

**IZOFLAWONY – STRUKTURA, AKTYWNOŚĆ
BIOLOGICZNA ORAZ METODY OZNACZANIA
PRZY UŻYCIU WYSOKOSPRAWNEJ
CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ**

**ISOFLAVONES – STRUCTURE, BIOLOGICAL ACTIVITY
AND DETERMINATION BY HIGH PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Ilona Bachanek, Marian Czauderna

*Institut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego
Polska Akademia Nauk
ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna
e-mail: i.bachanek@ifzz.pan.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Struktura

2. Aktywność biologiczna izoflawonów

3. Metody oznaczania izoflawonów

3.1. Przygotowanie próbki do oznaczania izoflawonów

3.1.1. Ekstrakcja

3.1.2. Sonifikacja

3.1.3. Refluxing – mrożenie

3.2. Użycie standardu wewnętrznego

3.3. Chromatograficzne techniki oznaczania izoflawonów

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

mgr inż. Iłona Bachanek – absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej oraz Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Obecnie doktorantka w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN. Zajmuje się metodami analizy chromatografii cieczowej związków biologicznie aktywnych w paszy oraz treści układu pokarmowego, krwi i moczu u zwierząt gospodarskich.

prof. dr hab. Marian Czauderna – studiował chemię (w latach 1971–1976) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (UW), doktoryzował się (1980 r.) na Wydziale Chemii UW natomiast habilitował się (2000 r.) na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt, Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu. Od roku 1995 jest pracownikiem Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN. Tytuł naukowy profesora uzyskał w 2008 r. Jego zainteresowania naukowe dotyczą, m.in. badania wpływu dodatków związków seleniu, izomerów CLA i olejów roślinnych do dawki pokarmowej na zawartość aminokwasów (szczególnie egzogennych), tokoferoli, kwasów tłuszczowych, wskaźników rozmiaru syntezy białka bakteryjnego oraz wybranych pierwiastków w tkankach i narządach wewnętrznych zwierząt gospodarskich.

ABSTRACT

Isoflavones are a subclass of flavonoids and are also described as phytoestrogen compounds, since they exhibit estrogenic activity (similar effects to estradiol hormones). The basic characteristics of isoflavone structure is a flavone nucleus, composed of two benzene rings (A and B) linked to a heterocyclic ring C (Fig. 1). The benzene ring B position is the basis for the categorization of a flavanoid class (position 2) and a isoflavonoid class (position 3) [8]. Isoflavones are classified according to substitutions. The glucoside forms can be esterified at the 6''-O-position of the glucose ring with malonyl or acetyl groups forming another compounds.

In food and plants, flavonoids exist primarily as 3-O-glycosides and polymers [14]. Isoflavonoids are a group of chemical compounds which is widely distributed in the vegetable world. Their biological activity has found remarkable pharmaceutical, therapeutic, dietary and nutritional applications. The structure of phytoestrogens enables them to bind to the estrogen receptors (ERs), they are similar to 17 β -estradiol, contain an aromatic ring with hydroxyl group and have the binding affinity to both estrogen. In addition, isoflavones interact with the metabolism of steroid hormones. Recently, they have come into focus of interest due to several reports about their positive effect on human health, in particular prevention of hormone-dependent cancers, cardiovascular diseases, osteoporosis, adverse menopausal manifestations and age-related cognitive decline.

To identify the potential health benefits associated with the consumption of isoflavones, it is of critical importance to have high-quality and comprehensive data. To this end, adequate analytical methodologies are essential for a reliable and exact identification as well as for quantification. Moreover, methodologies and techniques used need to keep up with technology to improve the performance in terms of resolution, efficiency, precision, reproducibility and speed, allowing a proportionate increase in the amount and quality of information gathered [7].

Common methods for the extraction of isoflavones from soybeans and soy products include organic solvent extraction with aqueous methanol, ethanol or acetonitrile, using simple mixing, ultra-sonification or refluxing techniques [24].

The application of micro-scale and nano-scale extraction and separation techniques is the most likely future development, resulting in quick, sensitive analytical methods for sample preparation and analysis of flavonoids and their metabolites. Miniaturization, high-throughput systems utilizing new sorbents and automation of chromatographic systems are of great interest in clinical, pharmaceutical, environmental and food fields. The most used analysis technique for the quantification of isoflavones in solid samples is, with no doubt, reversed-phase HPLC using C18 based columns with water and methanol or acetonitrile containing small amounts of acid as a mobile phase [7].

Keywords: isoflavone, sample preparation, determination, high performance liquid chromatography (HPLC)

Słowa kluczowe: izoflawony, przygotowanie próbek, oznaczanie, wysokosprawna chromatografia cieczowa

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ERs	- receptor estrogenowy
ER α	- receptor estrogenowy α
ER β	- receptor estrogenowy β
HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa
GC-MS	- chromaogrfa gazowa ze spektrometrem mass
UHPLC	- ultrasprawnna/ultraciśnienowa chromatografia cieczowa
UV/VIS	- spektrofotometria z zakresu promieniowanie ultrafioletowego i widzialnego
DAD	- detektor z matrycą fotodiodową
MS	- spektrometria mas
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy
DMBA	- 7,12-dimetylobenzo[α]antracen
IGF -1	- insulinopodobnego czynnika wzrostu 1
IR	- spektroskopia w podczerwieni
NMR	- spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
LLE	- ekstrakcja ciecz-ciecz
SPE	- ekstrakcja do fazy stałej
IS	- standard wewnętrzny
CE	- elektorforeza kapilarna
RP-LC	- chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
ED	- detektor elektrochemiczny
FL	- detektor fluorescencyjny
DMSO	- dimetylosulfotlenek
PVDF	- polifluorek winylidenu

WPROWADZENIE

Izoflawony z chemicznego punktu widzenia są aromatycznymi polifenolami o budowie zbliżonej do budowy hormonów steroidowych, jednak nie są pochodnymi cholesterolu. Dlatego też nazywane są hormonami niesteroidowymi, które to w organizmie zwierząt i ludzi mogą wykazywać działanie hormonalne.

Naturalnie izoflawony występują w ponad 300 rodzajach roślin, najczęściej w ich korzeniach i nasionach [1]. W znacznych ilościach można je znaleźć w soi, koniczynie czerwonej, nasionach roślin bobowatych, soczewicy oraz szpinaku. Mogą być produkowane przez niektóre rodzaje bakterii i grzyby. Zawartość izoflawonów w poszczególnych roślinach zależy od gatunku, warunków klimatycznych oraz jakości uprawy i waha się pomiędzy 560 a 3810 mg/kg [2]. Spożycie tych związków w krajach europejskich i azjatyckich jest diametralnie różne. Mieszkańcy Holandii, Włoch i Wielkiej Brytanii dziennie przyjmują od 3 do 11 mg izoflawonów, natomiast Japończycy i Koreańczycy od 23 do 200 mg/dzień [3,4].

W roślinach izoflawony występują głównie w wakuolach komórkowych w postaci wolnej lub w formie glukokoniugatów takich jak: daidzina, genistina, glicytina, onionin i sissotrin, które są biologicznie nieaktywne. Obok tych związków, występują pośrednie produkty metabolizmu glukozydów jakimi są formy malonylo i acetylo glukozowe. W organizmie zwierząt i ludzi wszystkie formy są hydrolizowane przez enzymy układu pokarmowego oraz jego mikroflorę do form aktywnych jakimi są – aglikony, kolejno: daidzeina, genisteina, glicyteina, formononetyna oraz biochanina A [5]. Analiza stężenia poszczególnych częścieczek jest istotna dla oszacowanie form aktywnych oraz form glukozowych, co ma znaczenie w badaniach nad wpływem tych związków na procesy fizjologiczne.

