



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Ústav analýzy potravin a výživy

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

číslo: 2014/96506

Stanovení fytoestrogenních látek v rostlinných masticích

Jana Hajšlová, Věra Schulzová, Veronika Krtková, Jan Nedělník

Praha 2014

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory projektů MZe č. **QI111CO16** „Navrhnout nové postupy údržby trvalých travních porostů v LFA minimalizací hygienických rizik spojených s výskytem alergenních mikroorganismů především z rodu *Fusarium*“, za podpory projektu MSM **6046137305** a účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum č. **20/2014**.

Metodu zpracovali:

prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.¹, doc. Dr. Ing. Věra Schulzová¹, Ing. Veronika Krtková¹, RNDr. Jan Nedělník, Ph.D.²

1. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Ústav chemie a analýzy potravin, FPBT
Technická 3, 166 28 Praha – 6 Dejvice
2. Zemědělský výzkum, spol. s.r.o.
Zahradní 400/1, 664 41, Troubsko

Oponenti:

Ing. Jan Vodička – Ministerstvo zemědělství, odbor živočišných komodit
Ing. Radim Štěpán, Ph.D. – Státní zemědělská a potravinářská inspekce

Osvědčení MZe o uznání uplatněné certifikované metodiky č.: 17210/2014-1

© Jana Hajšlová, Věra Schulzová, Veronika Krtková, Jan Nedělník 2014

ISBN 978-80-7080-874-0

OBSAH

1.	CÍL METODIKY	4
2.	TEORETICKÝ ÚVOD	5
3.	VLASTNÍ POPIS METODIKY.....	7
3.1	Použitelnost metody.....	7
3.2	Princip metody	9
3.3	Bezpečnost práce.....	9
3.4	Chemikálie a spotřební materiál	9
3.5	Přístroje a zařízení.....	10
3.6	Pracovní postup	11
3.6.1	Příprava zásobních roztoků standardů	11
3.6.2	Úprava vzorků krmiv k analýze	12
3.7	Identifikace a kvantifikace.....	13
3.7.1	Stabilizace systému	16
3.8	Pracovní charakteristiky metody	17
3.8.1	Správnost metody	17
3.8.2	Rozsah metody a linearity.....	17
3.8.3	Mez stanovitelnosti (LOQ)	18
3.8.4	Opakovatelnost metody	18
4.	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	20
5.	POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	21
6.	EKONOMICKÉ ASPEKTY	22
7.	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	23
8.	SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE	24

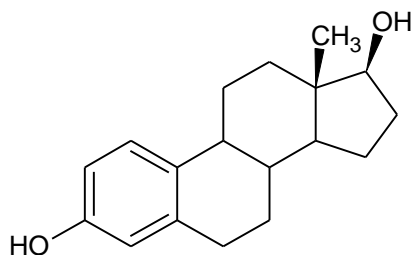
1. CÍL METODIKY

Jedním z dílčích cílů tohoto projektu QI111CO16 podporovaného Ministerstvem zemědělství České republiky bylo vyvinout, optimalizovat a validovat analytickou metodu pracující na základě citlivého moderního systému UHPLC-MS/MS, která je vhodná pro stanovení dominantních zástupců isoflavonů a pterokarpanu, patřících do skupiny fytoestrogenních látek, vyskytujících se ve sledovaných matricích jak ve formě volné, tak i vázané. Jedná se o stanovení daidzeinu, genisteinu, glyciteinu, daidzinu, genistinu, glycitinu, formononetinu, biochaninu A a kumestrolu. Vyvinutá metodika umožní sledování uvedených analytů v rostlinných matricích (senáž, siláž, poškozená senáž a siláž). Metoda je vhodná také pro sledování fytoestrogenních látek v nutraceutikách na bázi píce či sóji a v krmivech, případně dalších potravinách.

Vypracovaná metodika bude dále předána pracovníkům firmy Agrolab, s.r.o, která se zabývá rozbory krmiv a bude tento laboratorní postup dále používat při analýze a kontrole.

2. TEORETICKÝ ÚVOD

Fytoestrogeny jsou biologicky aktivní látky, které jsou přirozeně obsaženy v rostlinných materiálech. Tvoří je skupina převážně polyfenolických látek, které se vyznačují strukturální podobností s ženským hormonem 17- β -estradiolem (**Obrázek 1**). Rostliny fytoestrogeny produkují jako své sekundární metabolity, především v důsledku reakce na různé stresové faktory, a hlavní funkce těchto látek v rostlině spočívá v její ochraně před patogeny. Podle struktury se rozdělují do čtyř hlavních skupin na isoflavony, prenyl flavonoidy, pterokarpany a lignany.



