

CHROMATOGRAPHY DETERMINATION OF ISOFLAVONES IN VEGETATIVE AND GENERATIVE PART HERBAGE SOYA PLANTS (*GLYCINE MAX*)

CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ ISOFLAVONŮ VE VEGETATIVNÍCH A GENERATIVNÍCH ČÁSTECH ROSTLIN SÓJE (*GLYCINE MAX*)

Mikelová R., Klejdus B., Kizek R.

Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

ABSTRACT

Concentrations of daidzin, genistin, ononin, daidzein, genistein, formononetin and biochanin A were studied in individual parts of soya (*Glycine max*), species Rita. High performance liquid chromatography with Diode array detection was used for the isoflavone analysis. The isoflavones was analysed and separated on chromatographic column with reversed phase Zorbax C18-AAA (150 mm x 4,6 mm, particle size 3,5 μm , Agilent Technologies USA) by gradient elution. Mobile phase (A) was acetonitrile and mobile phase (B) was 0,3 % formic acid, flow rate 0.8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, temperature on column was 40 $^{\circ}\text{C}$. Plant material was extracted to 80 % methanol by sonication during 30 min. Undesirable interfering compounds was cleared out from extract by refining at SPE column. The prepared extracts from plant parts were injected on chromatographic column. Isoflavone content greatly wavered in individual parts of plants. The highest concentration in plant had daidzein and genistein from all studied compounds. Absolutely highest isoflavone concentration was observed in roots and beans. Soybeans are basic material for food production and isoflavone level in them influence its amount in foodstuff.

Keywords: bean plants, soya (*Glycine max*), isoflavones, phytoestrogens, HPLC-UV, DAD-detector

ABSTRAKT

Byly studovány koncentrace daidzinu, genistinu, ononinu, daidzeinu, genisteinu, formononetinu a biochaninu A v jednotlivých částech rostliny sóje (*Glycine max*) odrůdy Rita. Pro analýzu bylo využito vysoko-účinné kapalinové chromatografie s detekcí diodovým polem. Isoflavony byly analyzovány a separovány na chromatografické koloně reversní-fáze Zorbax C18-AAA (150 mm x 4,6 mm, velikostí částic 3,5 μm , Agilent Technologies USA) gradientovou elucí. Mobilní fází (A) byl acetonitril a mobilní fází (B) 0,3 % kyselina mravenčí, průtok 0.8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, teplota na koloně 40 $^{\circ}\text{C}$. Rostlinný materiál byl extrahován do 80 % methanolu pomocí

ultrazvuku po dobu 30 min. Nežádoucí interferující látky byly z extraktu odstraněny přečistěním přes systém SPE kolony. Takto připravené extrakty z rostlinných částí byly nanášeny na chromatografickou kolonu. Koncentrace isoflavonů v jednotlivých částech rostliny značně kolísaly. Nejvyšší zastoupení bylo glykosilovaných isoflavonů (daidzinu a genistinu). Absolutně nejvyšší množství bylo pozorováno v kořenech a semenech. Sojové boby jsou základním materiálem pro produkci potravin a hladina isoflavonů v nich ovlivňuje jejich množství v potravinách.

Klíčová slova: bobovité rostliny, sója (*Glycine max*), isoflavony, fytoestrogeny, HPLC-UV, DAD-detektor

ÚVOD

Sója luštinatá (*Glycine max*) je kulturní rostlina pocházející z jihovýchodní Asie (Čína). Podle různých zdrojů je původ sóji datován asi do období 1 000-2 000 let př.n. l. Do Evropy a Ameriky se dostala v 18. století. Na počátku se využívala převážně jako krmivo pro hospodářská zvířata. Později začala být využívána v potravinářském průmyslu (potravinářský olej, proteinové výrobky a zelenina) a jako hrubý materiál pro průmysl (barviva, inkousty, lepidla a pěny)[1]. Dnes produkují v USA, Argentině, Paraguaji a Brazílii většinu světové produkce. Evropa i Čína produkují asi 10 % této produkce [1,2]. V naší republice byla sója pěstována ve větším množství v roce 1949 na výměře 2630 hektarů, což je plocha téměř identická s plochou v roce 2001. Další rozvoj této plodiny u nás omezuje především nedostatek vhodných odrůd [3].

