ Reklamira se tudi kot sredstvo za hitrejše izgorevanje maščob (opomba avtorice).

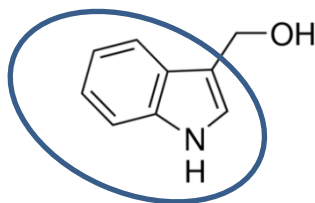
² Nekatera druga imena za *Maco*, ki jih najdemo v literaturi so še: ginseng Péruvien, maca, *Lepidium peruvianum*, *Maca Maca*, *Maca Péruvien*, *Maino*, *Maka*, *Perujski ginseng*, *Perujsko Maca* (avtorjeva opomba)

³ Ksenoestrogeni so spojine, ki ne nastajajo v endokrinih žlezah, ampak jih dobimo preko rastlinske hrane, ki je bogata s fitoestrogeni.



SLIKA 1 - KEMIJSKA ZGRADBA NAJPOGOSTEJŠIH FITOESTROGENOV, KI SE NAHAJAJO V RASTLINAH - IZOFLAVONI IN KOUVESTANI TER PRIMERJAVA Z 17-β-ESTRADIOLOM (YILDIZ, 2009).

Fitoestrogeni so spojine, ki jih uvrščamo med substituirane naravne fenolne spojine. Najbolj raziskani so izoflavoni, ki jih pogosto najdemo v soji in rdeči detelji (TGA, 2006) (slika 1). Med fitoestrogene sodijo tudi snovi, ki lahko posredno vplivajo na koncentracije endogenih estrogenov z vezavo ali deaktivacijo encimov, ki so vključeni v sintezo hormonov in tako vplivajo na razpoložljivost le teh (Johnston, 2003). Indol-3-karbinol (I3C) je v literaturi pogosto omenjan kot ena takšnih učinkovin (Telang s sodel., 1992; Wong s sodel., 1997; Michnovicz, 1998; Yuan s sodel., 1999; McAlindon s sodel., 2001; Reed s sodel., 2005).



SLIKA 2 - INDOL-3-KARABINOL (I3C) Z OBKROŽENIM INDOLNIM OBROČEM

I3C nastaja z razgradnjo glukozinolata imenovanega glukobrasicin, ki ga najdemo v rastlinah kot so brokoli, zelje in listnati ohrovt, oz. v družini križnic (*lat. Brassicaceae*). Za I3C je bilo dokumentirano, da zavira nastanek tumorjev (Kim s sodel., 1994; Preobrazhenskaya s sodel., 1993; Tanaka s sodel., 1990) v različnih tarčnih organih, vključno v tkivu dojk (Grubbsov s sodel., 1995), jeter (Oganesian s sodel., 1997), endometrija (Kojima s sodel., 1994), pljuč (Stoner s sodel., 1993) in drugje (Guo s sodel., 1995). V različnih kliničnih testih je bilo ugotovljeno, da deluje zaščitno proti raku dojk in raku jajčnikov (Bradlow s sodel. 1995). Predlaganih je bilo veliko možnih mehanizmov delovanja, vključno s spremembo metabolizma estrogena (Niwa s sodel., 1994; Bradlow s sodel., 1991; Suto s sodel., 1991). Poleg tega je za I3C dokazano, da zavira vezavo glutathion S-transferaze (Danger s sodel.,

1992; Trivedi, 2015). Zaradi indolnega broča je strukturno zelo podoben serotoninu. Na osnovi teh raziskav je bila postavljena hipoteza, da bi I3C lahko bil tudi ena od aktivnih učinkovin Mace. To hipotezo so podkrepili še izsledki Auborna s sodel. (2003), ki je preučeval ali *genistein* (glavni isoflavonoid v soji) lahko vpliva na sposobnost I3C, da povzroči apoptozo celice in s tem zmanjša delovanje estrogenskega receptorja (ER)-alfa. Raziskava je pokazala sinergistični učinek med delovanjem I3C in genisteina. Ker so tudi druge klinične študije, opravljene z I3C (Wong, 1997; Conaway s sodel., 2000; Lampe, 2002; Rouzaud s sodel., 2004) ali z Maco pokazale zelo podobne rezultate, smo si kot cilj raziskave zastavili preučiti ali je I3C dejansko ena od aktivnih snovi v Maci.

1.1 CILJI RAZISKAVE

Postavljeni so bili trije cilji raziskave:

1. preučiti ali je I3C aktivna snov v treh vzorcih Mace, dostopnih na slovenskem trgu.
2. kvantificirati skupno količino indolnih snovi (glede na I3C) v vzorcih Mace.
3. primerjati sestave treh različnih vrst Maca (ki se vse oglašujejo kot 100% čista Maca) in s tem preučiti njihovo čistost.

1.2 RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

Ali vsi tipi Mace, ki so dostopni na slovenskem trgu (Maca v prahu (Superfoods®); 500mg tablete Maca (PlanetBio®) in 500mg tablete Maca (Now®)), vsebujejo indolne spojine (izražene kot ekvivalent I3C), in v kakšnem obsegu?

1.3 HIPOTEZE IN NJIHOVE RAZLAGE

Maca je ekstrakt, pridobljen iz rastline *Lepidium meyenii*. Ker gre za rastlino, ni nujno da je razmerje aktivnih učinkovin vedno enako, vendar pa sestava verjetno ne niha v smislu katere snovi so prisotne in katere ne. Na tej osnovi smo postavili naslednje hipoteze:

- 1. hipoteza:** Indolne spojine so prisotne v vseh treh vzorcih Mace.
- 2. hipoteza:** Vsi trije vzorci 100 % čiste Mace vsebujejo indolne spojine v območju 0,0 – 1,5 mg, izraženo kot ekvivalent I3C/g Mace. McNaughton in Marks (2003) namreč poročata, da

je skupna količina vseh glukozinolatov (kamor sodi I3C) v družini križnic (*lat. Brassicaceae*) običajno v območju med 0.4 mg/g do 3.0 mg/g rastline. Ker je I3C le eden izmed njih (predstavnik indolnih spojin), to pomeni, da lahko pričakujemo nižje vrednosti. Ker tovrstna raziskava še ni bila opravljena, referenčnih vrednosti ne poznamo. Zaradi omejitve z raziskovalno opremo, smo se odločili, da bomo določili le vrednost skupnih indolnih snovi.

1.4 RAZISKOVALNE METODE

Standardni postopek za določanje Indol-3-karabinola (ali indol-3-metanola) (I3C), opisan v literaturi, je plinska kromatografija z masno detekcijo in kvantifikacija s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (Sandberg s sodel., 1987). Tega v šolskem laboratoriju ni na voljo, zato smo se odločili za alternativno metodo – določitev z ATR FT-IR. Za slednjo smo se odločili ker:

1. je na voljo v šolskem laboratoriju in je ena od najhitrejših, nedestruktivnih in poceni metod za kvalitativno in kvantitativno določitev sestave spojin.

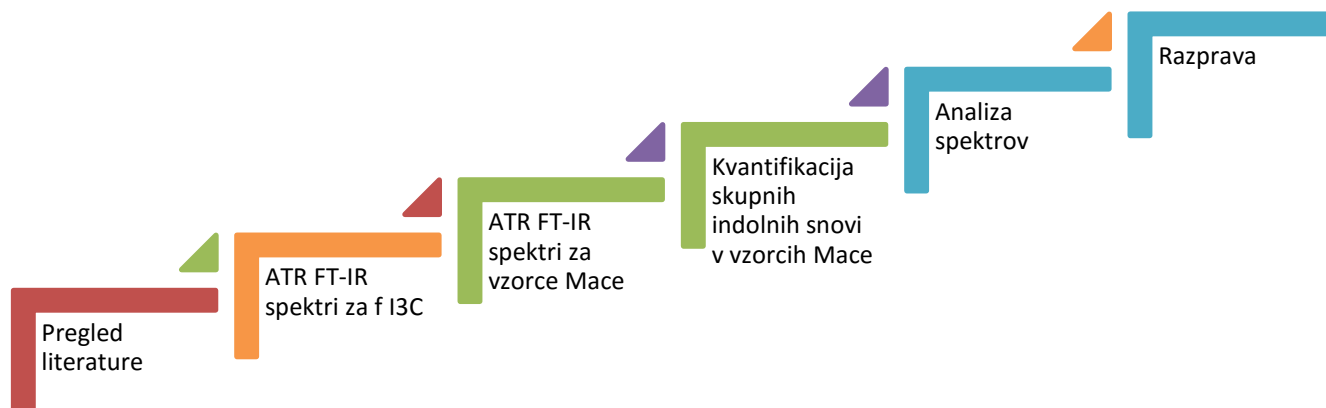
2. ATR FTIR tehnika zagotavlja hiter način vzorčenja, ker predhodna priprava vzorca ni potrebna in ima odlično ponovljivost.

V ta namen smo uporabili napravo Elmer Perkin Spectrum Two in sicer v frekvenčnem območju od 4000-400 cm^{-1} . Pričakovali smo, da bo primerjava IR spektrov I3C in vzorcev Mace pokazala značilne vrhove (absorbance pri značilnih valovnih številih), pri čemer bomo, glede na zgradbo I3C, še posebej pozorni na naslednje:

- vibracije vezi okoli 3400 cm^{-1} , ki jih lahko pripišemo vezi *N-H* in fenolnim *O-H* skupinam;
- vibracije aromatskih *C = C* vezi pri 1549 cm^{-1} in 1617 cm^{-1} ;
- vibracije pri 1252 cm^{-1} in 1238 cm^{-1} , ki so posledica *C-N* aromatskih (obroč) vezi;
- vibracije pri 1128 cm^{-1} , 1091 cm^{-1} in 1066 cm^{-1} zaradi raztezanje *O-H* vezi;
- aromatski *C-H* vrhovi v območju 860-680 cm^{-1} ;
- v območju 910-665 cm^{-1} je specifična vibracija za sekundarne amine (kar I3C je).