Od wielu lat wzrasta liczba doniesień naukowych opisujących wpływ izoflawonów na aktywność biologiczną i farmakologiczną w organizmie zwierząt i ludzi. Ich struktura chemiczna jest podobna do 17- β -estradiolu, dzięki czemu zdolne są do wiązania receptorów estrogenowych, przy czym wyższe powinowactwo mają w stosunku do ER- β niż ER- α . Co więcej, mogą wpływać na aktywację zarówno genomowego jak i niegenomowego szlaku sygnalizacji estrogenów. Ponadto związki te wpływają na metabolizm hormonów steroidowych. Dzięki tym właściwościom możliwe jest działanie na mechanizm regulujący procesy fizjologiczne (np. wpływ na rozwój nowotworów hormonozależnych, metabolizm lipidów oraz witamin z grupy D) [6].

Istnieje wiele technik analitycznych pozwalających na oznaczanie związków izoflawonowych. Najlepiej poznanymi i wykazującymi największą czułość są chromatografia gazowa (GC-MS) lub chromatografia cieczowa (HPLC lub UHPLC) z detekcją UV/VIS lub spektrometrią mas. Przedmiotem tego artykułu jest przegląd publikacji dotyczących analiz związków izoflawonowych metodą HPLC w materiale pochodzenia sojowego. Głównym zagadnieniem na które należy zwrócić uwagę przy oznaczaniu tych związków jest odpowiednio dobrana procedura ekstrakcji badanego materiału oraz optymalizowanie rozdzielania chromatograficznego koniuga-

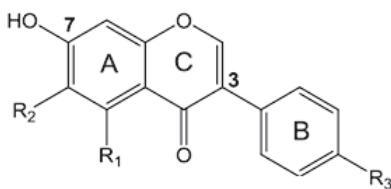
tów (malonylo, acetylo i form glukozowych), które niejednokrotnie ulegają elucji bez zadowalającego rozdzielania analizowanych związków [7].

1. STRUKTURA

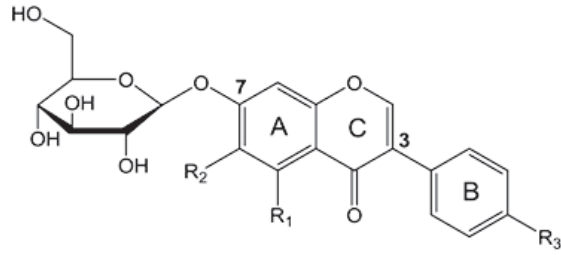
Flawonoidy do których zaliczamy: izoflawony, katechiny, antocyjanidyny, flawonole, flawony, flawanony i flawanonole stanowią jedną z ważniejszych grup polifenoli. Są naturalnymi pochodnymi 2-fenylochromen-4-onu (2-fenilo-1,4-benzopiron) tzw. flawonu [8]. Ich struktura opiera się na 15 węglowym szkielecie C6-C3-C6 w niektórych publikacjach oznaczana jako pierścieniowa forma A+C+B. Poniżej (Rys. 1) przedstawiony jest podstawowy model budowy związków flawonowych. Pierścień C6-C3 (A+C), zwany chromonem powstaje na drodze redukcji kwasu cynamonowego do kwasu kumarowego, natomiast pierścień C6-C1 (B) w wyniku kondensacji trzymolowych fragmentów malonylo-koenzymu A i połączony jest z pierścieniem C3 (C) poprzez węgiel C-2 lub C-3 [9].

W ogólnym wzorze izoflawonowym obecny jest tlen w pozycji 4 oraz grupa OH przy węglu C-7. Związki te przejawiają silną tendencję do wiązania grup glikozydowych przy tlenie z grupy wodorotlenowej obecnej w pozycji C-7. Takie związki nazywa glikozydami. Ponadto do form glikozydowych należy zaliczyć związki posiadające grupę malonylową oraz acetylową, które znajdują się przy ugrupowaniu glukozowym. W wyniku hydrolizy zasadowej oraz kwasowej dochodzi do rozerwania wiązań pomiędzy grupami – kolejno malonylową i acetylową a cukrem przyłączony do pierścienia A. Dzięki temu m.in. w układzie pokarmowym powstają związki pozbawione grupy glikozydowej czyli aglikony. Struktura chemiczna aglikonów izoflawonów jest podobna do 17- β -estradiolu, dzięki czemu zdolne są do wiązania ERs [10].

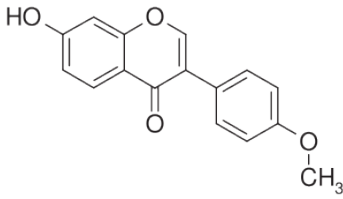
Przedstawicielami izoflawonów są takie związki jak: biochanina A, formonetina, genisteina, sissotrin, glyciteina, daidzeina, ononin, genistina, glycitina lub daidzina. Struktury chemiczne tych związków widnieją poniżej (Rys. 3); po lewej stronie umieszczone są aglikony a po prawej ich prekursorzy.



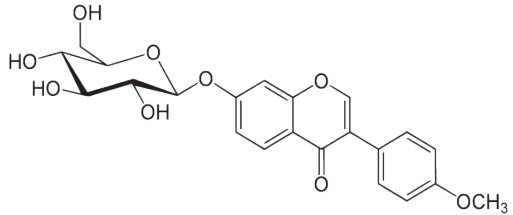
Rysunek 1. Struktura chemiczna aglikonu izoflawonów
Figure 1. The chemical structure of aglicone isoflavone



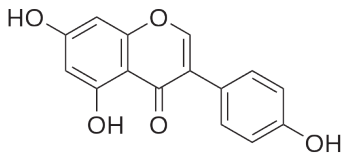
Rysunek 2. Struktura chemiczna glikozydu izoflawonów
Figure 2. The chemical structure of glycoside



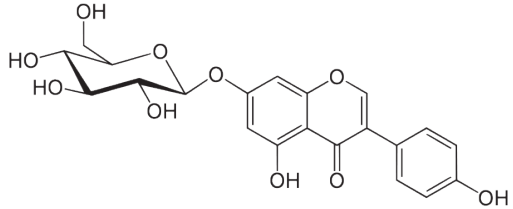
Formononetyna
(7-hydroksy-4'-metoksyizoflawon)



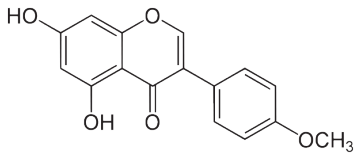
Onionina
(-hydroksy-4'-metoksyizoflawon 7-glukozyd)



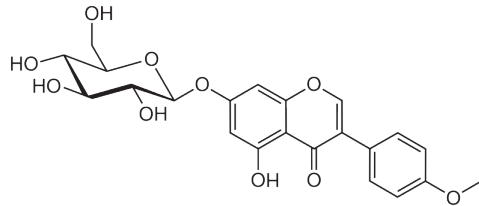
Genisteina
(4',5,7-trzyhydroksyizoflawon)