Čeď *Fabacea* je velmi rozlehlou rodinou s více než 700 rody a 17 000 druhy obsahující byliny, keře a stromy rostoucí v rozdílných prostředích od mokřadů pro pouště. Jednou ze základních vlastností je symbióza hlízkových bakterií rodu *Rhizobium* s jejich kořeny. Rostlinám bakterie přináší atmosférický dusík, který je začleňován do organických sloučenin. Botanicky je sója (*Glycine max*) jednoletá, krátko-denní bylina, vysoká asi 1 m, hustě ochlupená a dosti rozvětvená s trojčetnými listy a malými bílými až fialovými květy. Plody jsou tobolky s několika vejcovitými, lesklými, obyčejně žlutými semeny (Obr.1). Výjimečné postavení sóji mezi luštěninami je dáno chemickým složením semen. Semena jsou potravinou a jedním z nejbohatších zdrojů bílkovin ve světě a obsahují 15 až 25 % oleje, který je složen zejména z esterů kyseliny linolové (50%), olejové (25–30%) a linoleové (2–10%). Menší množství kyseliny stearové, palmitové a arachidové. Ze sacharidů sója obsahuje sacharosu a nestravitelné oligosacharidy rafinosu a stachyosu. Z vitamínů jsou v sóji ve významném množství vitamíny skupiny B a E, z minerálních látek pak vápník, hořčík a železo. [4]. Dále sója obsahuje významné sekundární metabolity (flavony, isoflavony, coumestranly a lignany). Isoflavonoidy jsou skupinou flavonoidních látek vykazujících různé biologické účinky. Je známo asi 200 isoflavonoidů a jejich výskyt se prakticky omezuje na luštěniny (čeď bobovitých *Fabaceae*). V menším množství se isoflavony vyskytují také v čeďech laskavcovitých (*Amaranthaceae*),

kosatcovitých (*Iridaceae*), morušovníkovitých (*Moraceae*) a růžovitých (*Rosaceae*) [5]. Isoflavony byly nalezeny především v chloroplastech nadzemních částí orgánů rostlin, ve stopovém množství i v kořenech. Vyskytují se jako látky konstituční nebo se objevují jako výsledek působení stresu či za obou okolností. Isoflavony plní určité funkce v obranném systému rostliny jako přirozená ochrana proti infekci, při klíčení semen, napadení hmyzem a poškození škůdci [6].

Účinek isoflavonů na zdraví zvířat a lidí není doposud uspokojivě vysvětlen, avšak bylo prokázáno, že jsou slabými estrogeny. Z řady randomizovaných studií vyplývá, že isoflavony přijímané v potravě mohou působit preventivně u některých druhů rakoviny či osteoporózy. Také u žen v menopauze pomáhají mírně zvyšovat nízkou hladinu estrogenu [7-10].

Vysoko-účinná kapalinová chromatografie je metoda velmi vhodná pro separaci látek. Separované látky se od sebe oddělují podle rozdílných sil, kterými reagují s dvěma fázemi (stacionární a mobilní). Pro separaci isoflavonů byla vypracována celá řada analytických postupů pomocí HPLC s různými způsoby detekce [11-13].

V naší práci jsme se zaměřili na stanovení koncentrace isoflavonů v různých částech rostliny sóje pomocí HPLC-UV. Nezbytnou podmínkou byla vhodná příprava biologického vzorku pro analýzu a způsob extrakce.