Obrázek 1: 17- β -estradiol

Bohatým a dieteticky nejvýznamnějším zdrojem isoflavonoidů jsou luštěniny (čeled' bobovitých, *Fabaceae*), kam např. náleží sója (*Glycine max*). Dále se vyskytují hojně v píceňkách jako je jetel luční (*Trifolium pratense*), jetel podzemní (*Trifolium subterraneum*) či vojtěška setá (tolice setá, *Medicago sativa*). Tyto rostlinné materiály bývají často součástí krmné dávky pro domestikovaná zvířata. V menším množství se isoflavonoidy vyskytují také v některých dalších rostlinných čeledích, např. laskavcovitých (*Amaranthaceae*), kosatcovitých (*Iridaceae*), morušovníkovitých (*Moraceae*) a růžovitých (*Rosaceae*). Sójové boby jsou nejbohatším zdrojem isoflavonů, obsahují genistein, daidzein a glycitein. Formononetin a biochanin A, které jsou methyl-deriváty daidzinu a genisteinu v uvedeném pořadí, jsou v sóje obecně méně přítomné a vyskytují se především v píceňkách. Isoflavony v rostlinách jsou přítomny ve čtyřech různých formách: aglykon (bez napojené cukerné složky) a tři glukosidové konjugáty, zahrnující beta-, acetyl- a malonyl-glukosidové konjugáty. Dalším významným fytoestrogenem ze skupiny pterokarpanů je kumestrol, který se dominantně vyskytuje v klíčících sójových bobech a jiných luštěninách. Během klíčení se

jeho koncentrace významně navyšuje 70 - 150 krát a nejvyšší množství je soustředěno ve slupkách bobů. Kumestrol je také hlavním fytoestrogenem většiny píceňin (např. vojtěšky seté).

Při trávicím procesu jsou isoflavonové glykosidy hydrolyzovány intestinálními a bakteriálními β -glukosidásami na aglykony a následně buď absorbovány přímo, nebo později metabolizovány intestinální mikroflórou na další metabolity, zejm. equol. Equol, další látka patřící do skupiny isoflavonů, je považován za metabolit daidzeinu.

Fytoestrogeny jsou o jeden až čtyři řády slabšími ligandy estrogenových receptorů (ER) než 17- β -estradiol. Jejich příjem ale může činit desítky až stovky miligramů za den, což umožňuje dosáhnout v tělních tekutinách účinných koncentrací (desítky nmol až jednotky μ mol na litr). Díky svým účinkům jsou využívány stále častěji jako „přírodní alternativa“ hormonální substituční terapie pro ženy v postmenopauzálním věku, u nichž dochází k postupnému poklesu hladiny endogenních estrogenů. Výzkumy v populaci asijských žen (Japonsko, Čína, Malajsie) potvrdily, že tyto ženy mají méně klimakterických obtíží a mají menší riziko vzniku osteoporózy nežli evropské a severoamerické ženy. To je způsobeno tím, že přirozenou a významnou součástí asijské stravy je sója. Proto jsou z rostlinných extraktů sóji nebo také jetele či vojtěšky (a dalších zdrojů fytoestrogenů) vyráběny nejrůznější druhy potravních doplňků, které se využívají jako preventivní účinná „léčba“ např. vůči osteoporóze. Dále je pravděpodobné, že fytoestrogeny mají vliv na snížený výskyt rakoviny prostaty u mužů. Na druhé straně, studie na zvířatech dokazují i negativní účinky fytoestrogenů. Mohou totiž vyvolat jak estrogenní, tak antiestrogenní účinek nebo abnormality reprodukčního ústrojí. Expozice vysokým dávkám fytoestrogenů se u zvířat projevuje zhoršením sexuální aktivity a odlišnými parametry jatečné hmotnosti.

Podle názoru odborníků příznivý vliv fytoestrogenů na lidské zdraví převažuje nad možnými riziky. Přesto však rizika spojená s příjmem fytoestrogenních látek není možné přehlížet, obzvláště v případě mláďat nebo dětí.

Z toho důvodu je třeba zavést metodu, která by sloužila jak pro rychlý monitoring přítomnosti fytoestrogenů v rostlinných materiálech, tak pro přesné a citlivé stanovení výskytu těchto biologicky aktivních látek. Instrumentální technika ultra-účinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS), umožňuje

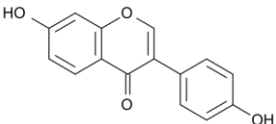
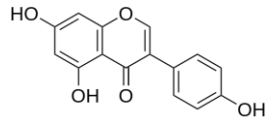
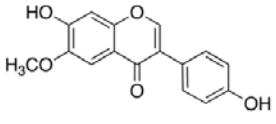
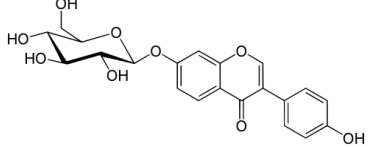
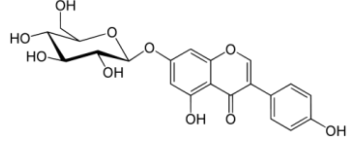
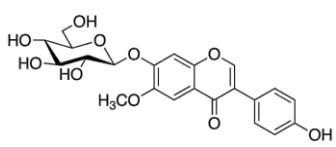
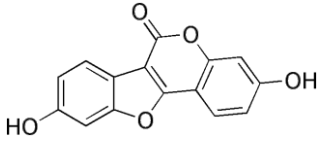
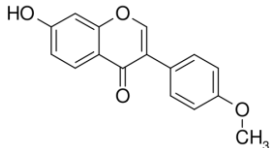
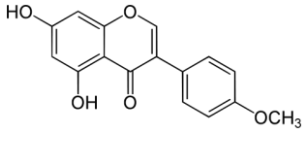
citlivé stanovení širokého spektra látek v rámci jedné analýzy během relativně krátkého času, což bude využito pro stanovení biologicky aktivních látek – isoflavonů v rostlinných matriálech typu senáž, siláž, poškozená senáž a siláž.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 POUŽITELNOST METODY

Metoda je určena pro analytické stanovení fytoestrogenních látek, konkrétně skupiny isoflavonů – daidzeinu, genisteinu, glyciteinu, daidzinu, genistinu, glycitinu, formononetinu, biochaninu A a pterokarpanu – kumestrolu. Je použitelná pro stanovení těchto analytů v rostlinných maticích. Popis a struktura stanovovaných analytů je uvedena v **Tabulce I**.