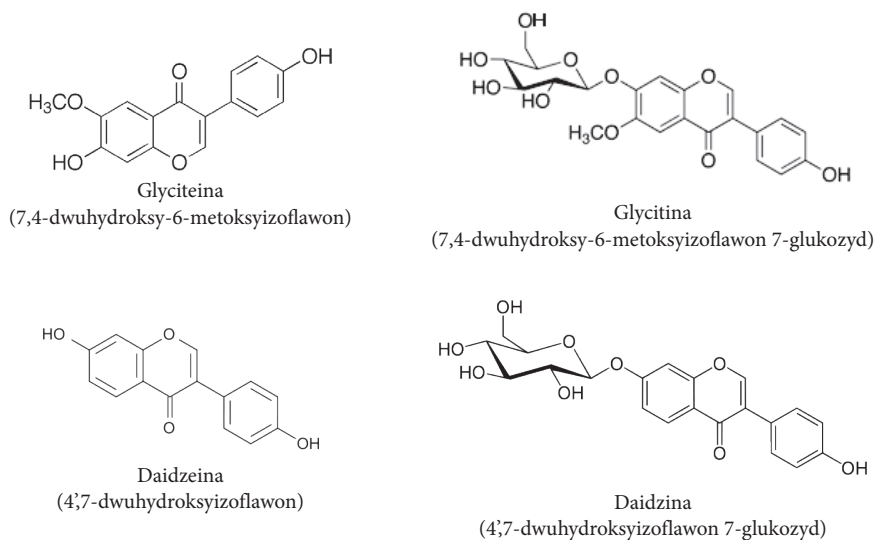
Genisteina
(4',5,7-trzyhydroksyizoflawon 7-glukozyd)



Biochanina A
(5,7-dwuhydroksy-4'-metoksyizoflawone)



Sissotrin
(5,7-dwuhydroksy-4'-metoksyizoflawone 7-glukozyd)



Rysunek 3. Wzory strukturalne izoflawonów
Figure 3. The chemical structures of all isoflavons

2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA IZOFLAWONÓW

Na rynku dostępnych jest wiele suplementów diety produkowanych na bazie ziół oraz roślin z rodziny bobowatych zawierających opisane fitoestrogeny. Głównym celem zażywania tych preparatów jest łagodzenie negatywnych skutków menopauzy, bez konieczności stosowania terapii hormonalnej. Jednak związki te charakteryzują się szerszym zakresem aktywności biologicznej i farmakologicznej o dużej skuteczności działania leczniczego, kosmetycznego oraz profilaktycznego. Do najbardziej aktywnych biologicznie izoflawonów zaliczamy genisteinę, daidzeinę, biochaninę A oraz formononetynę.

Aktywacja błonowych receptorów estrogenowych przez te związki powoduje kaskadę wewnątrzkomórkowych mechanizmów prowadzących do zmiany aktywności białek G, fosfolipazy, kinazy białkowej oraz adenocyklazy. Zdolność łączenia się z receptorami estrogenowymi w jądrze komórkowym prowadzi do ekspresji wielu genów, mających istotny wpływ na procesy fizjologiczno-metaboliczne organizmu ludzkiego lub zwierzęcego. Inne mechanizmy związane z aktywacją receptorów estrogenowych mogą prowadzić do hamowania lub aktywowania licznych enzymów estrogenozależnych, ponadto wykazują konkurencję z estradiolem o miejsce wiązania w receptorze [11,12]. Kolejną drogą działania izoflawonów na poziomie komórki jest inhibicja aktywności topoizomerazy I i II DNA oraz helikazy rozplatającej podwójną nić DNA, w celu udostępnienia miejsc dla enzymów replikacyjnych i transkrypcyjnych [13].

Aktywność antyoksydacyjna tych związków wynika z łatwości oddawania atomów wodoru z grup hydroksylowych, dzięki czemu neutralizują wolne rodniki nadtlenkowe i wodorotlenkowe. Procesy wolnorodnikowe modyfikują w komórkach struktury białkowe, materiał DNA; modyfikacje te mogą powodować mutagenzę, karcinogenezę lub cytotoksyczność. Izoflawony działają również stymulująco na aktywność różnych enzymów antyoksydacyjnych (np.: katalazy, peroksydazy glutationowej, dysmutazy nadtlenkowej czy reduktazy glutationowej). Struktura chemiczna izoflawonów sprzyja wydajnemu kompleksowaniu kationów metali, w szczególności dwuwartościowych, które katalizują reakcję utleniania [14].

Xiaoping Liu i in. [15] dowiedli, iż stosowanie doustnie dzaidzeiny lub jej metabolitu ekwolu hamuje wzrost DMBA oraz wzrost linii komórkowej ludzkiego raka piersi MCF-7. Genisteina działa hamująco na aktywność kinaz tyrozynowych zlokalizowanych w błonie komórkowej, które to uczestniczą w wytwarzaniu, modulacji i przekazywaniu sygnałów chemicznych do jądra komórkowego wywołujących ekspresję genów odpowiedzialnych również za nowotwory. Badania epidemiologiczne potwierdzają przeciwnowotworowe działania izoflawonów. Wynika z nich, iż u kobiet azjatyckich spożywających je w znacznie większych ilościach, obserwuje się czterokrotnie rzadsze występowanie raka piersi niż u kobiet z krajów zachodnich. Izoflawony zmniejszają ryzyko chorób układu krwionośnego, zwłaszcza choroby wieńcowej serca i miażdżycy naczyń krwionośnych. Pod wpływem fitoestrogenów następuje obniżenie we krwi poziomu całkowitego cholesterolu, lipoprotein o niskiej gęstości i triglicerydów, a także zmniejszenie ilości endogenego cholesterolu. Daidzeina i pueraria, poprzez zmniejszenie lepkości krwi, poprawiają mikrokrążenie obwodowe oraz zmniejszają ryzyko agregacji erytrocytów i płytek krwi w naczyniach krwionośnych. Dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym, hamują one mikrosomalne utlenianie lipidów, zwłaszcza tych z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi których oksydacja powoduje utratę przepuszczalności błon komórkowych co sprzyja powstawaniu miażdżycy. Izoflawony, podobnie jak cholesterol i witamina E łatwo wiążą się z rdzeniem lipidowym błony komórkowej co wzmacnia jej stabilność oraz zmniejsza płynność i mozaikowatość [16, 17].

Biochanina A i genisteina hamują tworzenie się osteoklastów (komórek kościogubnych), natomiast stymulują aktywność osteoblastów (komórek kościotwórczych). Ponadto mogą stymulować sekrecję IGF-I, który pobudza biosyntezę kolagenu *in vitro* przez osteoblasty. Proces ten stymuluje działanie parathormonu regulującego gospodarkę wapniowo-fosforanową organizmu powodując wzrost poziomu wapnia we krwi i kościach. Izoflawony wykazują również wpływ na metabolizm witaminy D₃ (cholekalcyferol). Stymulują aktywność enzymu CYP27B1 katalizującego syntezę 1,25-dihydroksycholekalcyferolu o funkcji hormonalnej, mającego wpływ na wzrost, różnicowanie i metabolizm komórek tkanki kostnej, ich mineralizację i regenerację [18,19].

3. METODY OZNACZANIA IZOFLAWONÓW

Dzięki obecności pierścieni fenolowych, izoflawony w analizowanych próbkach można bez upochodnienia identyfikować wykorzystując porównanie widm UV, IR lub PMR z widmami standardów. Jednakże metody te wymagają często starannego usuwania z analizowanych próbek endogennych składników utrudniających jakościowe i ilościowe oznaczanie izoflawonów; dlatego też metody te mogą być kosztowne oraz pracochłonne. Najczęściej stosowaną techniką do analizy ilościowej i jakościowej jest chromatografia cieczerwowa. Przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej (HPLC) lub Ultra HPLC (UPLC) w połączeniu z różnymi technikami detekcji istnieje możliwość dokładnego i precyzyjnego rozdzielania oraz wykrycia poszczególnych izoflawonów.