Območje 1450-1617 cm^{-1} je bilo izbrano za količinsko opredelitev skupnih indolnih spojin, saj so te vibracije značilne za indolne obroče (Vazquez-Vuelvas, 2011) (Glej sliko 1).

Načrt raziskave je bil naslednji:



ORGANIGRAM 1: NAČRT RAZISKAVE

2 PREGLED LITERATURE

2.1 ZELIŠČNI PREHRANSKI DODATKI – KAKO UČINKOVITI SO?

Veliko ljudi ima napačno prepričanje, da so prehranska dopolnila testirana s strani nacionalnih agencij za javno zdravje. Prehranska dopolnila se sme tržiti tudi brez ustrezne dokumentacije o njihovi učinkovitosti ali varnosti (Taylor, 2012; Pravilnik o prehranskih dopolnilih, 2013; NJIZ RS, 2015). To je tudi razlog, da se prehranskih dopolnil in njihovih aktivnih učinkovin ne sme predstavljati kot nadomestila za zdravila. Kljub temu se prodaja prehranskih dopolnil za izboljšanje erektilne funkcije, spolnega vzburjenja in vzpostavljanja hormonsko ravnovesje iz leta v leto povečuje (Campbell s sodel., 2013). Ker je večina prehranskih dopolnil izdelanih na osnovi rastlinskih izvlečkov, se tržijo kot naravni in zato (absolutno) varni pri uživanju.⁴ To seveda ni nujno res. Številne študije (Kenyon s sodel., 2006) so pokazale, da različna prehranska dopolnila pogosto vsebujejo sestavine, ki na embalaži niso zapisane in so lahko na primer tudi potencialni alergeni. Ocenjuje se, da je znanih manj kot 1 % vseh njihovih stranskih učinkov (Bent in Ko, 20045) kar pomeni, da je to področje dejansko zelo problematično.

⁴ Za Maco lahko preberemo: »Maca sama ne vsebuje hormonov, ampak v sebi le skriva snovi, ki v telesu na popolnoma naraven način uravnavajo izločanje hormonov v primernih količinah. Znanstvene raziskave iz leta 1981 so dokazale, da afrodizične lastnosti Maci daje snov izotiocianat. Z isto raziskavo so ugotovili tudi prisotnost glukozinolata, ki dokazano povečuje plodnost.« (Spletna stran: <http://www.svet-je-lep.com/zdrav-duh-v-zdravem-telesu/zdrava-prehrana-in-vegetarijanstvo/koren-maca/>) Dostopno: 1.2. 2016

2.2 MACA-PRILJUBLJENA PREHRANSKO DOPOLNILO NA SLOVENSKEM TRGU

Osnovni botanični podatki o rastlini (povzeto po Gonzales, 2005) so predstavljeni v preglednici 1.

PREGLEDNICA 1 – OSNOVNI BOTANIČNI PODATKI O MACI

Kraljestvo:	<i>Plantae</i> (rastline)
Deblo:	<i>Magnoliophyta</i> (kritosemenke)
Razred:	<i>Magnoliopsida</i> (dvokaličnice)
Red:	<i>Brassicales</i>
Družina:	<i>Brassicaceae</i> (križnice)
Rod:	<i>Lepidium</i> (draguša)
Vrsta:	<i>L. meyenii</i>

Maca (*Lepidium meyenii*) je tradicionalni prehransko dopolnilo, ki izvira iz Južne Amerike (Peru in Bolivija), in spada v družino križnic (lat. *Brassicaceae*). Gojijo jo zaradi njenega mesnatega hipokotila (povezava med embrionalno korenino in semenskim listom, ki jo bomo v nadaljevanju poenostavljeno imenovali gomolj). Ta se uporablja za prehrano in zdravljenje. V Peruju se v ljudski medicini uporablja že več kot 2000 let. Rastlina je znana kot "Perujski ginseng" in se uporablja za krepitev telesne moči in vzdržljivosti, zdravljenje anemije in lajšanja njenih simptomov ter kot afrodiziak. Med ženskami je priljubljena kot sredstvo za uravnavanje menstrualnih nepravilnosti ali drugih težav povezanih z hormonskim neravnovesjem. Od devetdesetih letih 20. stoletja dalje opazamo vedno večje zanimanje za Maco tudi v Evropi. V zadnjem desetletju je prisotna tudi na slovenskem trgu. Izvoz Mace iz Peruja se je od leta 2001 do danes povečal za 6-krat (1.4×10^6 USD v letu 2001 na 6.2×10^6 USD v letu 2010) in še vedno narašča (Gonzales, 2011).

Barva hipokotila je lahko zlata, krem, rdeča vijolična, modra, črna ali zelena. Mace niso različne le po barvi, ampak tudi po prehranskih in terapevtskih lastnostih. Korenina zlato-krem barve je najbolj razširjena in priljubljena v Peruju zaradi svoje velikosti in sladkega okusa. Modra in črna barva Mace imata najvišjo energijsko vrednost (Gonzales, 2005). Rdeča maca se uporablja v kliničnih študijah, saj naj bi vsebovala največjo količino aktivnih učinkovin.

Avtohtona Maca raste izključno v predelu centralnih Andov, na 4000 - 4500 m nadmorske višine. Gomolj rastline mora biti naravno sušen in kot tak zaščiten pred vlago. Čilenci jo jedo v glavnem prekuhano (Gonzales, 2011), in samo njene liste kot svežo zelenjavo.

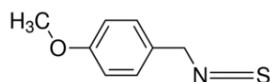


SLIKA 3- POSUŠENI GOMOLJI NARAVNO POSUŠENO ČRNE (ZGORNJI), RUMENE (NA SREDINI) IN RDEČE (SPODAJ) MACE (GONZALES, 2011) TER (DESNO) MACA RASTLINA (NAVITAS NATURALS, 2016)

Zaradi velikega povpraševanja, se rumena Maca danes goji tudi na plantažah.

2.3 KEMIJSKA SESTAVA MACE

Posušeni gomolj Mace (Dini s sodel., 1994) vsebuje: 10,2 % beljakovin⁵, 59 % ogljikovih hidratov, 2,2 % lipidov in 8,5 % vlaknin. Sveži gomolj vsebuje 80 % vode in je bogat z železom in kalcijem (Valerio & Gonzales, 2005). Maščobne kisline, ki so zastopane v Maci so linolenska, palmitinska in oleinska kislina⁶. Maca vsebuje tudi veliko mineralov (železo, kalcij, cink itd.)⁷. V Maci najdemo tudi sekundarne metabolite in alkaloide (Zheng, 2000), ki vključujejo tudi sterole (npr. β -sitosterol). *p*-metoksibenzil izocijanatu pripisujejo afrodizične lastnosti.



SLIKA 4 - *p*-METOKSIBENZIL IZOCIANAT⁸

⁵ Maca vsebuje aminokislino (mg/g beljakovin) kot levcin (91.0mg), arginin (99.4mg), fenilalanin (55.3mg), lizina (54.3mg), glicin (68,30 mg), alanin (63.1mg), valin (79,3 mg), izolevcin (47.4mg), glutaminsko kislino (156,5 mg), serin (50,4 mg) in aspartinsko kislino (91,7 mg). Druge aminokislino so še: histidin (21,9 mg), treonin (33.1mg), tirozin (30.6mg), metionin (28,0 mg), hidroksiprolin (26 mg), prolin (0,5 mg) in sarkozin (0,70 mg).

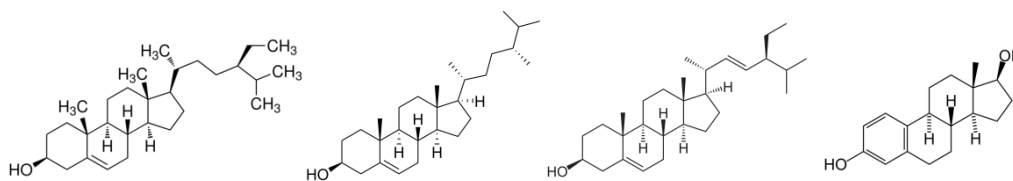
⁶ Nasičene maščobne kisline predstavljajo 40,1%, preostalo so nenasičene maščobne kisline.

⁷ Železo (16.6mg /100 g suhe snovi), kalcij (150 mg /100 g suhe snovi), baker (5.9mg /100 g suhe snovi), cink (3,8 mg / 100 g (16.6mg /100 g suhe snovi), in kalija (2050 mg / 100 g suhe snovi), med drugim (Valerio in Gonzales, 2005).

⁸ Vir za sliko: *p*-methoxybenzyl isocyanate je:

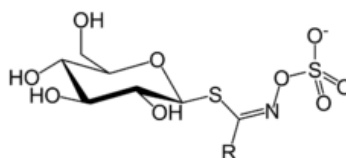
(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/cds017271?lang=en®ion=SI>). Dostopno, 4.3. 2016

Po McCollomu s sodel., (2005) se različni vzorci Mace bistveno razlikuje v deležu sekundarnih metabolitov. Te snovi imajo podobno strukturo kot jo ima estrogen.



SLIKA 5 -(od leve proti desni) β -SITOSTEROL, CAMPESTEROL IN STIGMASTEROL V PRIMERJAVI Z ESTROGENOM (skrajno desno)

V Maci so odkrili različne glukozinolate (Gonzales, 2007) vendar le-ti niso opisani na ravni posameznih snovi. Genyi s sodel. (2001) navaja, da so najbolj pogosti glukozinolati v Maci aromatskih glukozinolat⁹, sledijo benzilni in *p*-metoksibenzil glukozinolati (glej Preglednico 2). Med njimi bi lahko bil tudi I3C. Gonzales (2012) meni, da so Macine aktivne snovi prav glukozinolati (ali snovi, ki so njihovi derivati) in ti delujejo kot fitoestrogeni.