Tab. I: Popis a chemická struktura stanovovaných analytů

Název isoflavonu	IUPAC název (anglicky)	Chemická struktura	CAS číslo
Daidzein	7-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one		486-66-8
Genistein	5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one		446-72-0
Glycitein	7-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-6-methoxy-4H-chromen-4-one		40957-83-3
Daidzin	3-(4-hydroxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one		552-66-9
Genistin	5-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one		529-59-9
Glycitin	3-(4-hydroxyphenyl)-6-methoxy-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one		40246-10-4
Kumestrol	3,9-Dihydroxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone		479-13-0
Formononetin	7-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one		485-72-3
Biochanin A	5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one		491-80-5

3.2 PRINCIP METODY

Ve vzorcích krmiv (senáže či siláže) se volné aglykony a glykosidy stanoví vedle sebe. Sledované analyty se z matrice vyextrahují směsí metanolu s vodou (4:1, *v/v*). Ke stanovení celkového obsahu fytoestrogenů (glykosidů) se využívá kyselá hydrolýza za tepla. Za účelem korekce ztrát během přípravy vzorku a hydrolýzy se využívá při analýze přídavek vnitřního standardu chrysinu. Identifikace a kvantifikace jednotlivých analytů se provádí pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem. Analyty jsou identifikovány na základě sledování iontů (*m/z*) jednotlivých analytů a specifických přechodů prekurzorových iontů na produktové a také porovnáním retenčních časů s příslušnými standardy analytů. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na metodě kalibrační křivky, která byla vytvořena jako závislost poměru plochy standardu a plochy vnitřního standardu ku poměru koncentrace standardu a koncentrace vnitřního standardu.

3.3 BEZPEČNOST PRÁCE

Během manipulace se standardy isoflavonů, pterokarpanu a chrysinu je třeba dodržovat základní pravidla bezpečnosti práce v laboratoři. Genistein se vyznačuje akutní toxicitou v případě orálního požití této látky. Daidzein v případě kontaktu s pokožkou či očima, způsobuje podráždění. Proto je nezbytné pracovat v laboratorních rukavicích během přípravy zásobních standardních roztoků a celé další přípravy vzorků.

3.4 CHEMIKÁLIE A SPOTŘEBNÍ MATERIÁL¹

Standardy:

- Daidzein, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich (Německo)
- Genistein, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich (Německo)
- Glycitein, čistota ≥ 97 % (HPLC), Sigma-Aldrich (Německo)
- Daidzin, čistota ≥ 99 % (HPLC), Sigma-Aldrich (Německo)
- Genistin, čistota ≥ 95 % (HPLC), Sigma-Aldrich (Německo)
- Glycitin, čistota neuvedena, Sigma-Aldrich (Německo)

¹ Validace byla provedena s chemikáliemi uvedeného původu; lze však použít i jiného dodavatele za předpokladu, že kvalita bude odpovídající.

- Kumestrol, čistota ≥ 95 %, Sigma-Aldrich (Německo)
- Formononetin, čistota ≥ 99 %, Sigma-Aldrich (Německo)
- Biochanin A, čistota ≥ 95 %, Sigma-Aldrich (Německo)
- Chrysin, čistota ≥ 97 %, Sigma-Aldrich (Německo)

Rozpouštědla a činidla:

- Metanol, gradient grade for LC, Merck KGaA (Německo)
- Etanol, absolute for analysis, Merck KGaA (Německo)
- Kyselina octová, glacial 99,99 %, Sigma-Aldrich (Německo)
- Kyselina chlorovodíková, 35 %, p.a. Lach-Ner, s.r.o. (Německo)
- Upravená destilovaná voda, Milli Q RG – Millipore (Německo)

Materiál:

- Běžné laboratorní sklo
- Mikrofiltry, 0,2 μm , Chromservis (ČR)

3.5 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

- Elektronické váhy:
 - AND GR 202 (e = 1 mg, d = 0,01/0,1 mg) (Japonsko)
 - AND HF 1200G (e = 0,1 g, d = 0,01 g) (Japonsko)
- Laboratorní homogenizátor, Waring, (USA)
- Přístroj pro přípravu deionizované vody Milli-Q®, Millipore (Německo)
- Automatická pipeta 100 - 1000 μl FinnpiPETTE®, Thermo Fisher Scientific (USA)
- Automatická pipeta 1 - 10 ml FinnpiPETTE®, Thermo Fisher Scientific (USA)
- Mikrostříkačky o objemu 10, 50, 100, 250, 500 a 1000 μl Hamilton (USA)
- pH metr, Gryf 209 - pH Meter (ČR)
- Ultrazvuková lázeň, Bandelin Sonorex Super RK 510 (Německo)
- LC-MS systém:
 - Kapalinový chromatograf ACQUITY UPLC™, Waters (USA)
 - Analytická kolona Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm), Waters (USA)
 - Hmotnostní spektrometr AB SCIEX QTRAP® 5500 (Kanada)

3.6 PRACOVNÍ POSTUP

3.6.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Základní zásobní standardní roztoky daidzeinu, genisteinu, glycitinu, glyciteinu, daidzinu, genistinu, formononetinu, biochaninu A a kumestrolu jsou připraveny rozpuštěním přesné navážky (na analytických vahách) 10 mg certifikovaného standardu v pevném stavu v 10 ml metanolu, kdy vzniknou základní zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/ml. Chrysin (používaný jako vnitřní standard pro kvantifikaci analytů) dodávaný od výrobce v množství 25 g je na analytických vahách navážen v množství 25 mg a rozpuštěn v 25 ml metanolu. Všechny uvedené zásobní roztoky standardů musí být skladovány dle doporučení v certifikačním listu v mrazničce při teplotě -18 °C.