MATERIÁL A METODY

Chemikálie

Isoflavony byly zakoupeny od Karlsroth GmbH (Karlsruhe, Germany). Acetonitril pro HPLC byl použit od firmy Merck (Darmstadt, Germany). Ostatní analytická činidla ACS čistoty byla zakoupena od firmy Sigma Aldrich Chemical Corp. (St. Louis, USA). Standardní roztoky byly připraveny o koncentraci 10 µg/ml ACS methanolu (Sigma Aldrich, USA) a uchovávány ve tmě při 4 °C. Všechny roztoky byly filtrovány přes 0,45 µm teflonové membránové filtry (MetaChem, Torrance, CA, USA) před započítím HPLC analýzy.

HPLC–UV

HP 1100 chromatografický systém (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) byl vybaven vakuovým degaserem (G1322A), kvartérní pumpou (G1311A), autosamplerem (G13113A), kolonovým termostatem (G1313A) a detektorem diodového pole (model G1315B). ChemStation software (Rev A07.01) řídí celý kapalinový chromatografický systém. Isoflavony byly separovány na chromatografické koloně reversní-fáze Zorbax C18-AAA (150 mm x 4,6 mm, velikostí částic 3,5 µm, Agilent Technologies USA) gradientovou elucí. Mobilní fází A byl acetonitril a mobilní fází B 0,3 % kyselina mravenčí. Průtok byl 0.8 ml min⁻¹. Teplota na koloně byla nastavena na 40 °C. Gradient je uveden na insetu obrázku 3. Spektra byla snímána v rozmezí 190–400 nm.

Rostlinný materiál

Odrůda sója (*Glycine max*) Rita byla vyšlechtěna ve šlechtitelské stanici Horní Moštěnice. Výška jedné rostliny byla 70 – 85 cm, hmotnost v suchém stavu: lusků 25 – 35 g, sojových bobů 50 – 60 g, kořenů 5 – 10 g, stonků 15 – 25 g, listů 5 – 10 g. Rostliny byly pěstovány v sezóně 2003 na pokusných pozemcích MZLU – Žabčice (průměrná teplota 8,2 °C a úhrn srážek 520 mm). Při setí byl aplikován rhizobiální přípravek HISTICK (B.O.R. ČR). Po sklizni (září 2003) byly rostliny očištěny od zbytků zeminy a sušeny za pokojové teploty.

Extrakce isoflavonů z rostliny

Jednotlivé části rostliny byly nahrubo drceny v třecí misce a nejmenno homogenizovány pomocí mlýnku Ika A11 basic. 0,5 g biologického vzorku bylo přeneseno do 30 ml 80% methanolu_{aq} a sonikováno při 38 kHz, 150 W (K5, Kraintek) za laboratorní teploty 30 minut. Rostlinný extrakt byl přefiltrován přes filtrační papír (modrá páska, 390) a doplněn na objem 50 ml. Z něj odebraná část (10 ml) byla odpařena na vakuové odparce (Ika RV05–ST). Odparek byl rozpuštěn v 1 ml 50% methanolu_{aq}, a přefiltrován přes teflonový membránový filtr (0,45 µm).