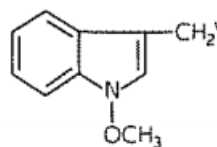
SLIKA 4: STRUKTURA GLUKOZINOLATA; stranska skupina (R) se lahko spreminja. V strukturi je prisotna funkcionalna skupina $-N=C=S$ (izotiociano skupina)

PREGLEDNICA 2 - GLUKOZINATI (GS) V MACI (CARLSON IN DAXENBICHLER, 1987)

ime	zgradba R skupine
1-metilpropil-GS	CH ₃ CH ₂ CHCH ₃
alil-GS	CH ₂ CHCH ₂
3-butenil-GS	CH ₂ CH(CH ₂) ₂ -
2-hidroksi-3-butenil-GS	CH ₂ CHCHOHCH ₂
4-pentenil-GS	CH ₂ CH(CH ₂) ₃
5-metiltiopentil-GS	CH ₃ S(CH ₂) ₅
5-metilsulfinilpentil-GS	CH ₃ SO(CH ₂) ₅ -
2-hidroksi-4-pentenil-GS	CH ₂ CHCH ₂ CHOHCH ₂ -
2-feniletil-GS	C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂ -
3-Indolimetil-GS	

⁹ Ali glukozinat (literatura dopušča obojno poimenovanje).

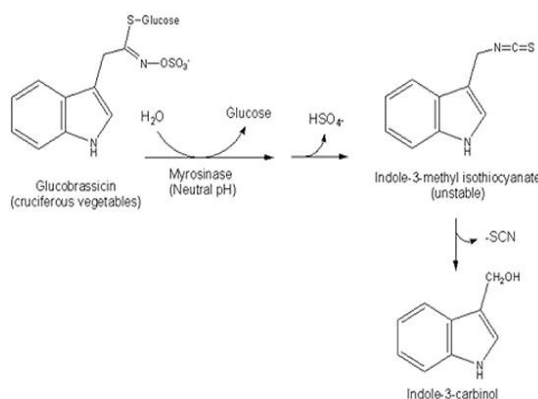
3-(N-metoksi)indolilmetil-GS



(nadaljevanje Preglednice 2)

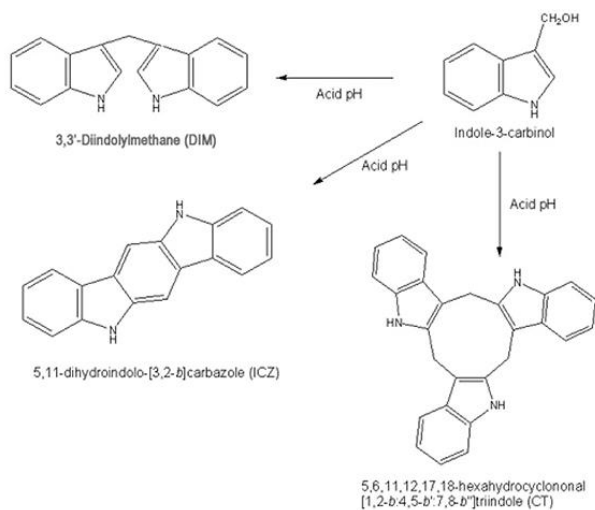
2.6 KEMIJA INDOL-3-KARABINOLA

I3C nastane pri hidrolizi glukobrasicina (tio-glikozida); spojina, ki jo najdemo v večini križnic (zelje, brokoli, ohrovt,...)



SLIKA 6 - HIDROLIZA GLUKOBRASICINA IN NASTANEK I3C (LINUS PAULING INSTITUTE, 2015)

Primerjava zgradbe I3C in stranskih skupin, ki jih najdemo kot aktivne snovi v glukozinatih kažejo strukturno ujemanje z obema indolnima radikaloma (v Preglednici 2 obarvana rožnato). V kislem okolju želodca se I3C molekule lahko med seboj združujejo in tvorijo kisle kondenzacijske produkte (Shertzer s sodel., 2000) – slika 7.



SLIKA 7 – NEKAJ MOŽNIH KONDENZACIJSKIH DERIVATOV I3C (LINUS PAULING INSTITUTE, 2015)

Biološka aktivnost teh snovi se razlikuje od čistega I3C. Predvideva se, da so pravzaprav ti metaboliti odgovorni za biološke učinke, ki jih pripisujejo I3C (Bjeldanes s sodel., 1991). Če je Maca v neaktivni obliki (npr. ko jo skuhamo) je hidroliza glukozinolata počasnejša, deloma pa k temu pripomorejo še encimi bakterij v črevesni flori (Shapiro s sodel., 1998) saj je kislinska hidroliza v alkalnem črevesnem okolju malo verjetna reakcija.

3 PRAKTIČNI DEL

3.1 MACA - OPIS VZORCA

Analizirani so bili naslednji vzorci Mace:

- Maca v prahu (Superfoods ®),
- 500mg Maca tablete (PlanetBio ®),
- 500mg tablete Maca (Now ®).

Vsi trije vzorci Mace so predstavljali rumen prah, zelo slabo topen v vodi in dobro topni v etanolu. Vsi proizvajalci navajajo, da je njihova Maca 100%. Za noben vzorec Mace ni podatka ali gre za črno, rdečo ali rumeno Maco.



SLIKA 8 - MACA (V PRAHU)

Idol-3-karabinol (I3C) je bila kupljen pri Sigma Aldrich (p.a. 99 %). Etanol, ki se je uporabljal kot topilo pri pripravi standardnih raztopin, je bil proizveden pri Mercku (97 %).

Aparature: ATR-FTIR Spectrum Two (Perkin Elmer). Programska oprema Spectrum in Spectrum quant (Perkin Elmer). Analitska tetnica (Kern ALS-A).

3.2 SNEMANJE IR SPEKTROV

Postopek ATR-FTIR meritve:

1. Čiščenje kristala (umetni diamant) s papirnato brisačo in propan-2-olom.
2. Snemanje ozadja.

3. Vzorec Mace položimo direktno na kristal in z ročico zagotovimo dober stik s površino merilnega instrumenta (120 ATR enot).
4. Snemanje spektra (kot poprečje štirih snemanj)¹⁰.

3.3 UMERITVENA PREMICA ZA KVANTIFIKACIJO IDOL-3-KARABINOLA

Zaradi pomanjkanja ustreznih podatkov o vsebnosti I3C v vzorcih Mace, smo na osnovi dostopnih virov predvidevali, da bi se vrednosti skupnih indolnih snovi v Maci lahko gibale med 0.0 – 3.7 mg/g Mace (McNaughton in Marks, 2003). Ker Maca predstavlja zmes različnih spojin, se absorpcijske frekvence posameznih funkcionalnih skupin lahko med seboj tudi prekrivajo, zato je smiselno, da pri izbrani valovni dolžini naredimo korekcijo bazne linije in uporabimo prvi ali drugi funkcijski odvod. Absorbanca analitičnega signala je tako direktno sorazmerna s koncentracijo, c , snovi v preiskovanem vzorcu, zato lahko narišemo graf, kje *ekstinkcijski koeficient*, \mathcal{E} , predstavlja naklon premice v grafu *Absorbanca (A) proti koncentraciji (c)* (Beer-Lambertov zakon):

$$A = \mathcal{E}c$$

Ker je za indolni obroč v IR spektru značilen signal med 1450-1617 cm^{-1} , smo za izris umeritvene premice izbrali to območje.

3.3.1 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN I3C

Pripravili smo etanolne raztopine I3C, kot je prikazano v preglednici 3:

PREGLEDNICA 3 - STANDARDNE RAZTOPINE I3C

Masa I3C ($\pm 0,00001$), g	V (etanol), mL ± 0.05 mL	Koncentracija I3C mg/mL
0	5.00	0.00
0.00501	5.00	1.00 (± 0.01)
0.00850	5.00	1.70 (± 0.02)
0.01011	5.00	2.00 (± 0.02)
0.01452	5.00	2.90 (± 0.03)
0.01860	5.00	3.72 (± 0.04)

¹⁰ Elmer Perkin® spektroskopija s svojo programsko opremo ponuja "predogled (»preview mode«) posnetega spektra in v realnem času spreminjanje "spektralne kakovosti". Ko se doseže zadovoljiva kakovost, posnamemo spekter še enkrat. Pri meritvah ATR debelina vzorec ne vpliva na intenzivnost absorbance.

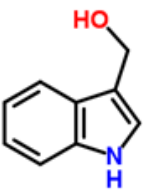
Primer izračuna napake pri pripravi standardnih raztopin:

$$\text{masa I3C: } \frac{0,00001 \times 100}{0,00501} = 0,2\% ; \text{ Prostornina: } \frac{0,05 \times 100}{5,00} = 1\% ; \text{ Skupaj } \underline{\text{napaka: 1.2 \%}}$$