Ze zásobních roztoků daidzeinu, genisteinu, glyciteinu, daidzinu, genistinu, glycitinu, formononetinu, biochaninu A a kumestrolu byl připraven pracovní směsný standardní roztok o koncentraci 1000 ng/ml (roztok I) v metanolu. Dále jsou postupným ředěním připraveny pracovní směsné standardní roztoky II a III o koncentracích 100 ng/ml a 10 ng/ml (také v metanolu).

Tyto pracovní směsné standardy jsou pak uchovávány v mrazničce při teplotě -18 °C a používají se k přípravě kalibrační řady. Jednotlivé kalibrační řady (body kalibrační přímky) o koncentracích 0,5 - 500 ng/ml jsou připraveny odebráním definovaného množství pracovních směsných standardů do vialek (viz **Tab.II**), přičemž se do každé vialky přidá 10 ng chrysinu (výsledná hladina 10 ng/ml), využívaného jako vnitřní standard pro korekci objemu během úpravy vzorku. Následně se odfouká metanol jemným proudem dusíku a analyty se rozpustí v 1 ml směsi metanol/voda (50/50, v/v). Kalibrační roztoky se skladují v chladničce při teplotě +5 °C po dobu max. 3 měsíců.

Tab. II: Příprava směsných kalibračních roztoků isoflavonů

Standard	Pracovní směsný standard I (1000 ng/ml)	Pracovní směsný standard I (100 ng/ml)	Pracovní směsný standard I (10 ng/ml)	Kalibrace jednotlivých analytů v kalibračních roztocích (ng/ml)
STD 1	500 µl	x	x	500
STD 2	250 µl	x	x	250
STD 3	100 µl	x	x	100
STD 4	x	500 µl	x	50

STD 5	x	250 µl	x	25
STD 6	x	100 µl	x	10
STD 7	x	x	500 µl	5
STD 8	x	x	100 µl	1
STD 9	x	x	50 µl	0,5

3.6.2 Úprava vzorků krmiv k analýze

3.6.2.1 Homogenizace vzorků krmiva

Homogenizace vzorku je zajištěna laboratorním homogenizátorem. V případě potřeby je vzorek krmiva před samotnou homogenizací nejprve ručně pokrájen.

3.6.2.2 Stanovení obsahu volných fytoestrogenů

Ke 2 - 5 g homogenizovaného vzorku (navážka volena dle úrovně homogenity vzorku) je přidán 1 ml vnitřního standardu (chrysin) o koncentraci 10 000 ng/ml na výslednou koncentrační hladinu 10 ng/ml. Vzorek je posléze opakovaně extrahován 2 x 45 ml směsí metanolu s vodou (4:1, v/v) 2 x 30 min na ultrazvukové lázni. Jednotlivé získané extrakty jsou filtrovány (filtr č. 389) a filtrační koláč je promyt extrakční směsí (cca 10 ml) a doplněn na objem 100 ml extrakčním činidlem. Extrakt je před samotnou UHPLC-MS/MS analýzou filtrován přes mikrofiltr o porozitě 0,2 µm a převeden do vialky. Podle potřeby naředěn směsí metanolu s vodou (1:1, v/v).

3.6.2.3 Stanovení obsahu celkových fytoestrogenů

K 1- 2 g homogenizovaného vzorku (navážka volena dle úrovně homogenity vzorku) je přidáno 0,5 ml vnitřního standardu (chrysin) o koncentraci 10 000 ng/ml na výslednou koncentrační hladinu 10 ng/ml. Vzorek je hydrolyzován 10 ml 6 M kyseliny chlorovodíkové se 40 ml 96% etanolu v jednom podílu. Směs je zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě varu etanolu po dobu 4 hodin. Po ukončení hydrolyzy je získaný hydrolyzát přefiltrován (filtr č. 389) a filtrační koláč je promyt směsí metanolu s vodou (1:1, v/v). Hydrolyzát je doplněn na výsledný objem 50 ml směsí metanolu s vodou (1:1, v/v) a následně dle potřeby touto směsí naředěn. Po přefiltrování přes mikrofiltr o porozitě 0,2 µm je hydrolyzát převeden do vialky k UHPLC-MS/MS analýze. Dle potřeby je hydrolyzát naředěn směsí metanolu s vodou (1:1, v/v)

3.7 IDENTIFIKACE A KVANTIFIKACE

Identifikace a kvantifikace jsou poslední kroky analytického postupu, kdy dochází k separaci a detekci cílových analytů. Všechny analyty včetně vnitřního standardu chrysinu jsou stanoveny metodou ultra-účinné kapalinové chromatografie (UHPLC) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (MS/MS). K ionizaci je využit elektropray v negativním módu. Podmínky metody kapalinové chromatografie jsou uvedeny v **Tab. III**, parametry metody hmotnostní spektrometrie shrnuje **Tab. IV**. Sledované fragmentační přechody prekurzorových iontů na ionty produktové – kvantifikační a konfirmační, při tandemové spektrometrii (MS/MS) a optimální podmínky jsou shrnuty v **Tab. V**. Pro každý analyt byl sledován jeden kvantifikační a jeden konfirmační přechod. V **Tab. VI** jsou uvedeny retenční časy analytů (při výše zmiňovaných podmínkách nastavení přístrojů a metody).