3.1. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII DO OZNACZANIA IZOFLAWONÓW

niezmiernie istotnym jest odpowiednie przygotowanie analizowanej próbki; jej stan skupienia oraz stężenie i struktura chemiczna oznaczanego izoflawonu w analizowanym materiale biologicznym rzutuje na metodę przygotowania badanej próbki. Jeżeli analizujemy materiał biologiczny w którym znajdują się niskie stężenia izoflawonów możemy zastosować ekstrakcję; pozwoli to na zwiększenie stężenia analitu oraz może zmniejszyć efekty związane z obecnością matrycy [20]. W materiale roślinnym oraz próbkach żywności występują przede wszystkim glikozydy, natomiast w materiale pochodzącym z organizmu zwierzęcego lub ludzkiego występują w wyższych stężeniach pochodzące od nich aglikony, a w moczu i krwi dodatkowo obecne są koniugaty glukuronowe i siarczanowe. Biologiczna próbka, w zależności od jej stanu skupienia najpierw powinna być zhomogenizowana, zliofilizowana lub zamrożona w ciekłym azocie. Kolejno przeprowadzana jest ekstrakcja w układzie LLE przy zastosowaniu eteru dietylowego, octanu, etylu lub chlorku metylenu z małą ilością kwasu octowego lub mrówkowego. Często też stosuje się wstępne usunięcie endogennych składników analizowanej próbki wykorzystując ekstrakcję SPE. Podstawą tej techniki analitycznej są kolumny pakowane żelem krzemionkowym, modyfikowanym oktadecylem (C18), natomiast fazę ciekłą stanowi metanol, etanol lub acetonitryl [1]; następnie oznaczane anality w uzyskanym eluacie są finalnie analizowane przy użyciu RP-HPLC. W przypadku badania próbek ciekłych wystarczy zazwyczaj zastosować tylko filtrację lub wirowanie [21].

W niektórych próbkach biologicznych, na przykład w soi oraz produktach sojowych, pojawiają się duże ilości polarnych izoflawonów (m.in. glikozydy izoflawonów) [22]. Dlatego też tę grupę polarnych izoflawonów zaleca się analizować przy użyciu kolumn chromatograficznych zawierających wypełnienie z ugrupowaniem polarnym, które wbudowane jest w hydrofilowy łańcuch, takich jak faza acyloamidowa, cholesterolowa lub fosfolipidowa.

3.1.1. Ekstrakcja

Proces ekstrakcji związków izoflawonowych jest trudnym wyzwaniem, zależnym od ilości związków jakie chcemy wyizolować, form malonylo- i acetyloglukozowych oraz dostępności rynkowej standardów. Inne metody ekstrakcji oraz rodzaj rozpuszczalnika będziemy stosowali w celu oznaczenia glikozydów a inne aglikonów. Największą gamę związków można znaleźć w materiale biologicznym pochodzącym z kundzu, bo aż 31 oraz z koniczyny łąkowej i lucerny [23]; niestety wiąże się to z bardziej skomplikowanym procesem ekstrakcji. W produktach sojowych spodziewać się można pochodnych daidziny, genistyny oraz glicytyny. Najprostszym sposobem jest ekstrakcja na gorąco metanolem i wodą w różnych proporcjach objętościowych. Co umożliwi izolację glikozydów i aglikonów w przybliżonej zawartości. Jednak aby całkowicie przekształcić formy malonylo- i acetyloglukozowe w glikozydy i aglikony należy zastosować odpowiednio hydrolizę zasadową oraz kwasową. Dzięki tym procesom wszystkie izoflawony mogą być łatwo oznaczone w badanych materiałach biologicznych [7, 24].

Zadaniem ekstrakcji zasadowej jest usunięcie wiązań estrowych, w rezultacie czego z form 6''-O-malonylo-glikozydowych i 6''-O-acetylo-glikozydowych otrzymujemy odpowiednie β -glikozydy. Dla produktów sojowych często stosowana jest hydroliza zasadowa zgodnie z metodą AOAC 2001.10 [25] lub jej modyfikacje (Tab. 1).

Hydroliza katalizowana kwasami stymuluje pękanie wiązań glikozydowych między aglikonami a grupą glukozową dając aglikony z wyjątkiem pueraryny. Stosuje się ją do analizy złożonych próbek i identyfikacji cukrowych izoflawonów poprzez porównanie z wynikami hydrolizy zasadowej. Dzięki temu można oszacować zawartość aglikonów, które mogą być połączone z cukrami innymi niż glukoza lub formami niedostępnymi; próbki te mogą być standardami aglikonów.

Selektywna hydroliza enzymatyczna jest również często stosowana jako metoda obróbki wstępnej próbek plazmy, moczu i treści pokarmowej. Przy użyciu β -glukuronidazy/sulfatazy (z *H. pomatia*), sulfatazy (typu VIII) czy β -glukuronidazy (typu B-1: z bydlęcej wątroby) można odseparować aglikony od form glukuronidowych i sulfatowych [26].

3.1.2. Sonifikacja

Poddawanie próbek działaniu ultradźwięków może znacznie skrócić czas ekstrakcji oraz w dużej mierze ułatwić ten proces. Chen i in. [27] (Tab. 1) wykazali, iż w celu utrzymania koncentracji izoflawonów na stałym poziomie należy przeprowadzić sonifikację od 20 do 50 min. Długi czas tego procesu prowadzi do ubytku form acetylowych. Aby uniknąć hydrolizy form acetylowych (stymuluje ją wysoka temperatura), sonifikację należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej (tj. ok. 25°C).

3.1.3. REFLUXING - MROŻENIE

Wielu autorów zaleca oznaczanie izoflawonów po uprzednim poddaniu próbek procesowi mrożenia w zakwaszonym metanolu, w celu konwersji wszystkich form acetylowych i glikozydowych do prostych aglikonów. Po 60 minutowym wymrażaniu, wszystkie formy acetyloglikozydowe przechodzą do form glikozydowych lub aglikonów. Wydłużenie czasu wymrażania zwiększa wydajność konwersji glikozydów w kierunku aglikonów; dlatego też po 4 godzinach wymrażania w badanej próbce znajdują się tylko izoflawony w formie aglikonów. Ciekawym zjawiskiem odnotowanym przez Chena i in. [27] był brak stabilności aglikonów po 4 godzinach wymrażania; stężenie genisteiny zmniejszało się, przy czym pojawiał się na chromatogramie dodatkowy niezidentyfikowany pik. Dlatego też proces wymrażania należy optymalizować.

3.2. UŻYCIE STANDARDU WEWNĘTRZNEGO

W celu poprawienia dokładności analizy ilościowej niezbędnym jest zastosowanie standardu wewnętrznego, dzięki któremu możemy ocenić rozmiar straty analitu; błędy te mogą pojawiać się podczas przygotowywania próbki. Dobór IS w tych metodach utrudnia fakt, iż w materiałach roślinnych większość możliwych do użycia standardów wewnętrznych eluuje niemal jednocześnie wraz z endogennymi substancjami analizowanej próbki. Suplementy diety są zwykle mieszkanką ekstraktów z ziół zawierających liczne nieznanne komponenty. Dlatego znalezienie odpowiedniego standardu wewnętrznego, który nie ulegałby elucji w tym samym czasie co reszta związków znajdujących się w badanej próbce jest nie lada wyzwaniem. Co więcej, ważne jest, aby związek używany jako standard nie ulegał degradacji w trakcie hydrolizy katalizowanej kwasami lub zasadami.

Apigenina – flawonowy analog genisteiny oraz fluorescyna są jak podaje Griffith i Collison [28] szeroko stosowanym standardem wewnętrznym w analizach gradientowych HPLC. Krenn i in. [29] w analizie izoflawonów stosowali jednocześnie kilka różnych standardów wewnętrznych przy analizie próbek koniczyny łąkowej.