Extrakce na SPE kolonách

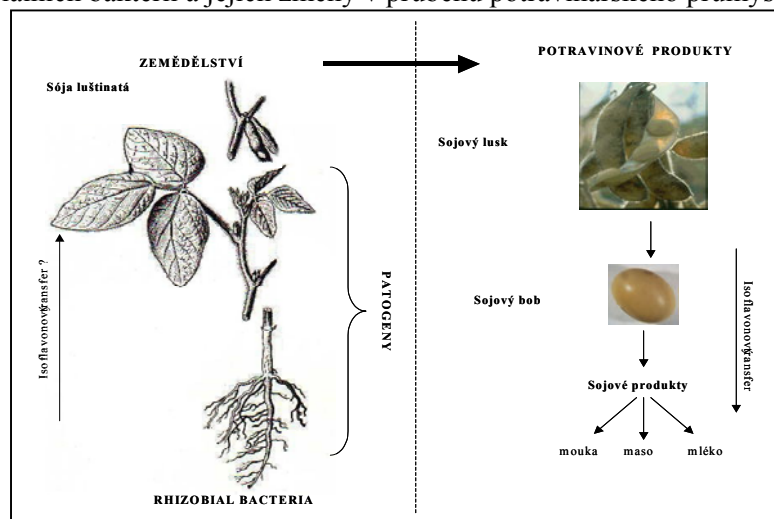
Methanolové extrakty ze stonku, listu a celé rostliny byly přečištěny od flavonoidních látek SPE extrakcí (extrakce na pevné fázi) na počítačem řízeném robotu Aspec XL, Gilson. Použitá kolona byla HLB OASIS Waters. Kolona před použitím byla kondicionována nejprve 1 ml 100% methanolu, poté 1 ml destilované vody. 5 ml extraktu získaného sonikací bylo odpařeno. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml 80% ethanolu a byly přidány 3 ml destilované vody. SPE procedura byla složena ze čtyř kroků. V prvním kroku byly na kolonu nanесeny 3 ml vzorku; v druhém kroku – kolona promyta 1 ml 5% methanolu okyseleným 2% kyselinou octovou; ve třetím kroku – nanесen 1 ml směsi 20% methanolu a 2% hydroxidu amonného (eluce flavonoidů); čtvrtém kroku – postupně přidávány 1 ml 60%, 80% a 100% methanolu s 2% hydroxidem amonným. Získaná směsná frakce obsahující isoflavony byla odpařena. Odparek byl rozpuštěn v 0,5 ml 50% methanolu, přefiltrován přes teflonový membránový filtr (0,45 µm).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Čeleď *Fabaceae* zahrnuje rostlinné druhy velmi významné ve výživě lidí a zvířat. Spojené Národy a FAO hledají rostlinné druhy, které budou vysoce produkční a velmi rezistentní k patogenům a dalším škůdcům pro zajištění dostatečné výživy lidí a zvířat [2]. Sója (*Glycine max*) patří k několika málo rostlinným druhům, který splňuje tuto podmínku. Vliv isoflavonů na zdraví zvířat a lidí není doposud uspokojivě vysvětlen. O vlastní distribuci isoflavonů v rostlinách toho také není mnoho známo. Je zajímavé, že rhizobiální bakterie zvyšují koncentraci isoflavonů, podobně jak tomu je v případě napadení rostliny patogenem nebo jiným škůdcem (Obr. 1) [14-16]. A proto je vliv samotného prostředí velmi důležitým faktorem pro

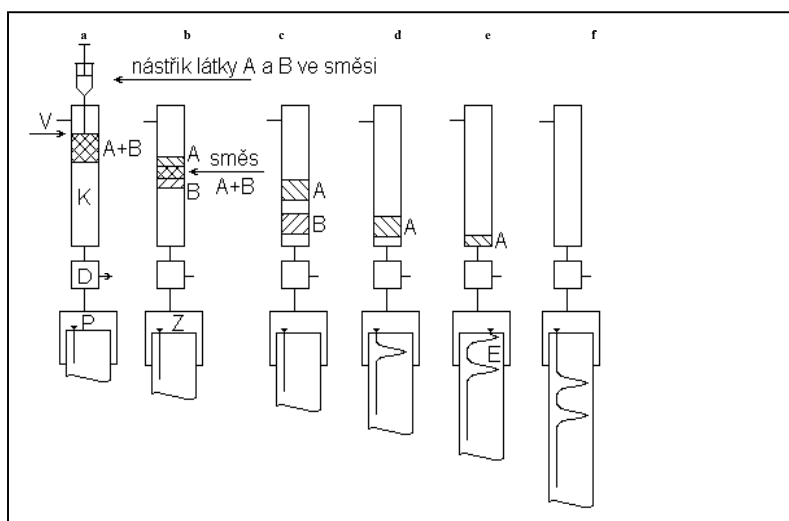
studium koncentrace isoflavonů v rostlinách (Obr.1). Všechny tyto látky vyprodukované rostlinami vstupují do potravinářského průmyslu (Obr.1).