Tab. III: Parametry metody kapalinové chromatografie

Přístroj	ACQUITY UPLC™, Waters				
Kolona	ACQUITY, BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm), Waters				
Mobilní fáze	A – 0,1% vodný roztok kyseliny octové* B – Metanol				
Gradientová eluce analytů	Čas (min.)	Průtok (ml/min.)	A (%)	B (%)	Křivka
	počáteční	0,3	80	20	
	0,5	0,3	80	20	6
	4	0,45	50	50	6
	6	0,5	0,1	99,9	6
	8	0,5	0,1	99,9	1
	10	0,5	80	20	1
Doba analýzy 1 vzorku	10 min.				
Objem nástřiku	2 μl				
Teplota kolony	35 °C				
Teplota autosampleru	10 °C				

Pozn: *Redestilovaná voda se získá přečištěním z destilované vody pomocí zařízení Milli-Q, vodný roztok 0,1 % kyseliny octové se získá přidávkou příslušného množství kyseliny do požadovaného objemu vody.

Tab. IV: Parametry metody hmotnostní spektrometrie

Přístroj	Applied Biosystems SCIEX QTRAP® 5500
Ionizace	ESI-
Ion Source	Turbo Spray
Scan Type	MRM
Dwell Time	25 ms
Curtain Gas	N ₂ , 25 psi
Collision Gas	Medium
Ion Spray Voltage	-4500 V
Ion Spray Temperature	450 °C
Ion Source Gas 1/2	air, 55 psi

Tab. V: Sledované fragmentační přechody iontů a optimální podmínky stanovení analytů

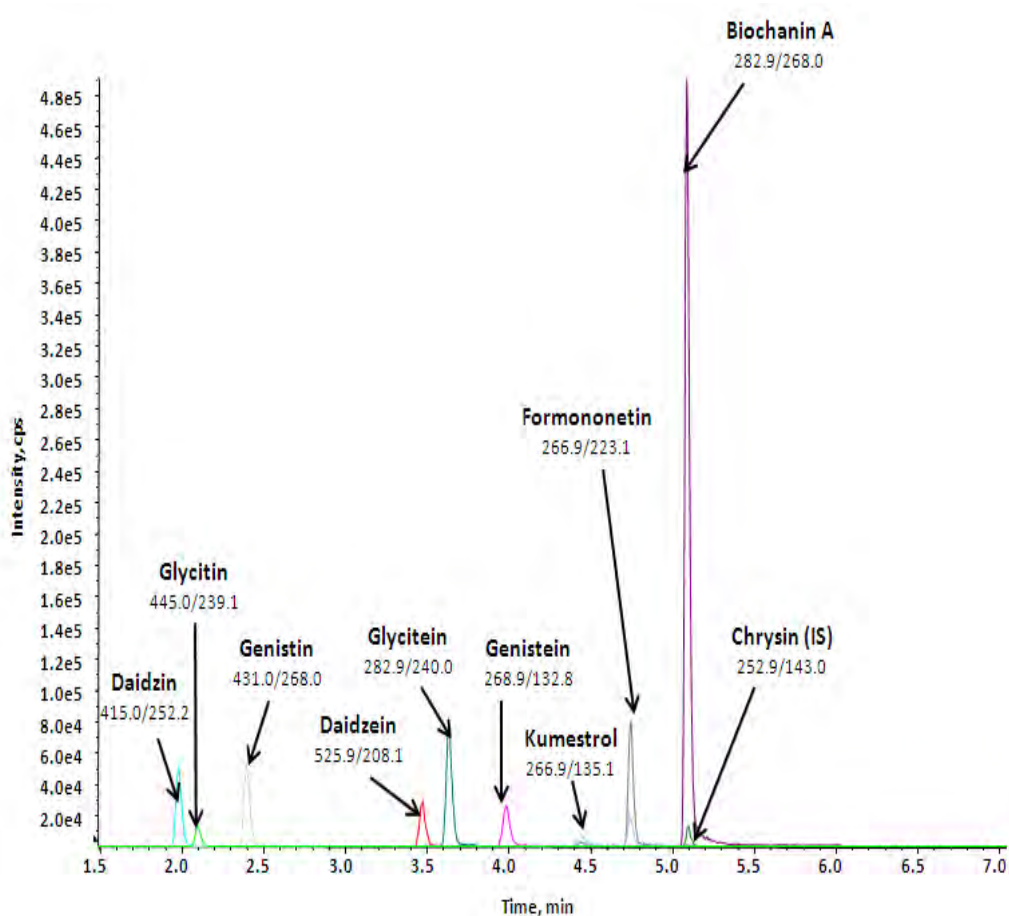
Analyt	Prekurzorový ion (<i>m/z</i>)	Produktový ion (<i>m/z</i>)	Ion	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Daidzein - kvant.	252,91	208,10	252,91	-40	-10	-37	-10
Daidzein - konf.	252,91	222,90	[daidzein-H] ⁺	-40	-10	-37	-10
Genistein - kvant.	268,91	132,86	268,91	-85	-10	-37	-10
Genistein - konf.	268,91	159,00	[genistein-H] ⁺	-130	-10	-37	-10
Glycitein - kvant.	282,86	240,90	282,86	-65	-10	-37	-10
Glycitein - konf.	282,86	268,00	[glycitein-H] ⁺	-65	-10	-37	-10
Formononetin - kvant.	266,9	223,1	266,9	-220	-10	-42	-9
Formononetin - konf.	266,9	195,1	[formononetin-H] ⁺	-220	-10	-50	-9
Kumestrol - kvant.	266,9	135,1	266,9	-190	-10	-40	-7
Kumestrol - konf.	266,9	195,1	[kumestrol-H] ⁺	-190	-10	-52	-9
Daidzin - kvant.	415,0	252,2	415,0	-225	-10	-36	-11
Daidzin - konf.	415,0	223,0	[daidzin-H] ⁺	-225	-10	-60	-9
Genistin - kvant.	431,0	268	431,0	-210	-10	-38	-11
Genistin - konf.	431,0	269,1	[genistin-H] ⁺	-210	-10	-34	-13
Glycitin - kvant.	445,0	239,1	445,0	-240	-10	-58	-11
Glycitin - konf.	445,0	267,1	[glycitin-H] ⁺	-240	-10	-46	-13
Biochanin A - kvant.	282,9	268,0	282,9	-165	-10	-30	-11
Biochanin A - konf.	282,9	239,1	[biochanin A-H] ⁺	-165	-10	-44	-11
IS. Chrysin - kvant.	252,96	144,80	252,96	-85	-10	-34	-7
IS. Chrysin - konf.	252,96	107,00	[chrysin-H] ⁺	-85	-10	-40	-9