3.4 INTERPRETACIJA IR SPEKTROV

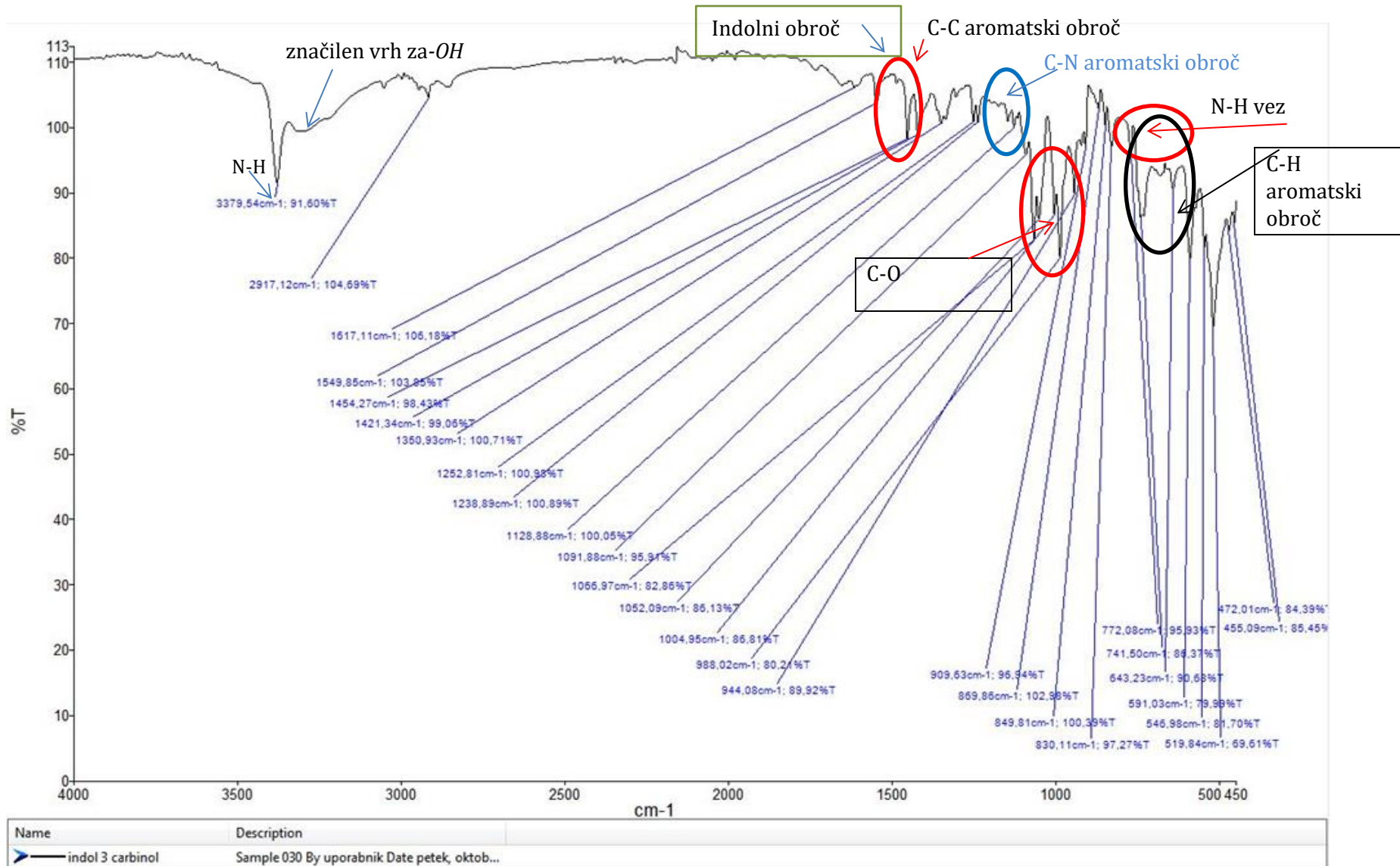
Glede na zgradbo molekule I3C smo pričakovali absorpcijske signale, zapisane v preglednici 4.

PREGLEDNICA 4 - ABSORPCIJSKE SIGNALI ZA I3C

Strukturna formula indol -3-karabinola	Funkcionalna skupina	Valovno število (cm ⁻¹)
	O-H	3200-3500 (vodikove vezi)
	=C-H	3000 - 3100 (1336, 1352)
	-N-H	3400-3280 665-910
	-C=C-	1500 - 1700 (aromatična raztezanje) 1550-1638 ustreza indolnemu obroču (1617 je maksimalno)
	C-C	1617 (aromatski obroč)
	C-N	1238; 1252 sekundarni amin
	-C-O	1050-1260 (primarni alkohol)

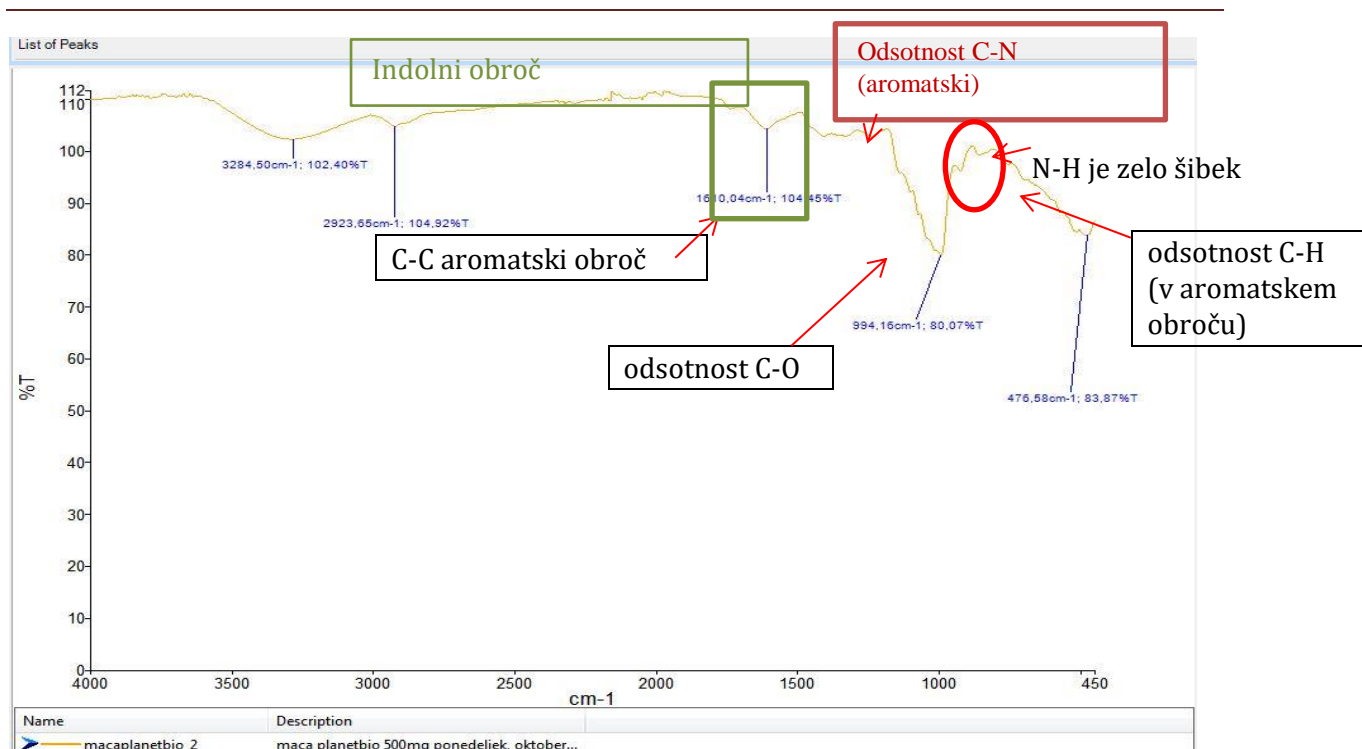
4 REZULTATI MERITEV

V slikah od 9-12 so prikazni IR spektri I3C in vseh treh vzorcev Mace. Sledi interpretacija spektrov.