Obr. 1: Schéma zvýšení koncentrace isoflavonů v rostlině sója během působení pathogenů a rhizobialních bakterií a jejich změny v průběhu potravinářského průmyslu



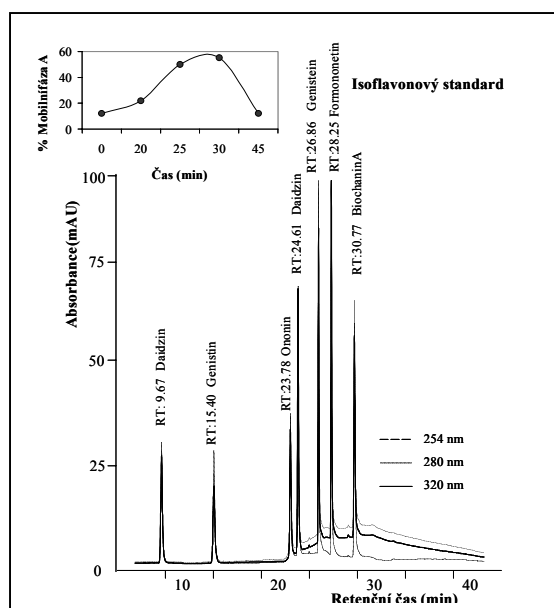
Proto, abychom mohli studovat sekundární metabolity u rostlin, je nezbytné využívat selektivní a velmi citlivé analytické metody. Do těchto metod patří vysoko-účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Separované látky se od sebe oddělují podle rozdílných sil, kterými reagují s dvěma fázemi (stacionární a mobilní). Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně a separovaná látka je přes ni unášena mobilní fází. Mezi separovanými látkami a stacionární fází kolony dochází k interakci. Látky se na koloně zachytávají a při změně koncentrace, pH, iontové síly mobilní fáze jsou z kolony uvolněny, což je ukázáno na obrázku 2. Při nástřiku látek do chromatografické kolony se nejprve vytvoří eluční pás obsahující směs látek (a). Ty jsou potom unášeny mobilní fází a na náplni kolony dochází k jejich separaci (b, c). Po výstupu první látky z kolony indikuje detektor její přítomnost v eluátu a zaznamená eluční pík (d). Jakmile rozdělené látky vyjdou z kolony, jsou počítačem zaznamenány jako eluční píky (e, f).

Obr. 2: Schéma chromatografického dělení látek. Po nástřiku se vytvoří eluční pás (a); interakcí se sorbentem dochází k separaci (b, c, d); detektor zaznamená eluční pík (e, f).