Tab. VI: Retenční časy sledovaných analytů

Analyt	Retenční čas (min.)	Analyt	Retenční čas (min.)
Daidzin	1,98	Genistein	3,98
Glycitin	2,10	Kumestrol	4,44
Genistin	2,40	Formononetin	4,74
Daidzein	3,47	Biochanin A	5,08
Glycitein	3,63	Chrysin (IS)	5,10

3.7.1 Stabilizace systému

Před vlastní analýzou vzorků je třeba promýt kolonu a vyčkat na dosažení požadovaných parametrů (teplota, tlak, průtok, složení mobilní fáze) systému, cca 30 min. První nástřik ze sekvence vzorků je pouze orientační a používá se k verifikaci systému, zejména k ověření stability a retenčních časů sledovaných analytů. Separace směsného standardu isoflavonů je zobrazena na **Obrázku 2**.



Obrázek 2: Ukázka chromatogramu směsného standardu fytoestrogenů (daidzinu, genistinu, glycitinu, daidzeinu, genisteinu, glyciteinu, formononetinu, biochaninu A a kumestrolu) o koncentraci 50 ng/ml a vnitřního standardu (chrysinu) o koncentraci 10 ng/ml.

3.8 PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY METODY

3.8.1 *Správnost metody*

V současné době nejsou komerčně dostupné certifikované referenční materiály, obsahující stanovované isoflavonové látky. Správnost metody by tedy měla být pravidelně ověřována a kontrolována analýzou reálného materiálu s umělým přídavkem analytů do matrice. Správnost metody pro stanovení celkového obsahu fytoestrogenů v rostlinné matrici není možno ověřit, jelikož přirozené hladiny některých sledovaných analytů v rostlinné matrici (krmivo) jsou poměrně vysoké a k dispozici je pouze malé množství analytických standardů. Umělý přídavek analytů do rostlinné matrice musí být pro stanovení výtěžnosti minimálně 2 – 3 x vyšší než přirozený obsah. V **Tab. VII** jsou uvedeny výtěžnosti pro rostlinnou matrici získané na základě analýzy umělým přídavkem analytů do vzorku krmiva.

Tab. VII: Výtěžnost metody pro stanovení volných fytoestrogenů v rostlinné matrici – krmivo

Analyt	Výtěžnost (%)
Glycitein	98
Genistein	103
Daidzein	100
Biochanin A	119
Kumestrol	108
Formononetin	105
Glycitin	94
Genistin	89
Daidzin	96

3.8.2 *Rozsah metody a linearita*

Vzhledem k tomu, že se sledované analyty mohou vyskytovat v reálných vzorcích v širokém rozsahu hladin, je nutné volit pro kalibraci rozsah koncentrací standardů v dostatečně širokém rozmezí, odpovídajícím reálným nálezům.

V používaném kalibračním rozsahu 0,5 – 500 ng/ml pro jednotlivé analyzované analyty, který odpovídá nalezeným hladinám isoflavonů v reálných vzorcích, je odezva detektoru za podmínek metody lineární. Jestliže jsou nálezy hladin analytů vyšší než odpovídající kalibrační rozsah, je nutné vzorky před samotnou UHPLC-MS/MS analýzou naředit v příslušném poměru.

3.8.3 Mez stanovitelnosti (LOQ)

Mez stanovitelnosti (LOQ – limit of quantification) je nejnižší množství sledované látky (analytu) ve vzorku, které může být kvantitativně stanoveno s předem definovanou přesností. Většinou se stanovuje jako trojnásobek meze detekce. Pro uvažované aplikace je mez stanovitelnosti zpravidla brána jako nejnižší koncentrace kalibrační křivky (standard o nejnižší koncentraci). V **Tab. VIII** jsou shrnuty LOQ všech analyzovaných isoflavonů. Tyto hodnoty byly pro jednotlivé analyty zjištěny metodou UHPLC-MS/MS pomocí nástřiku kalibrační řady standardů.