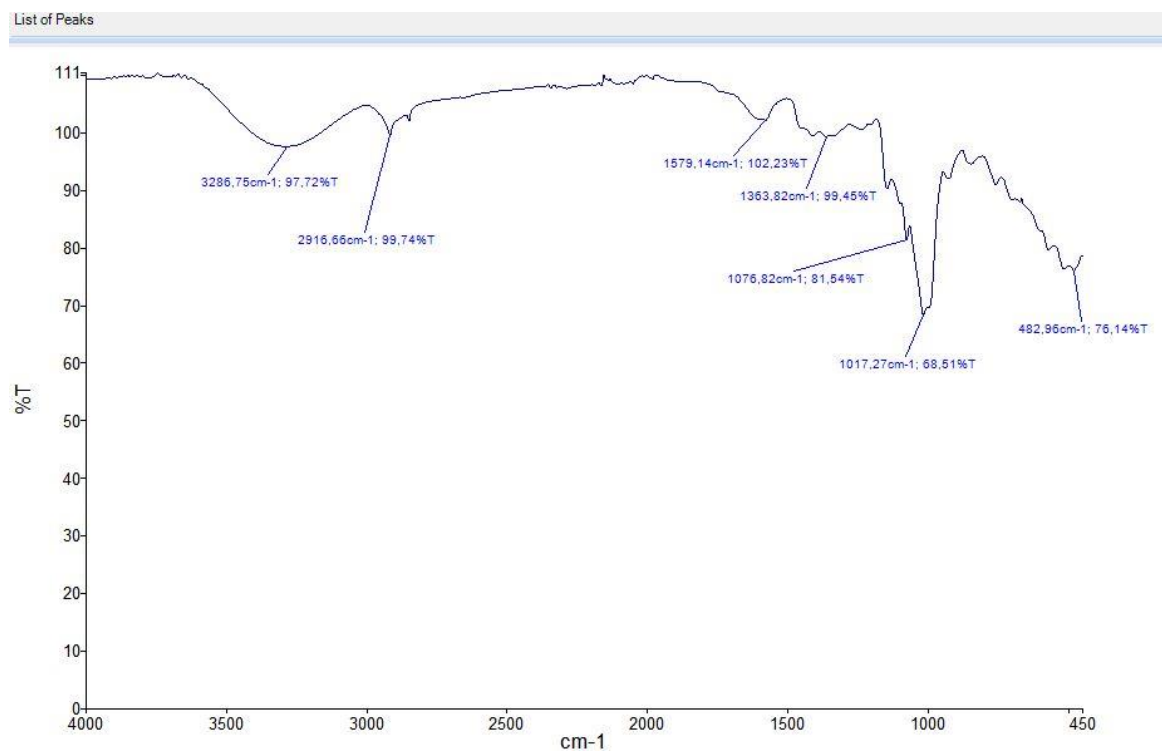


SLIKA 9 - IR SPEKTER INDOL-3-KARBINOLA

3.2 IR SPEKTRI VZORCEV MACE

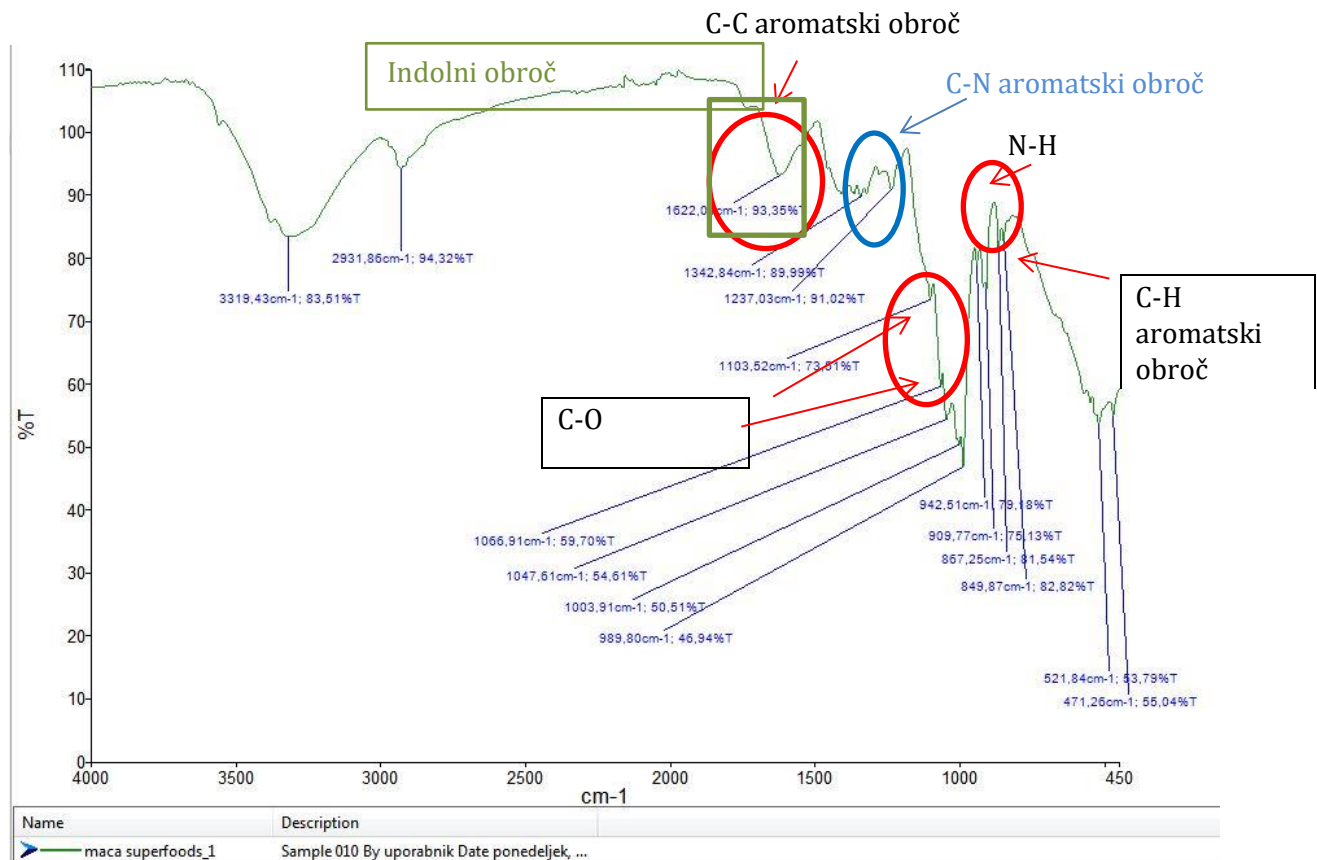


SLIKA 10 - IR SPEKTER MACA 500mg kapsule (PLANETBIO)



SLIKA 11 - IR SPEKTER MACA 500mg kapsule (NOW)

Na spektru (Slika 9) opazimo C-C aromatski signal, C-O signal, zelo šibek signal za inolni obroč, skoraj popolno odsotnost C-N vezi.



SLIKA 12 - IR SPEKTER MACA POWDER (SUPERFOODS)

4 ANALIZA ATR FT-IR SPEKTROV

V IR spektru I3C smo kot pomembne vrhove označili:

- absorbance pri 1239cm^{-1} in 1253cm^{-1} , ki so posledica vibracij zaradi vsebnosti amino skupine (aromatski sekundarni amin). Za *N-H* vez je značilna tudi absorbcija med 722cm^{-1} in 830cm^{-1} .
- Vibracije pri 742cm^{-1} so posledica aromatskih *C-H* nihanj.
- Za indolni obroč značilna absorbcija se pojavi pri 1550cm^{-1} in 1617cm^{-1} .
- Absorbicija pri 1067cm^{-1} , 1092cm^{-1} in 1129cm^{-1} izhaja iz *C-O* raztezanja;
- absorbanca pri 380cm^{-1} zaradi hidroksilne (*O-H*) skupine; ta vrh se prekriva z absorbancami amino skupine *N-H* ter aromatičnih *C-H* raztezanj (vrhovi se prekrivajo).

Karakteristične absorbance za vse tri vzorce Mace smo zbrali v Preglednici 5.

PREGLEDNICA 5 – KARAKTERISTIČNE ABSORBANCE ZA VZORCE MACE

<i>Funkcionalna skupina</i>	<i>Valovno število (cm⁻¹)</i>	<i>Maca v prahu (Superfoods®)</i>	<i>Maca tablete 500mg (PlanetBio®)</i>	<i>Maca 500mg tablete (Now®)</i>
C-H (Aromatski)	860 - 680	850	/	/
N-H (sekundarni amin)	910-665	+	-	-
C-O (vezan alkohol)	1260-1050	1104	/	1077
C-N (aromatski amin)	1350 – 1200	1343 1237	/	/
C = C (aromatski)	1700 - 1500	1622	1610	1579
Alkil C-H	2950 - 2850	2932	2924	2917
C-H (aromatski)	~ 3030	3319	3285	3287
Odsek N-H amin	3500 - 3300			

Legenda: + prisoten značilen vzorec; - odsoten značilen vzorec

Vsi IR spektri vzorcev Mace kažejo značilne absorbance koli 3300cm⁻¹. Prav tako opazimo C-H vrhove pri absorbanci okoli 2925 cm⁻¹ (2932cm⁻¹; 924 cm⁻¹; 917 cm⁻¹). V vseh treh vzorcih so prisotni tudi vrhovi značilni za C = C vez v aromatskih spojinah (1622 cm⁻¹, 1610 cm⁻¹ in 1579 cm⁻¹).

Absorbanca za C-N vez (aromatski amini) se pojavlja samo pri Maca (Superfoods®) vzorcu (1343cm⁻¹ in 1237 cm⁻¹); enako velja za vez N-H (sekundarni amini; 910-665 cm⁻¹). Pri ostalih vzorcih so absorbance zelo šibke in že v območju merilne napake aparature. C-O raztezanje, ki se vidi pri 1104 cm⁻¹ in 1077 cm⁻¹, najdemo samo v vzorcih Mace (Superfoods®) in Maca (Now®).

Ker Spectrum Quantum program omogoča korekcijo bazne linje, smo v nadaljevanju pripravili etanolne standardne raztopine I3C in pri značilnih indolnih absorbancah izračunal delež skupnih indolnih snovi v vzorcih Mace. Etanol kot topilo ne interferira v območju 1620 cm⁻¹.

4.1 UMERITVENA PREMICA ZA KVANTIFIKACIJO IDOL-3-KARABINOLA V VZORCIH MACE

Kot že rečeno, smo se odločili, da je indolni del I3C zanj karakterističen, zato smo v vzorcih Mace želeli določiti delež skupnih indolnih snovi. Umeritveno premico smo naredili za območje med 0.0 do 3.7 mg skupnih indolnih snovi/mL preiskovane snovi. Standardne raztopine I3C so prikazane v preglednici 5. Za vse smo posnete IR spektre uvozili v program Spectrum Quant. Kot karakteristično absorbanco smo izbrali vrh pri 1617cm^{-1} ter Beer-Lambertov zakon kot algoritem za obdelavo podatkov. Da bi se prepričali ali je metoda dovolj zanesljiva in ni interferenc z drugimi podobnimi spojinami, smo 1g vsakega vzorca dodali natančno določeno maso I3C (glej Preglednico 9) in izračunali odstotek obnovitve (metoda standardnega dodatka).

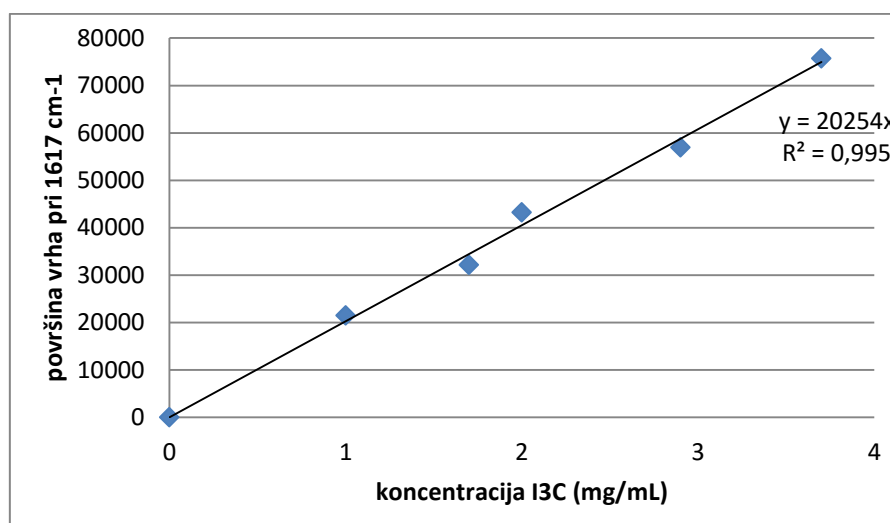
PREGLEDNICA 6 - PODATKI ZA UMERITVENO PREMICO

Koncentracija I3C mg/mL	Površina vrha (povprečje štirih snemanj) na 1617 cm^{-1}	Relativni standardni odklon*
0.0	0	0
1.0	21450	0.11
1.7	32111	0.15
2.0	43167	0.09
2.9	56914	0.21
3.7	75678	0.34

Enačba premice: $y = 20254x$
Korelacijski koeficient (r^2) = 0,995

* Relativni standardni odklon je bil nato izračunan z Excel 2013 funkcijo STDEV.S

GRAF 1 - UMERITVENA PREMICA



Nato smo v programu Spectrum Qant obdelali še naše vzorce Mace, ki smo jih pripravili tako, da smo 1.0000 g ($\pm 1 \times 10^{-4}$) vzorca raztopili v 5 mL etanola. Na osnovi enačbe premice smo izračunali delež skupnih indolnih snovi v vzorcu. Podatki so predstavljeni v Preglednici 7.