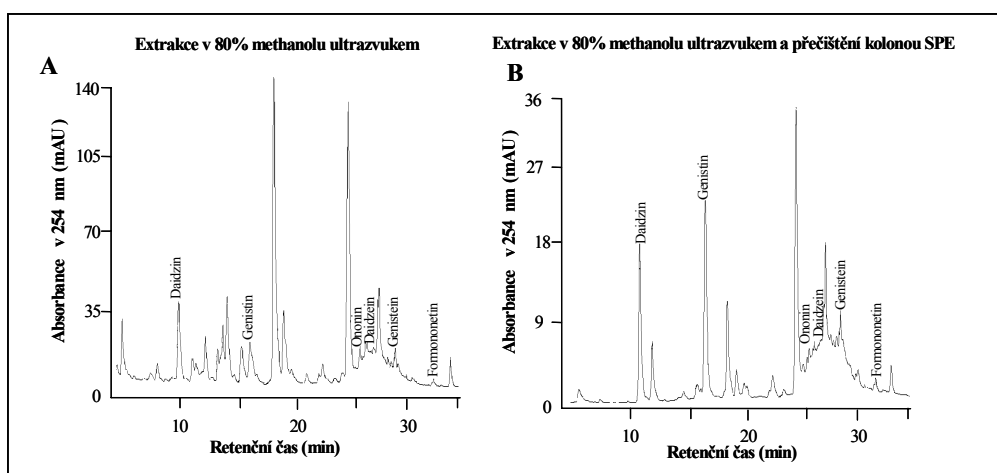
V naší práci jsme pro charakterizaci sedmi isoflavonů v různých částech rostliny sóji použili vysoko-účinné kapalinové chromatografie (HPLC) s detekcí diodovým polem (DAD detektor). Rostlinné isoflavony byly separovány na chromatografické koloně reversní-fáze Zorbax C18-AAA (150 mm x 4,6 mm, velikostí částic 3,5 μm , Agilent Technologies USA) pomocí gradientové eluce (průběh gradientu je uveden na insetu obr. 3). Vlastní podmínky separace isoflavonů v biologické matrici byly optimalizovány v našich dřívějších pracích [6,11-13,17]. Abychom mohli identifikovat jednotlivé isoflavony, bylo nezbytné získat jejich chromatografické spektrum. Na kolonu jsme nanесли 20 μl sedmi isoflavonových standardů (daidzin, genistin, ononin, daidzein, genistein, formononetin, biochanin A) při koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Na obr. 3 je ukázán typický HPLC-UV chromatogram při třech vlnových délkách (254 nm, 280 nm a 320 nm). Nejlepší odezvy na detektoru byly pozorovány při vlnové délce 254 nm, ta také byla dále používána při další práci. Odezvy jednotlivých separovaných isoflavonů na DAD detektoru jsme pozorovali v retenčních časech: daidzin RT:9,67; genistin RT:15,40; ononin RT:23,78; daidzein RT:24,61; genistein RT:26,86; formononetin RT:28,25 a biochanin A RT:30,77.

Obr. 3: HPLC-UV chromatogramy isoflavonového standardu (10 µg/mL) při 254, 280 a 320 nm; na insetu změna složení mobilní fáze chromatografie isoflavonů. HPLC/UV parametry: průtoková rychlost 0,8 ml min⁻¹; kolona Zorbax AAA (150 mm x 4,6 mm, 3,5 µm velikost částic, Agilent Technologies USA); teplota na koloně 40 °C; mobilní fáze 0,3% kyselina mravenčí (v/v) a acetonitril



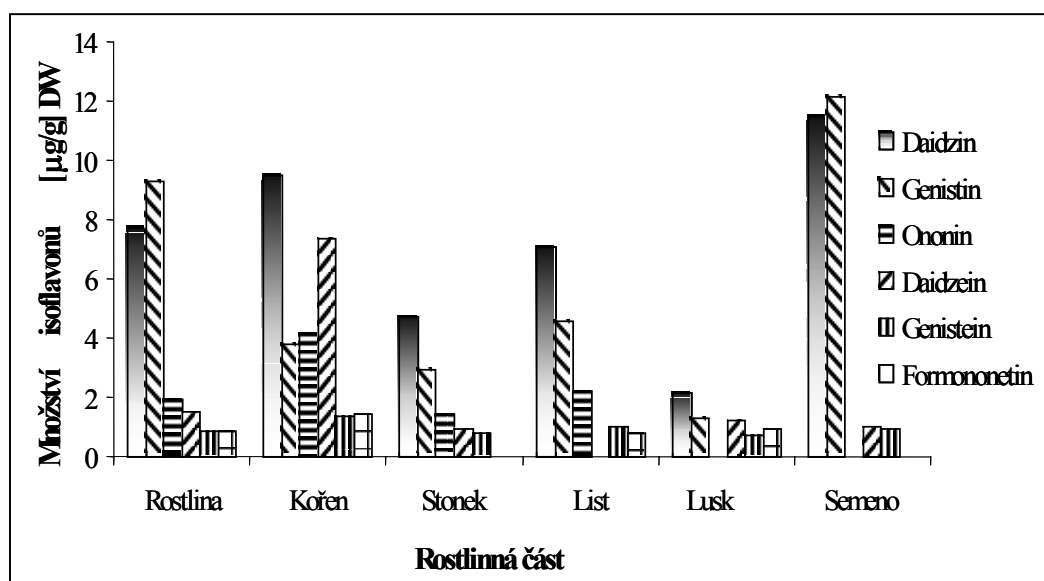
Abychom získali extrakty s isoflavony, museli jsme jednotlivé části rostliny sóje nejdříve pečlivě homogenizovat. Získaný jemný prášek byl převeden do 80% vodného roztoku methanolu a extrahován ultrazvukem. Ultrazvukové vlny o frekvenci 38 kHz a výkonu 150 W rozrušují rostlinná pletiva a buněčnou stěnu a tak usnadňují přechod isoflavonů i dalších nežádoucích sekundárních metabolitů do rozpouštědla. Použijeme-li takto získaný extrakt přímo k chromatografické analýze můžeme pozorovat řadu interferujících sloučenin ovlivňujících naše stanovení (Obr. 4A). Nežádoucí interferující látky můžeme odstranit použitím před-přípravy vzorku na kolonách SPE (solid phase extraciton). Celá operace je řízena počítačem a po předchozí ekvilibraci kolony je na ní nanesen vzorek. V dalším kroku je kolona promyta 5% methanolem okyseleným 2% kyselinou octovou. 20% methanolem s 2% hydroxidem amonným jsou vymyty flavony navázané na koloně. Isoflavony jsou z kolony eluovány pomocí 60, 80 a 100% methanolu s 2% hydroxidem amonným. Při takto připraveném vzorku jsme získali velmi dobré a reprodukovatelné odezvy isoflavonů na DAD detektoru po proběhlé HPLC (Obr. 4B).