Tab. VIII: Meze stanovitelnosti analyzovaných fytoestrogenů

Sledovaný analyt	LOQ (mg/kg)
Daidzein	0,3
Genistein	1
Glycitein	0,2
Daidzin	0,6
Genistin	0,6
Glycitin	3
Formononetin	0,6
Biochanin A	0,6
Kumestrol	7,5

3.8.4 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody lze charakterizovat relativní směrodatnou odchylkou (RSDr, CVr), která se získá z šesti opakovaných analýz vzorku. Hodnoty RSDr (%), které byly získány pro rostlinné matrice (krmivo), jsou uvedeny v **Tab. IX**.

Tab. IX: Opakovatelnost metody pro rostlinnou matrici - krmivo

Analyt	RSDr (%), n = 6	
	Volné fytoestrogeny	Celkové fytoestrogeny
Glycitein	5	12
Genistein	12	14
Daidzein	14	14
Glycitin	*	*
Genistin	16	23
Daidzin	14	14
Biochanin A	14	20
Formononetin	9	16
Kumestrol	*	*

* Glycitin, kumestrol nebyly ve vzorku detekovány nebo jeho hladiny byly <LOQ

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Sledování obsahu fytoestrogenů je dosud nejčastěji prováděno v potravinách sójového původu. Jedná se hlavně o sójové boby samotné, sójové boby naklíčené, sójovou mouku a výrobky z ní jako je sýr to-fu, sójové mléko aj. Jsou popsány metody stanovení i pro další komodity a to např. ovoce a zeleninu, ořechy či alkoholické nápoje.

Co se týče stanovení isoflavonů v rostlinném či biologickém materiálu předchozí studie zařazovali ve většině případů přečištění vzorků pomocí extrakce na tuhou fázi (SPE kolonky). Za poslední desetiletí se metody užívané k separaci a detekci fytoestrogenů značně změnily. Zpočátku se metody odvozovaly od tradičních steroidních analýz. Použita byla plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (GC/MS), které však předcházelo přečišťování vzorku a derivatizace na trimethylsilylery. Tento přístup je poměrně složitý, zdoluhavý a ne zcela přesný. Přednost byla dána metodám, které nevyžadují derivatizaci fytoestrogenů. Pro měření obsahu fytoestrogenů je dnes velmi často využíváno vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV detektorem. Používá se také elektrochemický detektor, který není obecně specifický a je užíván spíše pro jednodušší aplikace.

Doba analýzy uvedených systémů často přesahuje 30 min. a dosažené detekční limity se pohybují na hladinách $\mu\text{g/ml}$ ($\mu\text{g/g}$). Proto v případě měření obsahu fytoestrogenů v rostlinných matricích, nejsou tyto techniky příliš vhodné, jelikož některé sledované fytoestrogeny jsou zde přítomny na velmi nízkých hladinách (jednotky až stovky ng/ml).

Výhoda výše popsané metodiky spočívá v jednoduché přípravě vzorku bez použití zdoluhavého přečištění pomocí SPE kolonek. Pro korekci ztrát během přípravy vzorku a hydrolýzy se využívá při analýze vnitřní standard. Další důležitou a nespornou novostí uvedeného analytického postupu je použití citlivé instrumentace, pracující na principu ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí UHPLC-MS/MS. Použité přístroje umožňují separaci i detekci všech stanovovaných analytů v průběhu 10 min. s nízkými detekčními limity (ng/ml , ng/g).

5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Uvedená analytická metoda, umožňující detekci výše zmiňovaných fytoestrogenů na velmi nízkých koncentračních hladinách, může zajistit operativní analýzu v rámci např. kontroly složení krmiv či krmných dávek a kontroly potravin, kdy získané výsledky mohou dále přispívat k rozšíření znalostí o výskytu těchto biologicky aktivních látek v řetězci krmivo – potravinářský produkt, případně v nutraceutikách.

Parametry a pracovní charakteristiky uvedené analytické metody, která je založená na principu UHPLC-MS/MS stanovení volných i vázaných fytoestrogenů a vyhovují požadavkům, kladeným na moderní analytické metody.

Metodika byla vyvinuta pro účely projektu **QI111CO16 „Navrhnout nové postupy údržby trvalých travních porostů v LFA minimalizací hygienických rizik spojených s výskytem alergenních mikroorganismů především z rodu Fusarium“**. Aplikace metody v rámci tohoto projektu významně přispěje ke zmapování hladin fytoestrogenů v rostlinných matricích (senáž, siláž, poškozená senáž a siláž), získané poznatky pak budou využity pro posouzení vlivu různých postupů výroby objemných krmiv včetně jejich skladování na obsah fytoestrogenů.

Smluvním uživatelem metodiky je společnost Agrolab, s.r.o, která se zabývá rozbory krmiv. Certifikovanou metodiku bude využívat při kontrole krmiv a vstupních surovin pro jejich výrobu.

