

# OZNACZANIE WYBRANYCH IZOFLAWONÓW W SUPLEMENTACH DIETY



Kamila Fic,

Promotor: dr hab. Magdalena Biesaga

Pracownia Chromatografii i Analityki Środowiska

## WSTĘP

**Izoflawony** należą do rodziny związków polifenolowych i są to związki o działaniu estrogennym (fitoestrogeny). Dzięki tej właściwości suplementy diety zawierające izoflawony są stosowane jako terapia dla kobiet przeciwko negatywnym skutkom menopauzy. Izoflawony stanowią wtórne metabolity roślin, występują w dużych ilościach w roślinach należących do rodziny bobowatych np. w soi, w ciecierzycy, soczewicy, fasoli czy czerwonej koniczynie.

**Celem pracy** było opracowanie metody ekstrakcji oraz chromatograficznego oznaczenia czterech najpowszechniej występujących izoflawonów: daidzeiny, glicyteiny, genisteiny i biochaniny A. Koniczyna i soja są naturalnymi źródłami izoflawonów i te rośliny zostały użyte do procesu optymalizacji ekstrakcji. Opracowana metoda zostanie wykorzystana do oznaczania izoflawonów w wybranych suplementach diety dostępnych na polskim rynku.

## PIERWSZE WNIOSKI

- pH eluentu nie ma wpływu na retencję związków
- Wraz ze wzrostem zawartości procentowej ACN / metanolu maleje wartość czasu retencji dla wszystkich związków
- W przypadku użycia metanolu jako eluentu czasy retencji są dużo dłuższe niż przy użyciu ACN
- Dobór warunków ekstrakcji musi uwzględniać rodzaj analitu i matrycę – za najbardziej optymalne warunki uznano 60 % roztwór metanolu
- W soi nie stwierdzono obecności biochaniny A, a z kolei w czerwonej koniczynie glicyteiny.