Obr. 4: HPLC-UV chromatogramy methanolových extraktů připravených pomocí ultrazvuku v 30 % methanolu (v/v), 30 min., 38 kHz, 150 W; (A) pouze ultrazvuk, (B) ultrazvuk a přečištění na SPE kokonež (1 – 5% methanolem okyseleným 2% kyselinou octovou, 2 – 20% methanolem s 2% hydroxidem amonným, 3 – 60, 80 a 100% methanolu s 2% hydroxidem amonným). Ostatní podrobnosti jsou uvedeny na Obr. 3.



Rostlinné části kořen, stonek, listy, lusk a semena, případně celá rostlina byly připraveny podle výše uvedeného postupu. Zjistili jsme, že nejvyšší koncentrace isoflavonů byly v kořenech a plodech sóji. Je zajímavé, že v kořenech byly navíc přítomny všechny studované isoflavony v poměrně vysoké koncentraci (Obr.5). Je známo, že bakterie rodu *Rhizobium* stimuluje rostlinu k tvorbě těchto sekundárních metabolitů [14]. Je pravděpodobné, že tato zvýšená koncentrace isoflavonů umožňuje rostlině kontrolovat růst těchto mikroorganismů. Obecně platí, že ve všech studovaných částech rostliny je nejvyšší koncentrace daidzinu a genistinu, sloučenin s cukerným zbytkem, umožňujícím pravděpodobně interakci s rostlinnou buněčnou stěnou. V ostatních částech jako jsou listy, stonek a lusk je koncentrace isoflavonů v průměru o 40 – 80 % nižší (Obr.5). Množství isoflavonů v sojových bobech bylo velmi vysoké, především glykosilovaného daidzinu a genistinu. Ononin a formononetin nebyl v těchto částech detekován vůbec. Je známo, že v sójových bobech se vyskytují nejčastěji isoflavony daidzein, glycitein a genistein a jejich 7-β-D-glukosidy: daidzin, glycitin a genistin [12]. Tyto vysoké koncentrace mohou také pravděpodobně souviset s ochranou semene před napadením bakteriemi a plísněmi. Množství jednotlivých isoflavonů v různých částech rostliny je uveden v tabulce 1.

Obr. 5: Množství isoflavonů v různých částech rostliny sóji (*Glycine max*). Ostatní podrobnosti jsou uvedeny na Obr. 4.