PREGLEDNICA 7 - MASA SKUPNIH INDOLNIH SNOVI V VZORCIH MAC (PO I3C)

Vzorec	Površina pod vrhom 1617cm ⁻¹	Koncentracija skupnih indolnih snovi (mg/mL)
<i>Maca v prahu (Superfoods®)</i>	9863	0.487
<i>Maca tablete 500mg (PlanetBio®)</i>	4219	0.208
<i>Maca 500mg tablete (Now®)</i>	3875	0.191

Izračuni:

$$y = 20254 x \quad y - \text{površina} \quad x - \text{koncentracija}$$

Izračun za Maco (Superfoods®):

$$Y = 59863 \quad X = 9863/20254 = \mathbf{0.487 \text{ mg/mL}}$$

Napaka meritve: 1%

Sledil je izračun mase skupnih indolnih snovi v preiskovanih vzorcih ($m = y \times V$)

PREGLEDNICA 8 - MASA SKUPNIH INDOLNIH SNOVI V 1.0 g VZORCIH MACE

Vzorec	Masa skupnih Indolnih snovi (mg)
<i>Maca v prahu (Superfoods®)</i>	2.43 (± 0.02)
<i>Maca 500mg tablete (PlanetBio®)</i>	1.04 (± 0.01)
<i>Maca 500mg tablete (Now®)</i>	0.96 (± 0.01)

Sledila je preverba zanesljivosti metode. 0.0015 g Mace (vsakega vzorca) raztopljenega v 5.00 mL etanola smo razdelili na vsaj 5 enakih delov in v vsakega dodali določeno maso čistega standarda (preglednica 9). 10 mL merilne bučke smo nato dopolnili z deionizirano vodo in opravili meritve. Narisali graf (kot v prvem delu naloge) in po metodi linearne regresije izračunali enačbo premice in na tej osnovi izračunali maso skupnih indolnih snovi v vzorcu. Podatki so zbrani v preglednici 9.

PREGLEDNICA 9 – ZANESLJIVOST METODE (METODA STANDARDNEGA DODATKA)

Vzorec	Masa standarda (mg)		Obnovitev (%)
	dodano	izmerjeno	
<i>Maca v prahu (Superfoods®)</i>	1.50	2.98	100.7
<i>Maca 500mg tablete (PlanetBio®)</i>	1.11	2.19	119.2
<i>Maca 500mg tablete (zdaj®)</i>	1.10	2.18	119.3

Primer izračuna za Superfoods®:
$$\frac{m_1(\text{že prisotna}) + m(\text{dodana}) \times 1000}{m(\text{izmerjeno})} = \frac{(1.50 + 1.50) \times 100}{2.99} = 100,7\%$$

Iz preglednice 9 vidimo, da smo z metodo standardnega dodatka dobili zadovoljive rezultate za Maco (*Superfoods®*), manj pa za ostala dva vzorca. Napaka meritev zaradi priprave raztopin je 1,67%.

5 RAZPRAVA

Identifikacija in kvantifikacija I3C v vzorcih Mace se je izkazala za precej zapleteno, saj ni lahko določiti karakterističen vrh, značilen samo za prisotnost I3C. Ker je Maca mešanica različnih snovi, se vrhovi med seboj prekrivajo. V področju med 860-680cm⁻¹ so vidni signali, ki so posledica aromatskih C-H vibracij. Identificirali smo tudi značilne aromatske C = C (~3030cm⁻¹) vez, amino skupino, N-H, (1350-1200cm⁻¹ in dodatno pri 722-830cm⁻¹) in seveda indolni obroč (1617cm⁻¹).

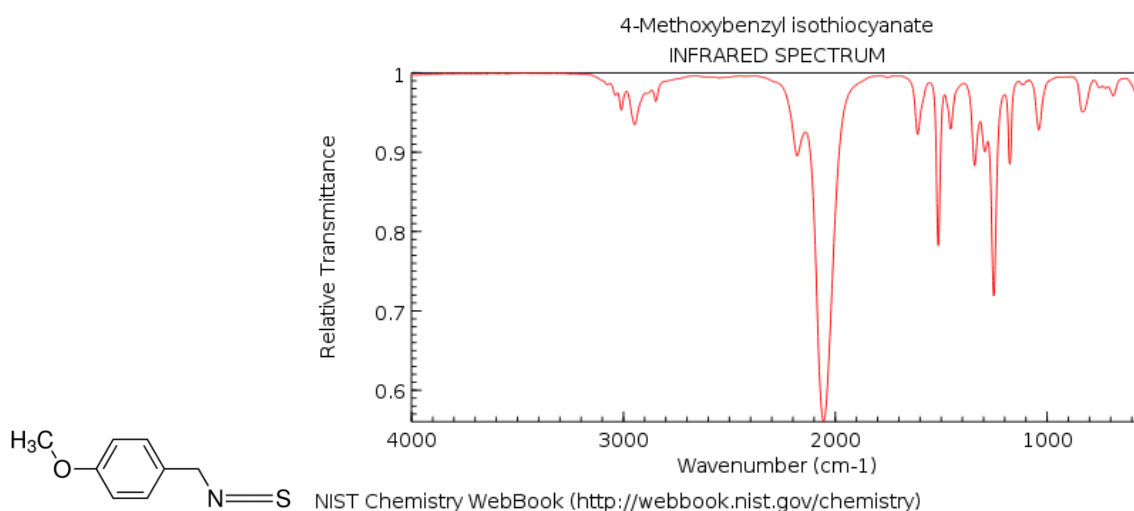
IR spektri vseh treh vzorcev Mace se že na prvi pogled razlikujejo, saj nekateri signali manjkajo, kar pomeni, da njihova sestava ni enaka: pričakovano je bilo, da intenziteta vseh vrhov ne bo enaka, ne pa tudi odsotnost posameznih vrhov (glej preglednico 4).

Primerjava z I3C spektri pokaže največje ujemanje pri **Maci (Superfoods®)**, saj so vsi signali, značilni za I3C, prisotni tudi v spektru tega vzorca. To pomeni, da bi ta vzorec Mace lahko vseboval I3C, druga dva pa zelo malo ali nič. Problem so nizke koncentracije snovi, saj je potrebno upoštevati napako pri pripravi raztopin¹¹. Rezultate bi bilo nujno preveriti še z referenčno metodo (npr. plinska kromatografija). Spektri (**PlanetBio® in Now®**) ne kažejo značilnih vibracij C-N vezi, niti drugih karakterističnih vezi za I3C (npr. C-O), zaradi česar

¹¹ Omejitve analitske tehnice je pet decimalnih mest natančno.

smo zaključili, da I3C ne vsebujejo ali pa v tako nizkih količinah, da smo v območju eksperimentalne napake. Da bi trditev preverili, smo pripravili standardne raztopine I3C in s pomočjo umeritvene premice (zadovoljiv korelacijski faktor ($r^2=0,995$) izračunali skupno vrednost indolnih snovi izraženih kot mg I3C/g Mace. Rezultati so potrdili prva opažanja. Maca v prahu (Superfoods®) je vsebovala 2,43 mg (± 0.02 mg) skupnih indolnih snovi/g vzorca, preostala dva vzorca pa bistveno manj (0.96 mg/g Now® in 1.04 mg/g PlanetBio®).

Ker večina ponudnikov Mace navaja, da le ta kot aktivno snov vsebuje 4-methoxybenzyl isothiocyanate (glej sliko spodaj) smo bili še posebej pozorni na signale pri 3043, 2986, **2913**, 2847, 1974 ($N=C=S$), 1931, **1696** ($C=O$), **1607**, **1511**, 1446, 1405, 1256, 1175, 1082, **861**, **785**, **747**, **677**, **597** cm^{-1} , ki jih Entezari s sodel. (2014) navaja kot karakteristične. Ugotavljamo, da pri Maci (PlanetBio in Now) večine signalov ni, v primeru Superfoods pa se nekateri pojavijo (**okrepljena pisava**). Signali, ki niso poudarjeni, bi lahko bili tudi prekriti.



SLIKA 13 – 4-METOKSIBENZILIZOCIANAT IN NJEGOV IR SPEKTER (VIR: NIST, 2016)

Kako primerljivi so ti rezultati s podatki iz literature? McNaughton in Marks (2003) navajata, da je skupna vrednost glukozinatov v družini križnicah v območju od 0.4 -3.0 mg/g rastline (suha masa). Naši izračuni kažejo na vsebnost med 0.96 – 2.43 mg/g, kar zelo dobro sovпада s temi podatki.

6 ZAKLJUČKI

V raziskovalnem vprašanju smo se spraševali: *Ali vsi tipi Mace, ki je dostopna na slovenskem trgu (Maca v prahu (Superfoods®); 500mg tablete Maca (PlanetBio®) in 500mg tablete*

Maca (Now ®)), vsebujejo indolne spojine (izražene kot ekvivalent I3C, in v kakšnem obsegu?«. Ker gre za rastlinski ekstrakt, smo predvidevali, da bo sestava različna (v kontekstu koliko je prisotnih aktivnih snovi), ne pa tudi katere snovi so prisotne. Ugotovljeno je bilo, da, sestava vseh treh vzorcev Mace ni enaka. Izstopa vzorec Superfood, za katerega je bilo ugotovljeno, da vsebuje največ skupnih indolnih snovi (izraženih v ekvivalentih I3C) in sicer 2.43mg (± 0.02 mg). Pri drugih dveh vzorcih je delež I3C okrog 1mg, kar je očitno pod detekcijsko mejo aparata ali pa teh snovi v vzorcih ni¹². S korekcijo bazne linije pri 1617 cm⁻¹, ki je značilen za indolni obroč, smo dobili zadovoljivo zanesljivost le za *Maca v prahu (Superfoods®)*, pri drugih dveh vzorcih je napaka okoli 20%, kar je preveč.