Delmonte i in. [23] (Tab. 1) zaobserwowali, że 2'-metoksyflawon oraz 6'-metoksyflawon nie eluują z innymi związkami pochodzenia izoflawonowego oraz wykazują wysokie odzyski po procesach hydrolizy. Związków tych użyli jako standardów wewnętrznych w metodach opracowanych przez innych badaczy (Tab. 1). Do analizy izoflawonów przy pomocy HPLC z detekcją UV stosuje się również flawon lub fluoresceinę, natomiast do HPLC sprzężonej ze spektrometrem mas (MS) jako standard wewnętrzny można zastosować deuterowaną genisteinę, daidzeinę, biochaninę lub formononetynę. W niektórych metodach pomijany jest standard wewnętrzny; szczególnie dotyczy to technik analitycznych wykorzystujących spektrometrię mas (np. LC/MS).

3.3. CHROMATOGRAFICZNE TECHNIKI OZNACZANIA IZOFLAWONÓW

Znanych jest kilka technik analizy badanych izoflawonów. Są nimi chromatografia gazowa (GC) oraz chromatografia cieczowa (LC), niekiedy również, elektroforeza kapilarna (CE). Najczęściej stosowaną metodą oznaczania izoflawonów i ich pochodnych oraz metabolitów jest HPLC lub UHPLC. W związku z tym, iż związki te charakteryzują się dużą liczbą i różnorodnością podstawników wysokosprawną chromatografią cieczową w układzie odwróconych faz zapewnia najlepsze rozdzielanie izoflawonów. Najbardziej istotny jest wybór fazy ruchomej, którą może stanowić roztwór metanolu lub acetonitrylu z wodą. Ponieważ izoflawony są słabymi kwasami, w celu polepszenia ich retencji oraz zwiększenia rozdzielczości pików, fazę ruchomą zakwasza się 0,1–1% kwasem mrówkowym, kwasem octowym, kwasem trifluoroctowym, octanem lub mrówczanem amonu. Wyżej opisane rodzaje faz stosowane są w układzie faz odwróconych (RP-HPLC).

Dzięki obecności aromatycznych pierścieni oraz licznych podstawników możliwych jest kilka sposobów detekcji. Związki te posiadają dwa charakterystyczne zakresy absorpcji promieniowania z zakresu UV-VIS. Pierwszy z nich wynika z obecności pierścienia A i wynosi 240–285 nm (zakres UV); natomiast drugi zakres związany z obecnością pierścienia B zawiera się w zakresie 300–550 nm (zakres VIS). Przy oznaczaniu różnych grup izoflawonów stosuje się detektor z matrycą fotodiodową UV-DAD, który umożliwia rejestrację widm w szerokim zakresie UV-VIS w trakcie jednej analizy; pozwala to na bardziej selektywne oznaczanie analitów (tj. optymalizowanie wyboru analitycznej długości fali). W związku z obecnością elektroaktywnych grup fenolowych, fitoestrogeny ulegają utlenieniu, a ich potencjał utlenienia (najczęściej ok. 700 mV) pozwala na zastosowanie elektrochemicznego detektora (ED). Detektor ten charakteryzuje się wyższą czułością na izoflawony, rzadko stosuje się detektor fluorescencyjny (FL), gdyż tylko niewielka grupa tych związków wykazuje naturalną fluorescencję; są to izoflawony posiadające grupy hydroksylowe przy 3 atomie węgla. Najczulszym, najbardziej selektywnym i wszechstronnym detektorem jest spektrometr mas (MS). Stosując HPLC-MS uzyskujemy jednocześnie informacje o związku chemicznym, ilości, czasie retencji oraz masie cząsteczkowej i składzie pierwiastkowym analitu w badanej próbce. Takie połączenie stosuje się najczęściej w przypadku złożonych matryc.

Bez wątpienia kluczowym elementem chromatograficznego układu jest kolumna analityczna; od rodzaju jej wypełnienia czyli średnicy ziarna oraz długości i szerokości kolumny, zależy jej sprawność. Wypełnienie kolumny powinno zawierać homogeniczne i sferyczne cząsteczki, zapewniać wysoką stabilność ciśnieniową oraz dopuszczać szeroki zakres pH (1–11) używanych eluentów.

Analizy izoflawonów prowadzone przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykorzystując najczęściej kolumny C18 o długości 250 mm i średnicy ziarna od 4 do 5 μm . Kolumny te wypełnione są fazą oktadecylową osadzoną na podłożu krzemionkowym o średniej średnicy ziarna od 4 do 5 μm modyfikowaną fazą oktadecylową (tj. grupami funkcyjnymi zawierającymi 18 atomów węgla:

$-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$); pozwala to na zadowalające rozdzielanie wszystkich izoflawonów w czasie ok. 60 min. W chwili obecnej wprowadza się wiele istotnych zmian w parametrach tego typu kolumn; ma to na celu polepszenie selektywności, rozdzielczości oraz skrócenie czasu analizy. Rozmiar średniej średnicy ziaren wypełnienia kolumny rzutuje na efekt przenoszenia masy oraz na optymalną prędkość liniową fazy ruchomej; w przypadku mniejszych ziaren wypełnienia odnotowuje się relatywnie mniejszy spadek sprawności przy użyciu wyższej od optymalnej prędkości linowej przepływu eluentu, niż ma to miejsce w przypadku ziaren wypełnienia o większej średnicy. Zatem, dla małych średnic ziaren wypełnienia, można stosunkowo „bezkarnie” stosować prędkości przepływu większe od optymalnego; pozwala to na skrócenia czasu analizy chromatograficznie.

Zmniejszenie średniej średnicy ziaren wypełnienia powoduje wzrost ciśnienia zwrotnego kolumny, co może być jedną z przyczyn awarii kolumn oraz innych elementów układu chromatograficznego. Przy wypełnieniu ziarnami o średnicy 3–5 μm , pojawiają się ograniczenia co do długości kolumny oraz szybkości przepływu eluentów. Ograniczenia te wynikają z limitu ciśnienia jakim charakteryzują się starsze układy HPLC. Wypełnienie o średniej średnicy ziarna poniżej 2 μm umożliwiają bardzo szybką analizę chromatograficzną; wymagają jednak zastosowania sprzętu ultra ciśnieniowego (UHPLC), który pozwoli na zastosowanie ciśnień do ok. 12000 bar. Nowoczesną technologią pozwalającą na uzyskanie lepszej selektywności, przy niższym ciśnieniu pracy chromatografu, jest użycie kolumn nowej generacji wypełnionych powierzchniowo porowatą krzemionką; technologia ta nosi nazwę „Fused-Core technology”. Jej istotą jest zastosowanie specjalnego złoża o sztywnym, nieporowatym rdzeniu, który pokrywa się cienką porowatą warstwą; to w niej zachodzi proces rozdzielania analitów. Dzięki temu ogranicza się niekorzystne efekty dyfuzji analitów w głąb rdzenia ziaren stanowiących wypełnienie kolumny. Faza ta charakteryzuje się bardzo wysoką sprawnością oraz nie generuje wysokich ciśnień. Szybkość oraz sprawność analizy chromatograficznej przy zastosowaniu złoża o średniej wielkości ziarna ok. 2,6 μm pakowanych techniką Fused-core jest podobna co kolumn tradycyjnych o średnicy ziarna poniżej 1,3 μm . Co więcej, kolumny te można bez obawy stosować w układach chromatograficznych typu UHPLC jak również w starszych HPLC [31].

Do zastosowania szybkich i rutynowych oznaczeń izoflawonów w żywności często poleca się metody ultrasprawnej/ultraciśnieniowej chromatografii cieczowej (UHPLC) z racji jej wysokiej wydajności. Fiechter i in. [32] opracowali metodę określenia całkowitego stężenia aglikonów w soi po enzymatycznej hydrolizie, w której to w ciągu 3 minut dokonano rozdziału wszystkich aglikonów.