Metoda může být také využita např. pro rutinní analýzy v laboratořích Státní zemědělské a potravinářské inspekce (SZPI), Státních veterinárních ústavů (SVÚ) a Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ). Uvedenou metodiku je však také možno aplikovat v dalších státních i soukromých laboratořích a výzkumných centrech. Pokud tyto laboratoře nedisponují potřebným analytickým vybavením, předpokládá se pro analytickou část metodiky spolupráce s VŠCHT či instrumentálně odpovídajícím způsobem vybavenými komerčními laboratořemi formou služby.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Výhoda výše popsané metodiky spočívá v jednoduché přípravě vzorku bez použití zdlouhavého přečištění pomocí SPE kolonek (Oasis HLB). V předchozích studiích i vlastní analytické praxi byla pro přečištění extraktů vzorků používána technika extrakce na tuhou fázi, která zvyšovala dobu přípravy vzorku a kladla zvýšené nároky na pracovní sílu. Cena 100 kusů HLB kolonek je přibližně 13 000,- Kč (bez DPH) a tak odstraněním čistícího kroku dojde k finanční úspoře částky více než 300,- Kč na 1 vzorek (při paralelním stanovení).

Ke stanovení steroidních látek se dříve využívala metoda plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (GC/MS), které však předcházelo také přečišťování vzorku a derivatizace na trimethylsilylethery. Tento přístup je poměrně složitý, zdlouhavý, doba analýzy uvedených systémů často přesahuje 30 min. Nespornou výhodou použití citlivé instrumentace, pracující na principu ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí UPLC-MS/MS je dosažení vyšší citlivosti stanovení a výrazného zkrácení doby analýzy na pouze 10 min.

Výše uvedené aspekty vedou kromě snížení ceny analýzy jednoho vzorku také k významnému zvýšení průchodnosti analytické laboratoře.

7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Velíšek J.: Chemie potravin 3. *OSSIS Tábor*, **2002**
- Sakakibara H., Viala D., Ollier A., Combeau A., Besle J.-M.: **Isoflavones in several clover species and in milk from goats fed clovers**; *BioFactors*; **2004**, 22, 237–239
- Beck V., Rohr U., Jungbauer A.: **Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy?**; *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; **2005**, 94, 499-518
- Tsao R., Papadopoulos Y., Yang R., Young J. CH., McRae K.: **Isoflavone profile of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2006**, 54, 5797-5805
- Saviranta N.M.M., Anttonen M.J., von Wright A., Karjalainen R.O.: Red clover (*Trifolium pratense* L.) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar; *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 2008, 88, 125–132
- Antignac J.-P., et al.: Multi-functional sample preparation procedure for measuring phytoestrogens in milk, cereals, and baby-food by liquid-chromatography tandem mass spectrometry with subsequent determination of their estrogenic activity using transcriptomic assay; *Analytica Chimica Acta*; 2009, 637, 1-2, 55-63
- Sabudak T., Guler N.: *Trifolium* L. – A Review on its Phytochemical and Pharmacological Profile; *Phytotherapy Research*; 2009, 23, 439–446
- Patisaul H.B., Jefferson W.: **The pros and cons of phytoestrogens**; *Frontiers in neuroendocrinology*; **2010**, 31, 400-419
- Behr M., Oehlmann, J., Wagner M.: Estrogens in the daily diet: In vitro analysis indicates that estrogenic activity is omnipresent in foodstuff and infant formula; *Food and Chemical Toxicology*; 2011, 49, 2681–2688
- Cederroth, CH. R., Zimmermann, C., Nef, S.: Soy, **phytoestrogens and their impact on reproductive health**; *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2012**, 355, 192-200.
- Konar, N., Poyrazoğlu, E. S., Demir, K., Artik, N.: Effect of different sample preparation methods on isoflavone, lignan, coumestan and flavonoid contents of variol vegetables determined by triple quadrupole LC-MS/MS; *Journal of Food Composition and Analysis*; 2012, 26, 26-35.
- Mahnoud, A. M., Yang, W., Bosland, M. C.: **Soy isoflavones and prostate cancer: A review of molecular**; *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **2014**, 140, 116-132.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE

- Třináctý, J., Křížová, L., Schulzová, V., Hajšlová, J., Hanuš, O.: **The effect of feeding soybeanderived phytoestrogens on their concentration in plasma and milk of lactating dairy cows.** *Archives Animal Nutr.* 63(3), 219-229, **2009**. ISSN 1745-039X
- Krajčová A., Schulzová V., Lojza J., Křížová L., Hajšlová J.: **Phytoestrogens in Bovine Plasma and Milk – LC-MS/MS Analysis;** *Czech J. Food Sci.*, 28, 264-274, **2010**. ISSN 1212-1800
- Krajčová A., Schulzová V., Smutná L., Hajšlová J.: **Přenos fytoestrogenů do mléka dojnic a jejich dynamika při technologickém zpracování.** XL. symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, 128-131, Sklalský Dvůr, Česká republika, 3.-5.5.**2010**. ISSN 1802-1433
- Sosnovcová I., Hurajová A., Schulzová V., Hajšlová J.: **Transfer fytoestrogenních látek z krmiva do mléka a mléčných výrobků.** XLI. symposia o nových směrech výroby a hodnocení potravin, 28-31. Skalský Dvůr, Česká republika, 23.-25.5.**2011**. ISSN 1802-1433
- Krtková V., Schulzová V., Novotná H., Hajšlová J.: **Monitoring fytoestrogenů v travních porostech v závislosti na ošetření a skladování.** XLIII. symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, 92-95, Skalský Dvůr, Česká republika, 27.-29.5.**2013**. ISSN 1802-1433

Jana Hajšlová, Věra Schulzová, Veronika Krtková, Jan Nedělník

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA číslo: 2014/96506

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6

Tisk: KANAG – TISK, s.r.o., Technická 5, 166 28 Praha 6
Rok vydání: 2014

Počet stran: 25