S tem smo prvo hipotezo delno potrdili. Indolne spojine so prisotne v preučevanih vzorcih Mace, vendar v dveh od treh vzorcev v količinah, ki so na detekcijski meji aparata.

Druga hipoteza ni bila potrjena; pričakovali smo, da bo vsebnost skupnih indolnih snovi nižja kot 0.4 mg/g suhe snovi, vendar smo za vse tri vzorce dobili višje vrednosti; vendar ne višjih, kot jih navaja literatura za družino križnic, to je 3.9 mg/g (Shapiro s sodel., 2001), kar nakazuje na relativno veljavnost uporabljene metode.

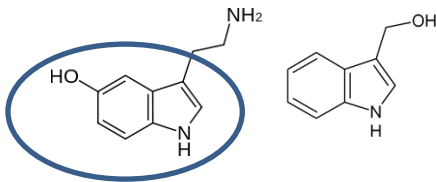
ATR FTIR spektroskopija se je izkazala kot ustrezna tehnika za primerjavo vzorcev Mace, ki naj bi vse predstavljale 100% Maco. Vzorci se med seboj precej razlikujejo, kar bi lahko pripisali tudi naravnemu nihanju aktivnih snovi in seveda različnim virom ali pa čistoča ni 100%. Omeniti velja, da na embalaži ni nikjer zapisano ali gre za zlato (rumeno) ali krem (rumena?) Maco, niti (točno) kje je bila pridelana. Rumena (in zlata) Maca imata veliko prehransko vrednost, vendar ne tudi terapevtsko in sta praviloma gojeni. Maca z največjo terapevtsko vrednostjo je rdeča, ki jo je najtežje gojiti, saj raste izključno v visokogorju in ne na poljih (kot gojena). Te na slovenskem trgu ni.

Za potrditev naših rezultatov bi morali opraviti še referenčno raziskavo, ki bi vključevala detekcijo več različnih, potencialno aktivnih, snovi v Maci. Prav tako bi morali med seboj primerjati različne vrste Mace (rumena in rdeča/vijolična/črna), da bi lahko postavili ustrezne, zanesljive zaključke.

V farmakoloških študijah se kot terapevtski odmerek Mace navaja količina med 1- 3g (Zheng s sodel., 2000; Cicero s sodel., 2001). I3C kot prehransko dopolnilo pa naj bi imel

¹² Elmer Perkin navaja, da v primeru, ko je vzorcu prisotne manj kot 1% preiskovanih snovi, tega signala ne vidimo.

farmakološke učinke šele pri 200mg/dan (Wong s sodel., 1997), kar nakazuje, da je I3C morda le ena od možnih aktivnih snovi, glede na količino, ki smo jo našli, pa zagotovo ne najpomembnejša z vidika uravnavanja hormonskega neravnovesja. Zato je študijo potrebno nadaljevati še s preskušanjem na druge fitoestrogenske snovi prisotne v Maci. Zaradi strukturnih podobnosti s serotoninom, pa vsekakor lahko ima tudi v nizkih koncentracijah pozitivne učinke.



SLIKA 14- STRUKTURNA PODOBNOST SERATONINA (levo) IN I3C (desno)

Prehranska dopolnila lahko kupimo v specializiranih drogerijah, hipermarketih, običajnih trgovinah, preko spleta in tudi v lekarnah. Za nakup Mace samo v Sloveniji obstaja šest spletnih trgovin, ki jo ponujajo kot »čudež iz Andov«. Za ta »čudež« smo v nalogi ugotovili, da zagotovo ni odgovoren indol-3-karabinol in, da njena sestava zagotovo ni standardizirana.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Maca je na voljo je vseh drogerijah in lekarnah. Vsebina oglaševanj preko spleta je (vsebinsko) zelo podobna. Vsi ponudniki priporočajo od 3-5 g/dan (čajna žlička) ali 3-6 tablet (kaspul) dnevno. Večina jih uporablja oznake »BIO«, »Eko«, »organska«, »100% naravno« in »premium« in prav vsi zatrjujejo, da je to produkt v celoti pridelan in predelan na tradicionalen način v neokrnjenem Andskem visokogorju. Dejstvo je, da 3.0 – 5.0 g/dan presega odmerke, ki so bili uporabljeni v (redkih) kliničnih študijah in, da se priporočila za uporabnike nanašajo na uporabo čajnih žličk ali priloženih meric, kar uporabo snovi naredi samo še manj natančno in bolj problematično. Maca na slovenskem trgu še ni bila testirana s strani pooblaščenih zdravstvenih organizacij, čeprav na vseh spletnih strani najdemo »dokaze«, o njeni zdravstveni učinkovitosti (tudi ti so bolj ali manj identično prepisani). Maca, ki je na slovenskem trgu, ni pregledana glede vsebnosti kakršnikoli onesnažil (npr. kontaminacija z biocidi ali težkimi kovinami); njena sestava ni standardizirana, zato se količina aktivnih snovi lahko zelo spreminja (posledica rasnih razmer in ekstrakcijskih tehnik) in samo ugiba se katera aktivna snov (ali več njih) ima lahko zelene (in morda tudi neželen) učinke. Zelo hitro lahko pride do predoziranja, mogoče pa je seveda tudi to, da v »čudežnem«

prahu ni ničesar od tega kar naj bi učinkovalo. Tudi o interakcijah aktivnih učinkovin v kombinaciji z zdravili vemo zelo malo ali včasih nič. Zato neželeni učinki res niso poznani (kot trdijo ponudniki). Ker jih kupujemo preko spleta ali v hipermarketih, nas nihče niti opozoril ne bo, da so mogoči. Zato menimo, da velika previdnost pri čudežnih prehranskih dopolnilih ni odveč; to velja tudi za Maco. Orientacija k uživanju lokalno pridelane hrane (ohrovt, brokoli, zelje) je z vidika varne in uravnotežene prehrane vsekakor bolj priporočljiva.

LITERATURA

Članki

Bent, S. and Ko, R. (2004). Commonly used herbal medicines in the United States: a review. *The American Journal of Medicine*, 116(7), pp.478–485.

Bjeldanes, L., Kim, J., Grose, K., Bartholomew, J. and Bradfield, C. (1991). Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(21), pp.9543-9547.

Bogani, P. and Simonini, F. (2006). *Lepidium meyenii*(Maca) does not exert direct androgenic activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 104(3). pp. 415–417.

Bradlow, H., Michnovicz, J., Telang, N. and Osborne, M. (1991). Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice. *Carcinogenesis*, 12(9), pp.1571-1574.

Bradlow, H., Sepkovic, D., Telang, N. and Osborne, M. (1995). Indole-3-carbinol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 768(1), pp.180-200.

Campbell, N., Clark, J., Stecher, V., Thomas, J., Callanan, A., Donnelly, B., Goldstein, I. and Kaminetsky, J. (2013). Adulteration of Purported Herbal and Natural Sexual Performance Enhancement Dietary Supplements with Synthetic Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors. *The Journal of Sexual Medicine*, 10(7), pp.1842-1849.

Carlson, D. and Daxenbichler, M. (1987). Glucosinolates in Crucifer Vegetables: Broccoli, Brussels Sprouts, Cauliflower, Collards, Kale, Mustard Greens, and Kohlrabi. *J. AMER. SOC. HORT. SCI*, 112(1), pp.173-178.

Cicero, A., Bandieri, E. and Arletti, R. (2001). *Lepidium meyenii* Walp. improves sexual behaviour in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2-3), pp.225-229.

Conaway, C., Getahun, S., Liebes, L., Pusateri, D., Topham, D., Botero-Omary, M. and Chung, F. (2000). Disposition of Glucosinolates and Sulforaphane in Humans After Ingestion of Steamed and Fresh Broccoli. *Nutrition and Cancer*, 38(2), pp.168-178.

Corazza, O., Demetrovics, Z., van den Brink, W. and Schifano, F. (2013). ‘Legal highs’ an inappropriate term for ‘Novel Psychoactive Drugs’ in drug prevention and scientific debate. *International Journal of Drug Policy*, 24(1), pp.82-83.

Danger, D., Baldwin, W. and LeBlanc, G. (1992). Photoaffinity labelling of steroid-hormone-binding glutathione S -transferases with [3 H]methyltrienolone. Inhibition of steroid-binding activity by the anticarcinogen indole-3-carbinol. *Biochem. J.*, 288(2), pp.361-367.

Dini, A., Migliuolo, G., Rastrelli, L., Saturnino, P. and Schettino, O. (1994). Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chemistry*, [online] 49(4), pp.347-349. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0308814694900035> [Accessed 26 Jan. 2016].