Oczekiwana kolejność elucji dla związków izoflawonowych, przy użyciu kolumn C18 przedstawia się następująco: glukozydy izoflawonów pueraryna < daidzeina < glicytyna < genistyna; aglikony daidzeina < glicyteina < genisteina. Aglikony takie jak formononetyna i biochanina wymywane są najszybciej.

Wyższy procentowy udział czynnika polarnego w eluencie zapewnia szybszą elucję analitów; jednakże może to spowodować spadek rozdzielczości układu chromatograficznego. Ponadto, im analit jest mniej polarny, tym dłuższy będzie jego czas retencji. Zatem należy optymalizować parametry elucji gradientowej lub izokratycznej i/lub skład fazy ruchomej. Przykładem tego może być zoptymalizowana elucja biochaniny przy użyciu fazy ruchomej, którą stanowi roztwór metanolu w wodzie (85:100, v/v). Zastępując oktadecylowe grupy fazy stacjonarnej grupami bardziej polarnymi (np. fenylowymi lub cyjanowymi) można skutecznie eluować aglikony przy mniejszym udziale procentowym rozpuszczalnika polarnego [31]. Formy acetylo- i malonylo-glukozowe eluują pomiędzy glikozydami a aglikonami. Podsumowując, skłonność do przejawiania hydrofobowości, a co za tym idzie kolejność wymywania izoflawonów, zaczyna się od glikozydów poprzez malonyloglukozydy, acetyloglukozydy, a na końcu szeregu pojawiają się wolne (niehydratowane) aglikony [33].

PODSUMOWANIE

Skrócenie czasu analizy, obniżanie wartości granicy wykrywalności izoflawonów oraz stosowanie możliwie małej ilości odczynników i masy badanej próbki, prowadzi chemię analityczną w kierunku usprawnienia, miniaturyzacji i optymalizowania wydajności analiz. Najnowsze prace koncentrują się na badaniu szlaków metabolicznych izoflawonów, ich pochodnych oraz ich metabolitów pojawiających się w żywych organizmach. Z racji szerokiego zakresu występowania izoflawonów, ich zastosowania oraz znaczenia w medycynie, farmacji i żywieniu, metody detekcji tych związków powinny być nadal przedmiotem badań. Ponadto, w żywych organizmach funkcje fizjologiczne metabolitów fitoestrogenów nie są do końca poznane, również nie jest gruntownie poznany mechanizm ich powstawania w ustrojach żywych. Wszystko to skłania fizjologów oraz analityków do prowadzenia kolejnych prac usprawniających metody analityczne, które pozwoliłyby na jeszcze bardziej wiarygodne oznaczanie izoflawonów i ich pochodnych oraz metabolitów w materiałach biologicznych.

Tabela 1. Metody oznaczania izoflawonów przy użyciu HPLC
 Table 1. Analytical methods for the determination of selected isoflavonoids

Związki	Przygotowanie próbki	Parametry analizy chromatograficznej	Ref.																																													
daidzeina genisteina glyciteina daidzyna genistyna glycityna acetylo- daidzyna acetylogli- cyna acetylo- daidzyna	<p>Material: Białko sojowe, żywność oraz odżywcze suplementy pochodze- nia sojowego</p> <p>Ekstrakcja: • 1 g próbki umieścić w pro- bówce, z nakrętką, o wymiarach 125 mm × 20 mm</p> <p>• dodać 6 ml wody dejonizowanej oraz 0,5 ml standardu wewnętrz- nego – apigeniny (2000 µg/ml w MSO). Wymieszać.</p> <p>• ekstrakcja w mieszalniku obroto- wym przez 2 godziny</p> <p>• dodać 3,5 ml wody dejonizowa- nej i wymieszać</p> <p>• uzupełnić 50% roztworem acetonitrylu</p> <p>• wirować przez 10 min przy 2000 obrotów</p> <p>• ilość próbki przenoszona do naczynka uprzednio przefiltro- wać przez 0,45 µm filtr PVDF</p>	<p>1. Kolumna: YMC ODS-AM, 5 µm, 250 × 3 mm, Faza mobilna: A – 0,1 % (v/v) kwas octowy w wodzie B – 0,1% (v/v) kwas octowy w acetonitrylu</p> <p>Przepływ: 0,65 ml/min</p> <p>Temp. kolumny: 40°C</p> <p>Nastrzyk: 5 µl</p> <p>Parametry elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>63</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>73</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table> <p>2. j.w.</p> <p>Parametry elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0–5</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>36</td> <td>71</td> <td>29</td> </tr> <tr> <td>44</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>47</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>57</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table> <p>3. Kolumna: Altima C18, 3 µm , Rocket 53 × 7 mm, Temp. kolumny: 40°C</p> <p>Przepływ: 3 ml/min</p> <p>Nastrzyk: 5 µl</p> <p>Detekcja: 260 nm</p> <p>Faza mobilna: A: 0.1% roztwór kwasu octowego doprowadzony 25% wodnym roztwo- rem amoniaku do pH = 3,5. B: 100% acetonitryl</p> <p>Program elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0–9</td> <td>73</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>71</td> <td>29</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Czas (min)	A	B	0	90	10	60	70	30	63	10	90	73	90	10	Czas (min)	A	B	0–5	85	15	36	71	29	44	65	35	47	10	90	57	90	10	Czas (min)	A (%)	B (%)	0–9	73	27	13	71	29	15	90	10	Griffith i Collison [28]
Czas (min)	A	B																																														
0	90	10																																														
60	70	30																																														
63	10	90																																														
73	90	10																																														
Czas (min)	A	B																																														
0–5	85	15																																														
36	71	29																																														
44	65	35																																														
47	10	90																																														
57	90	10																																														
Czas (min)	A (%)	B (%)																																														
0–9	73	27																																														
13	71	29																																														
15	90	10																																														

Związki	Przygotowanie próbki	Parametry analizy chromatograficznej	Ref.																					
daidzeina genisteina glyciteina daidzyna genistyna glicytyna acetylo- idzyna acetygli- cina acetylo- idzyna	<p>Materiał: Suplementy sojowe</p> <p>Ekstrakcja:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,2 grama oznaczanej próbki umieścić w 20 ml probówce • dodać 4 ml wody i 16 ml acetonitrylu. Mieszać wytrząsając. • przez 40 min sonifikować w 25°C • pobrać 1 ml próbki i wirować przez 10 min w 2000 xg • przefiltrowany supernatant przefiltrować przez PVFD 0.45 zlać do fiołka uzupełnić 80% acetonitrylem <p>Procedura ta skraca obsługę w trakcie przygotowywania próbki.</p>	<p>Kolumna: Luna C18, 5 µm, 150 x 4,6 mm,</p> <p>Faza mobilna: (brak dokładnego sformułowania, odsyłamy do publikacji) A – acetonitryl B – 80% metanol w wodzie (v/v)</p> <p>Przepływ: 0,8 ml/min</p> <p>Program elucji:</p> <table> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>88</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>46</td> <td>88</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>56</td> <td>88</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table>	Czas (min)	A	B	0	88	12	10	70	30	40	10	90	46	88	12	56	88	12	Chen [27]			
Czas (min)	A	B																						
0	88	12																						
10	70	30																						
40	10	90																						
46	88	12																						
56	88	12																						
daidzeina genisteina glyciteina daidzyna genistyna glicytyna	<p>Materiał: Napój owocowo-sojowy</p> <p>Ekstrakcja:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 g liofilizatu + 80% etanol zakwaszony 1M HCl • inkubacja w 80°C przez 1 h chłodzenie próbki i wytrząsanie przez 2 min • wirowanie 10 min, 12 000 xg w 4°C • supernatant pobrać, a resztę ponownie ekstrahować z 7,5 ml 80% etanolu i zlać do kolby miarowej którą następnie wypełniono 80% etanolem. • filtracja przez filtr 0,2 µm 	<p>Kolumna: C18, 3,5 µm, 150 × 3 mm, Przedkolumna, C18, 5 µm,</p> <p>Faza mobilna: A – woda/metanol (80:20); B – woda/metanol/acetonitrylu (40:40:20)</p> <p>Przepływ: 0,3 ml/min</p> <p>Nastrzyk: 20 µl</p> <p>Temperatura: kolumna – 37°C podajnik – 4° C</p> <p>Program elucji:</p> <table> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>52</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>70</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>	Czas (min)	A (%)	B (%)	0	80	20	15	80	20	25	0	100	50	0	100	52	80	20	70	80	20	Morales de la Peña i in [34]
Czas (min)	A (%)	B (%)																						
0	80	20																						
15	80	20																						
25	0	100																						
50	0	100																						
52	80	20																						
70	80	20																						