ZÁVĚR

Sója je v současné době velmi perspektivní plodinou pro výživu lidí a zvířat. Množství isoflavonů v produktech ze sóji je velice variabilní, a pravděpodobně velmi záleží nejen na odrůdě, ale také na povětrnostních podmínkách během vegetace, napadení patogeny a škůdci. Zkoumaná odrůda byla speciálně vyšlechtěná pro naše podmínky. Zjistili jsme, že koncentrace isoflavonů v různých částech rostliny sóji odrůdy Rita (*Glycine max*) značně kolísá. Nejvyšší koncentrace isoflavonů byly pozorovány v sójových bobech a kořenech v ostatních částech rostliny jsou koncentrace velmi nízké. Získané poznatky jsou velmi důležité pro pochopení přesunu isoflavonů do potravinového řetězce.

PODĚKOVÁNÍ

Práce na této publikaci byla financována z dlouhodobého záměru Agronomické fakulty MZLU č. 4321 00001, FRVŠ 1203/2003 a Národního výzkumného centra LN00A081.

Tab. 1:

Isoflavony	Zastoupení isoflavonů v µg/g					
	Rostlina	Kořen	Stonek	List	Tobolka	Semeno
Daidzin	7,71	9,53	4,75	7,05	2,12	11,52
Genistin	9,29	3,79	2,94	4,57	1,28	12,18
Ononin	1,96	4,14	1,43	2,22	-	-
Daidzein	1,47	7,38	0,91	-	1,18	0,98
Genistein	0,88	1,34	0,80	1,01	0,74	0,89
Formononetin	0,83	1,46	-	0,80	0,89	-

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] R.N. Baines, in *Environmental & Animal Safety Dimensions to Developing Food Safety & Quality Assurance Initiatives in the United Kingdom*, Michigan State University, Michigan, 1999, p. 45.
- [2] Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, 2003, p. <http://apps.fao.org/default.htm>.
- [3] T. Mezlík, *Úroda* 50 (2002) 9.
- [4] J. Dostálová, *Úroda* 50 (2002) 11.
- [5] J. Velišek, *Chemie potravin* 3, OSSIS, Tábor, 1999.
- [6] B. Klejdus, D. Štěrbová, P. Stratil, V. Kuban, *Chem. Listy* 97 (2003) 530.
- [7] H. Adlercreutz, R. Heikkinen, M. Woods, T. Fotsis, J.T. Dwyer, B.R. Goldin, *Lancet* 2 (1982) 1295.
- [8] H. Adlercreutz, W. Mazur, *Ann. Med.* 29 (1997) 95.
- [9] S.R. Davis, F.S. Dalais, E.R. Simpson, A.L. Murkies, *Recent Prog. Horm. Res.* 54 (1999) 185.
- [10] T. Fotsis, Y.M. Zhang, M.S. Pepper, H. Adlercreutz, R. Montesano, P.P. Nawroth, L. Schweigerer, *Nature* 368 (1994) 237.
- [11] B. Klejdus, D. Vitamvasova-Sterbova, V. Kuban, *Anal. Chim. Acta* 450 (2001) 81.
- [12] B. Klejdus, D. Sterbova, P. Stratil, V. Kuban, *Chem. Listy* 97 (2003) 530.
- [13] B. Klejdus, R. Kizek, J. Vacek, J. Zehnálek, L. Trnková, V. Kubáň, *J. Chromatogr. B* submitted (2003).
- [14] R. Van Rhijn, J. Vanderleyden, *Microbiol. Rev.* 59 (1995) 124.
- [15] I. Lerouge, J. Vanderleyden, *FEMS Microbiol Rev* 26 (2002) 17.
- [16] M. Lambrecht, Y. Okon, A. Vande Broek, J. Vanderleyden, *Trends Microbiol* 8 (2000) 298.
- [17] B. Klejdus, D. Vitamvasova-Sterbova, V. Kuban, *J. Chromatogr. A* 839 (1999) 261.