- Entezari, N., Akhlaghinia, B., Rouhi-Saadabad, H. (2014). Direct and Facile Synthesis of Acyl Isothiocyanates from Carboxylic Acids Using Trichloroisocyanuric Acid/Triphenylphosphine System. *Croat. Chem. Acta* 87 (3) (2014) 201–206. <http://dx.doi.org/10.5562/cca2381> (dostopno 4.2. 2016).
- Gasco, F., Cordova, M. and Chung, A. (2004). Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m). *Journal of Endocrinology*, 180(1), pp.87-95.
- Genyi Li (2001). Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Ecomoc Botany*. Col. 55, Issue 2, pp 255-262
- Gonzales, F., Yucra, S., Rubio, J. and Villegas, M. (2007). Dose-response effect of Red Maca (*Lepidium meyenii*) on benign prostatic hyperplasia induced by testosterone enanthate. *Phytomedicine*, 14(7-8), pp.460–464.
- Gonzales, G., Cordova, A., Vega, K., Chung, A., Villena, A., Gonez, C. and Castillo, S. (2002). Effect of *Lepidium meyenii* (MACA) on sexual desire and its absent relationship with serum testosterone levels in adult healthy men. *Andrologia*, 34(6), pp.367-372.
- Gonzales, G., Cordova, A., Gonzales, C., Chung, A., Vega, K., Villena, A. (2011). *Lepidium meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. *Asian J Androl* 2011 Dec; 3: 301-303
- Guo, D., Schut, H., Davis, C., Snyderwine, E., Bailey, G. and Dashwood, R. (1995). Protection by chlorophyllin and indole-3-carbinol against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4,5- b]pyridine (PhIP)-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Carcinogenesis*, 16(12), pp.2931-2937.
- Kenyon, S., Button, J., Perella, P., McKeown, D., Holt, D. and Chem, E. (2006). An Herbal Remedy for Impotence: More Than Was Bargained For. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 46(11), pp.1379-1381.
- Kim, D., Lee, K., Han, B., Ahn, B., Bae, J. and Jang, J. (1994). Biphasic Modifying Effect of Indole-3-carbinol on Diethylnitrosamine-induced Preneoplastic Glutathione S-Transferase Placental Form-positive Liver Cell Foci in Sprague-Dawley Rats. *Japanese Journal of Cancer Research*, 85(6), pp.578-583.
- Kojima, T., Tanaka, T. and Mori, H. (1994). Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female Donrye rats by dietary indole-3-carbinol. *Cancer Res.*, 1(54), pp.1446–1449.
- Lampe, J. and Kristal, A. (2002). Brassica Vegetables and Prostate Cancer Risk: A Review of the Epidemiological Evidence. *Nutrition and Cancer*. 42(1). pp. 1-9.
- Lewis, R. W. Fugl-Meyer, K. S. Corona G. (2010). Definitions/epidemiology/riskfactors for sexual dysfunction. *Journal of Sexual Medicine*, 7(4), pp. 598–1607.
- McAlindon, T., Gulin, J., Chen, T., Klug, T., Lahita, R. and Nuite, M. (2001). Indole-3-carbinol in women with SLE: effect on estrogen metabolism and disease activity. *Lupus*, 10(11), pp.779-783.

- McCullom, M., Villinski, J., McPhail, K., Craker, L. and Gafner, S. (2005). Analysis of macamides in samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS. *Phytochem. Anal.*, 16(6), pp.463-469.
- McNaughton, S. and Marks, G. (2003). Development of a food composition database for the estimation of dietary intakes of glucosinolates, the biologically active constituents of cruciferous vegetables. *BJN*, 90(03), p.687.
- Michnovicz, J. (1998). Increased estrogen 2-hydroxylation in obese women using oral indole-3-carbinol. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 22(3), pp.227-229.
- Niwa, T., Swaneck, G. and Leon Bradlow, H. (1994). Alterations in estradiol metabolism in MCF-7 cells induced by treatment with indole-3-carbinol and related compounds. *Steroids*, 59(9), pp.523-527.
- Oganesian, A., Hendricks, J. and Williams, D. (1997). Long term dietary indole-3-carbinol inhibits diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis in the infant mouse model. *Cancer Letters*, 118(1), pp.87-94.
- Preobrazhenskaya, M., Bukhman, V., Korolev, A. and Efimov, S. (1993). Ascorbigen and other indole-derived compounds from Brassica vegetables and their analogs as anticarcinogenic and immunomodulating agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 60(2), pp.301-313.
- Reed G., et al. (2005) A phase I study of indole-3-carbinol in women: tolerability and effects. *Cancer Epidemiologic Biomarkers Prev.*, 14(8). pp. 1953-1960.
- Rouzaud, G. (2004). Hydrolysis of Glucosinolates to Isothiocyanates after Ingestion of Raw or Microwaved Cabbage by Human Volunteers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 13(1), pp.125-131.
- Shapiro, T., Fahey, J. and Stephenson, K. (1998). Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *PubMed*, 7(12), pp.1091-1100.
- Shertzer, H. and Senft, A. (2000). The Micronutrient Indole-3-Carbinol: Implications for Disease and Chemoprevention. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17 pp.1-4.
- Stoner, G., Adam-Rodwell, G. and Morse, M. (1993). Lung tumors in strain a mice: Application for studies in cancer chemoprevention. *Journal of Cellular Biochemistry*, 53(S17F), pp.95-103.
- Suto, A., Bradlow, H., Wong, G., Osborne, M. and Telang, N. (1992). Persistent estrogen responsiveness of ras oncogene-transformed mouse mammary epithelial cells. *Steroids*, 57(6), pp.262-268.
- Tanaka, T., Mori, Y., Morishita, Y., Hara, A., Ohno, T., Kojima, T. and Mori, H. (1990). Inhibitory effect of sinigrin and indole-3-carbinol on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in male ACI/N rats. *Carcinogenesis*, 11(8), pp.1403-1406.
- Taylor, M. (2012). Complementary and alternative medicine preparations used to treat symptoms of menopause. *Menopausal Medicine*, 20, pp.1-8.

Telang, N., Suto, A., Wong, G., Osborne, M. and Bradlow, H. (1992). Induction by Estrogen Metabolite 16 β -Hydroxyestrone of Genotoxic Damage and Aberrant Proliferation in Mouse Mammary Epithelial Cells. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 84(8), pp.634-638.

Trivedi, M., Tallapragada, R. and Branton, A. (2015). Biofield Treatment: A Potential Strategy for Modification of Physical and Thermal Properties of Indole. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 02(04), p.152.

Valerio, G., and Gonzales, F. (2005) Toxicological aspects of the South American herb scat's claw (*Uncaria tomentosa*) and maca (*Lepidium meyenii*): a critical synopsis. *Toxicological Reviews*, 1(24), pp. 11–35.

Vazquez-Vuelvas, O.F., Hernandez-Madriral, J.V., Gavino, R., Tlenkopatchev, M.A. Morales DM (2011), X-ray, DFT, FTIR and NMR structural study of 2,3-dihydro-2-(R-phenylacylidene)-1,3,3-trimethyl-1H-indole. *J Mol Struct*, (987), pp.106-118.

Wong GY, Bradlow L, Sepkovic D, Mehl S, Mailman J, Osborne MP. Dose-ranging study of indole-3-carbinol for breast cancer prevention. *J Cell Biochem Suppl*. 1997;28-29:111-116. ([PubMed](#))

Yuan, F., Chen, D. and Liu, K. (1999). Anti-estrogenic activities of indole-3-carbinol in cervical cells: implication for prevention of cervical cancer. *Anticancer Res.*, 3(19), pp.1673-1680.

Yildiz, F. (2005). *Phytoestrogens in Functional Foods*. Taylor & Francis Ltd, pp.3–5, 210–211.

Zheng, B. and Kimetal, C. (2000). Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology*, 55(4), pp.598–602.

Knjige in publikacije

Crenshaw, T. and Goldberg, J. (1996). *Sexual pharmacology*. New York: Norton.

Pravilnik o prehranskih dopolnilih. Uradni list RS, št. 52/00, 42/02 in 47/04 – ZdZPZ

Schore, Neil E. (2011). *Organic Chemistry Structure and Function* 6th edition. W. H. Freeman.

Spletne strani

Auborn, et al. (2003). *Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen*. - *PubMed - NCBI*. [online] Ncbi.nlm.nih.gov. Dostopno: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12840226> [Dostopno 26 Jan. 2016].

Bruker.com, (2013). *Bruker Corporation: ALPHA - Overview*. [online] Dostopno: <https://www.bruker.com/products/infrared-near-infrared-and-raman-spectroscopy/ft-ir-routine-spectrometers/alpha/overview.html> [Accessed 27 Jan. 2016].

Medilexicon.com, (n.d.). *Xenoestrogen -- Medical Definition*. [online] Dostopno: <http://www.medilexicon.com/medicaldictionary.php?t=100174> [Dostopno 25 Jan. 2016].

Linus Pauling Institut: naturaldatabase.therapeuticresearch.com, (n.d.). **INDOLE-3-CARBINOL** Monograph: Natural Medicines Comprehensive Database. [online] Dostopno: <http://naturaldatabase.therapeuticresearch.com/nd/Search.aspx?cs=&s=ND&pt=100&sh=1&id=1027> [Dostopno 11 Dec. 2015].

Naturecures.co.uk, (n.d.). *NATURE CURES A-Z of Natural Foods and Nutritional Benefits*. [online]
Dostopno: <http://www.naturecures.co.uk/a-zkitchencures.htm> [Dostopno 25 Jan. 2016].

Ruiz-Luna, A., Salazar, S., Aspajo, N., Rubio, J., Gasco, M. and Gonzales, G. (2005). *Lepidium meyenii* (Maca) increases litter size in normal adult female mice. *Reprod Biol Endocrinol*, [online] 3(1), p.16. Dostopno: <http://www.rbej.com/content/3/1/16> [Dostopno 27 Jan. 2016].

Sandberg, G. and Ernstsén, A. (1987). Dynamics of indole-3-acetic acid during germination of *Picea abies* seeds. *Thee Physiology*, [online] 3, pp.185-192. Dostopno: <http://treephys.oxfordjournals.org/content/3/2/185.full.pdf> [Dostopno 27 Jan. 2016].

Wong, G., et al. (1997). Dose-ranging study of indole-3-carbinol for breast cancer prevention. - PubMed - NCBI. [online] [Ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov). Dostopno :<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9589355> [Dostopno 16 Nov. 2015].

TGA. (2006). Medsafe. Interim Joint Expert Advisory Committee on Complementary Medicine. Meeting 3 [online] Dostopno: <http://www.medsafe.govt.nz/Profs/class/classintro.asp> [Dostopno 1 Dec. 2015].