Związki	Przygotowanie próbki	Parametry analizy chromatograficznej	Ref.																		
daidzyna daidzeina genistyna genisteina glycytyna genistein	<p>Materiał: Soja i żywność pochodzenia sojowego.</p> <p>Ekstrakcja:</p> <ul style="list-style-type: none"> ok. 1 g próbki zmieszać z 40 ml 80% metanolu (mieszanina ekstrakcyjna) wytrząsać w 65°C przez 2 godziny ochłodzić do temperatury pokojowej i dodać 3 ml 2M NaOH wytrząsać w wytrząsarce orbitalnej przez 10 min dodać 1 ml lodowatego kwasu octowego, wymieszać i uzupełnić do 50 ml mieszaniną ekstrakcyjną przefiltrować i pobrać 5 ml ekstraktu dodać 4 ml wody i uzupełnić do 10 ml metanolem, mieszaninę lekko wymieszać pobrać ok 1 ml ekstraktu do 1,5 ml próbówki Eppendorfa i wirować przez 5 min na 7000 xg tak oczyszczoną próbkę przetranszować do naczynka supernatantu nie należy filtrować przez filtry membranowe 	<p>Kolumny: (brak danych producenta) C18 200 × 2,1mm C18 200 × 4,6mm</p> <p>Faza mobilna: A – woda-metanol-kwas octowy (88:10:2) B – metanol-kwas octowy (98:2)</p> <p>Przepływ: 0,4 ml/min dla kolumny 2,1 mm 1,5 ml/min dla kolumny 4,6 mm</p> <p>Czas analizy: 44,5 min</p> <p>Program elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>31</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>37</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>44,5</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Czas (min)	A	B	0,1	90	10	30	40	60	31	0	100	37	90	10	44,5	90	10	AOAC 2001.10 [25]
Czas (min)	A	B																			
0,1	90	10																			
30	40	60																			
31	0	100																			
37	90	10																			
44,5	90	10																			
daidzeina daidzeina genisteina genisteina glycytyna genistein	<p>Materiał: Żywność oraz suplementy diety pochodzenia sojowego</p> <p>Ekstrakcja:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1g produktów sojowych w wytarwanej zlewce z korkiem dodać standard wewnętrzny 0,5 ml, wymieszać dodać 8 ml acetonitrylu wymieszać dodać 5 ml czystej dejonizowanej wody i wymieszać kolejne kroki nie są konieczne dla próbek już rozpuszczonych mieszać na wytrząsarce, przez 60 min z przekręcaniem co 5 min. dodać 6,5 ml wody dejonizowanej – mieszać wirować przez 10 min w 200 xg supernatant, przefiltrować przy pomocy filtra strzykawkowego i przenieść do naczynek pomiarowych 	<p>Kolumna: ODS, C18; 5 µm rekomendowane wymiary: 250 × 3 mm lub 250 × 4,6 mm,</p> <p>Nastrzyk: 5 µl</p> <p>Przepływ: 0,65 ml/min dla kolumny 3 mm 1,5 ml/min dla kolumny 4,6 mm</p> <p>Detekcja UV przy długości fali 260 nm Temperatura kolumny: 40°C</p> <p>Faza mobilna: A – H₂O z 0,05% H₃PO₄ B – 100 % acetonitryl</p> <p>Program elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>63</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>73</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Czas (min)	A	B	0	90	10	60	70	30	63	10	90	73	90	10	AOAC 2008.03 [35]			
Czas (min)	A	B																			
0	90	10																			
60	70	30																			
63	10	90																			
73	90	10																			

Związki	Przygotowanie próbki	Parametry analizy chromatograficznej	Ref.															
puerarina daidzina glycytina genistina malonylo- daidzina malonylo- glycytina malonylo- genistina acetylo- daidzina daidzeina acetylo- daidzina acetylogli- cyna glukozyd formone- tyny glyciteina calykosin acetyloge- nistina genisteina glukozyd biocha- niny A pratenseina pseudo- baptige- nina formono- netyna prunetina biocha- nina A	<p>Materiał: Suplementy diety i żywności pochodzenia sojowego, z ekstraktów koniczyny łąkowej oraz kudzu</p> <p>Ekstrakcja: Modyfikacja oficjalnej metody AOAC 2001.10 oraz metody zastosowanej przez Griffitha i Collisona, poprzez zastosowanie 1 ml standardu wewnętrznego (2mg/ml) 2'-metoksy-flawonu oraz 6'-metoksy-flawonu do obu metod.</p> <p>Hydroliza zasadowa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 4 ml ekstraktu do 5 ml kolby miarowej • dodać 300 µl 2 M NaOH. wirować przez 10 min • dodać 100 µl lodowatego CH₃COOH • dopełnić mieszaniną H₂O/MeCN (50:50) do całkowitej objętości 5 ml • roztwór przefiltrować przez 0,45 µm PTFE membranę <p>Hydroliza kwasowa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 4 ml ekstraktu do zakręczanych próbek z 1 ml stężonego HCl • próbki przedmuchano azotem i ogrzewano w 80°C przez 2 godziny • do schłodzonych próbek w temperaturze pokojowej dodać 2 ml roztworu 50:5:45 NH₄OH (28–30% w H₂O) / lodowaty CH₃COOH/DMSO • roztwór przefiltrować przez 0,45 µm PTFE membranę 	<p>Kolumna: Waters Nova-Pak C18 150 × 3,9 mm, 4 µm.</p> <p>Czas: 100 min + 20 min</p> <p>Nastrzyk: 5 µl</p> <p>Temp: 40°C</p> <p>Detekcja: skan: 200-400nm, 260nm przepływ: 1ml/min</p> <p>Faza mobilna: A – 0,1% kwasu octowego w wodzie; B – 0,1% kwasu octowego w acetonitrylu</p> <p>Program elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table> <p>Równowaga: 20 min</p>	Czas (min)	A	B	0	95	5	50	80	20	90	60	40	10	30	70	Delmonte i in. [23]
Czas (min)	A	B																
0	95	5																
50	80	20																
90	60	40																
10	30	70																

Związki	Przygotowanie próbki	Parametry analizy chromatograficznej	Ref.																								
ekwol daidzeina dihydroda- idzeina ODMA genisteina dihydroge- nisteina glicyteina	<p>Materiał: Stinki tofu</p> <p>Ekstrakcja:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3-krotne rozcieńczenie wodą destylowaną próbki • 1 g zawiesiny dwukrotnie ekstrahować 5 ml <i>n</i>-heksanem, • dwukrotna ekstrakcja 5 ml octanu etylu • odparować octan w 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem przez 2 godziny • pozostałość rozpuścić w 1 ml mieszaniny roztworów A (18% metanolu, 1.8% octanu etylu, 0,04% fosforanu, 8 µg/ml EDTA-Na, reszta woda) i B (2% octanu etylu w metanolu) w proporcji 1:1 (v/v). 	<p>Kolumna: C18 UG120 250 × 4,6 mm</p> <p>Detekcja: 254 nm 280 nm – ekwol przepływ: 1 ml/min</p> <p>Faza mobilna: A – 18% metanolu, 1,8% octan etylu, 0,04% fosforanu oraz 8 µg/ml EDTA-Na w wodzie B – 2% octan etylu w metanolu</p> <p>Program elucji gradientowej: Udział solwentu B rośnie liniowo od 0 do 70% w fazie ruchomej</p>	Jou i in. [36]																								
daidzina glicytina genisteina malonylgli- citin malonylda- idzin malonylge- nistin acetylda- idzin acetylgeni- stin malonylgli- citin daidzeina genisteina glicyteina	<p>Materiał: soja odmiana żółta, mąka sojowa</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,5 g próbki z 25 ml 50% etanolu, ekstrahować w 20°C przez 60 min; wieloczęstotliwościowa ekstrakcja (25 i 45 kHz) prowadzona w łaźni ultradźwiękowej • wirować próbki w 10°C przez 10 min przy obrotach 4000 rpm, stosując wirówkę Universal 320R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tutlingen, Germany) • przefiltrować przez 0,2 µm nylonowy filtr strzykawkowy 	<p>Kolumna: Kinetex™ C18, 2,6 µm, 100 Å, 100 × 4,6 mm</p> <p>Czas: min. 12 min Nastrzyk: 10 µl Temp: 25–50°C</p> <p>Detekcja: skan: 200–400 nm, 254 nm przepływ: 2,7 ml/min</p> <p>Faza mobilna: A – 0,1% kwasu octowego w wodzie; B – 100% acetonitrylu</p> <p>Program elucji:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Czas (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>92</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>1,04</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>3,56</td> <td>83</td> <td>17</td> </tr> <tr> <td>4,56</td> <td>80,8</td> <td>19,2</td> </tr> <tr> <td>5,50</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6,50</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>7,50</td> <td>92</td> <td>8</td> </tr> </tbody> </table> <p>Równowaga: 2 min</p>	Czas (min)	A	B	0	92	8	1,04	85	15	3,56	83	17	4,56	80,8	19,2	5,50	50	50	6,50	0	100	7,50	92	8	Manchón i in. [30]; Rostagno i in. [7]
Czas (min)	A	B																									
0	92	8																									
1,04	85	15																									
3,56	83	17																									
4,56	80,8	19,2																									
5,50	50	50																									
6,50	0	100																									
7,50	92	8																									

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B. Klejdus, R. Mikelová, J. Petřlová, D. Potěšil, V. Adam, M. Stiborová, P. Hodek, J. Vacek, R. Kizek, V. Kubáň, J. Agric. Food Chem., 2005, **53**, 5848.
- [2] R.J. Flechter, Brit. J. Nutr., 2003, **89**, 39.
- [3] J.S. Kim, Ch. S. Kwon, Nutr. Res., 2001, **21**, 947.
- [4] M.A. Van Erp-Baart, H.A. Brants, M. Kiely, A. Muligan, A. Turrini, C. Sermoneta, V. Kikkinen, L.M. Valsta, Br. J. Nutr., 2003, **89**, 25.
- [5] R. Tsuchihashi, S. Sakamoto, M. Koderu, T. Nohara, J. Kinjo, J. Nat. Med., 2008, **62**, 456.
- [6] V.R. Preedy, R.J. Baber, *Isoflavones – Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Chapter 1, Royal Society of Chemistry, London, 2013.
- [7] M.A. Rostagno, A. Villares, E. Guillamón, A. Garcia-Laufente, J.A. Martinez, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 2.
- [8] A.M. Aura, Phytochem., 2008, **7**, 407.
- [9] D.A. Balantine, S.A. Wiseman, L.C.M. Bouwens, Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1997, **37**, 693.
- [10] U. Breinholt, A. Hossaini, G.W. Syndsen, Food Chem. Toxicol., 2000, **38**, 555.
- [11] D. Malińska, A. Kiersztan. Post. Bioch., 2004, **50**, 182.
- [12] G. Gryniewicz, M. Gadzikowska, Post. Fit., 2003, **4**, 10.
- [13] L. Pilšáková, I. Riečanský, F. Jagla. Physiol. Res., 2010, **59**, 651.
- [14] E.K. Heim, A.R. Tagliaferro, D.J.J. Bobilya, Nutr. Bioch., 2002, **3**, 572.
- [15] X. Liu, N. Suzuki, Y.R.S. Laxmi, Y. Okamoto, S. Shibutani, Life Sci., 2012, **91**, 415
- [16] A. Arora, M.G. Nair, G.M. Strasburg, Arch. Bioch. Biophys, 1998, **356**, 133
- [17] B.E. Merlz- Demlow, A.M. Duncan, K.E. Wangen, Am. J. Clin. Nutr., 2000, **71**, 1462.
- [18] K.H. Lee, E.M. Choi, Biol. Pharm. Bull., 2005, **28**, 1948.
- [19] H. Fathan, K. Wähälä, H. Adlercreutz H, J. Chromatogr., 2002, **777**, 261.
- [20] J.-T. Lin, *HPLC of Acyl Lipids*, HNB Publishig New York, 2005.
- [21] M. Szultka, K. Papaj, K. Rusin, W. Szeja, B. Buszewska, Trends Anal. Chem., 2013, **47**, 47.
- [22] K.D.R. Setchell, N.M. Brown, L. Zimmer-Nechemias, W.T. Brashear, B.E. Wolfe, A.S. Kirschner, J.S.E. Heubi, Am. J. Clin. Nutr., 2002, **76**, 447.
- [23] P. Delmonte, J. Perry, J.I. Rader, J. Chromatogr. A, 2006, **1107**, 59.
- [24] V.R. Preedy, A. Zafra-Gomez, S. Capel-Cuevas, N.I. Dorival-Garcia, *Isoflavones – Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Chapter 16, Royal Society of Chemistry, London 2013.
- [25] AOAC 2001.10, 2011, 118.
- [26] K. Ishii, K. Hosoda, T. Futura, *Isoflavones – Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Chapter 11, Royal Society of Chemistry, London 2013.
- [27] L.J. Chen, X. Zhao, S. Plummer, J. Tang, D.E. Games, J. Chromatogr. A, 2005, **1082**, 60.
- [28] A.P. Griffith, M.W. Collison, J. Chromatogr. A, 2001, **913**, 397.
- [29] L. Krenn, I. Unterrieder, R. Rupprechter, J. Chromatogr. B, 2002, **777**, **123**.
- [30] N. Manchón, M. D'Arriago, Garcia-Lafuente A., Guillamón E., Villares A., Ramos A., Martinez J.A., Rostagno M.A., Talanta, 2010, **82**, 1986.
- [31] J. Valls, S. Millán, P.M. Marti, E. Borrás, J. Arola, J. Chromatogr. A. 2009, **1216**, 7143.
- [32] G. Fiechter, I. Opacak, B. Raba, H.K. Mayer, Food Research International. 2013, **50**, 586.
- [33] Q. Ma, M. Chen, H.-R. Yin, Z.-G. Shi, Y.-Q. Feng, J. Chromatogr. A. 2008, **61**, 1212 .
- [34] M. Morales de la Peña, L. Salvia-Trujillo, M.A. Rojas-Graü, O. Martin-Belloso, Innov. Food Sci. Emerg. Tech., 2010, **11**, 604.
- [35] AOAC 2008.03, 2011, 123.
- [36] H.-J. Jou, P.J. Tsai, J.-H. Tu, W.-H. Wu, J. Func. Food, 2013, **5**, 651.