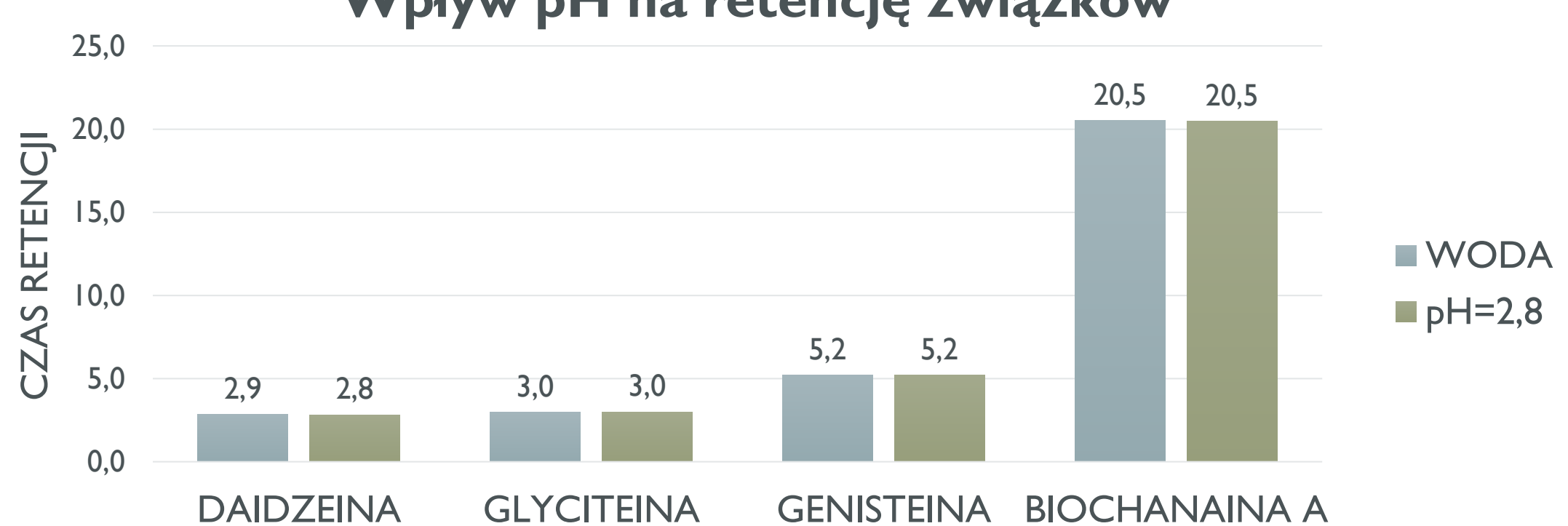
## PRZYGOTOWANIE PRÓBEK



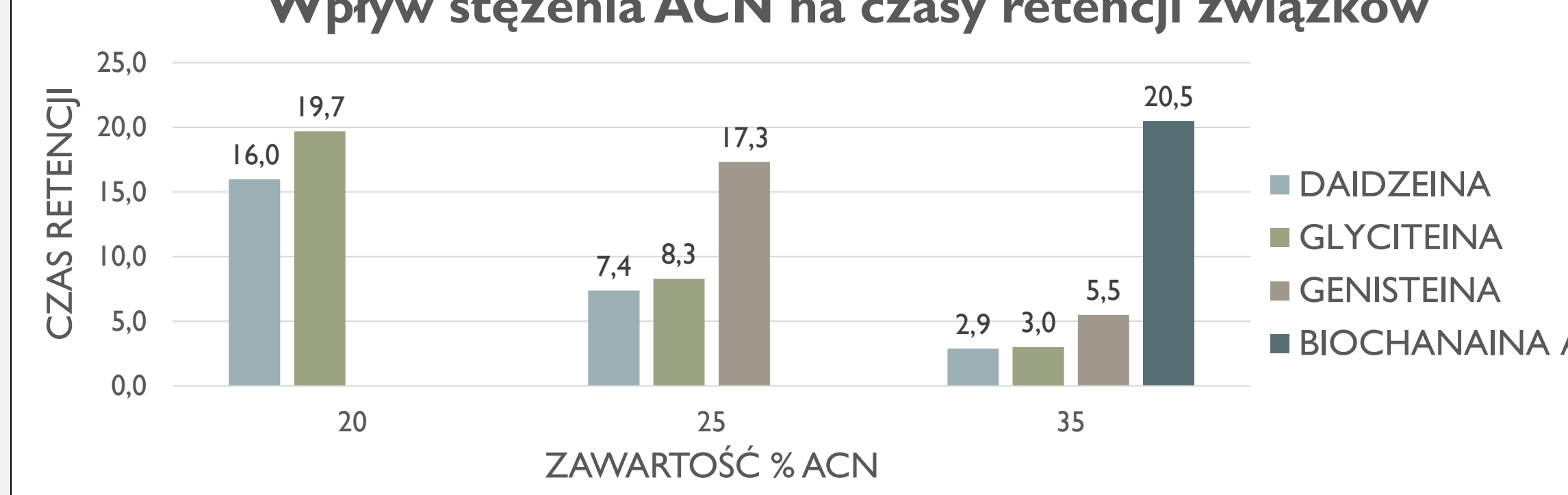
## WYNIKI

Podczas optymalizacji analizy chromatograficznej porównano wpływ składu eluentu (pH, stężenia metanolu i acetonitrylu) na retencję analitów. Sprawdzono również wpływ rodzaju fazy stacjonarnej C-8 oraz C-18. Na podstawie przeprowadzonych badań najbardziej optymalne rozdzielanie związków uzyskano przy użyciu kolumny Luna C18(2) o wymiarach 100 x 2.0 mm, 3µm oraz elucji gradientowej w układzie LC-MS/MS. Eluentem była mieszanina acetonitrylu i wody.

Wpływ pH na retencję związków



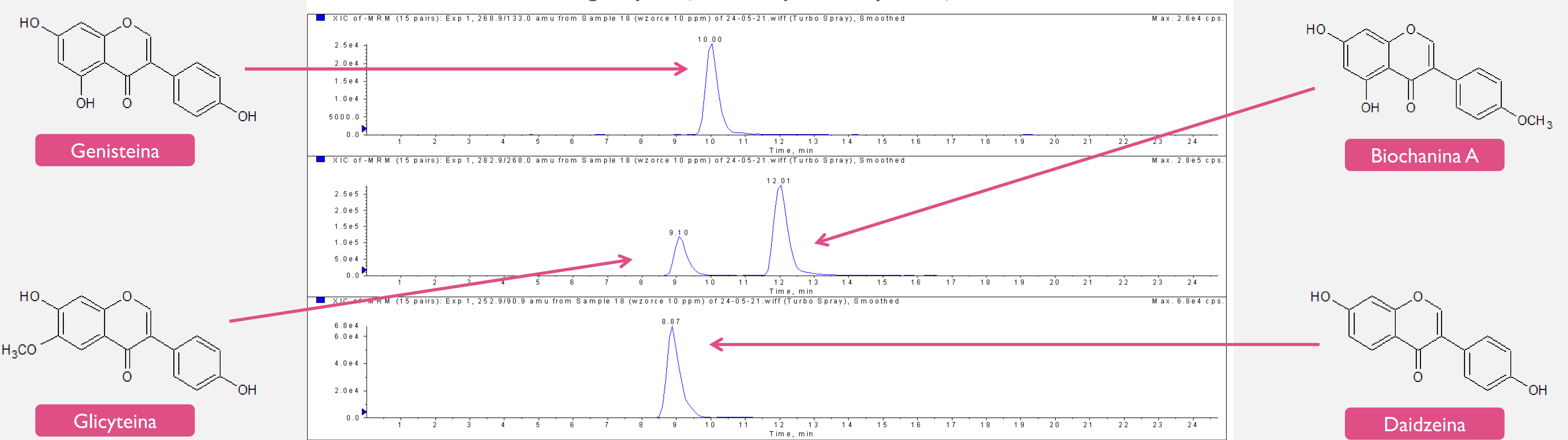
Wpływ stężenia ACN na czasy retencji związków



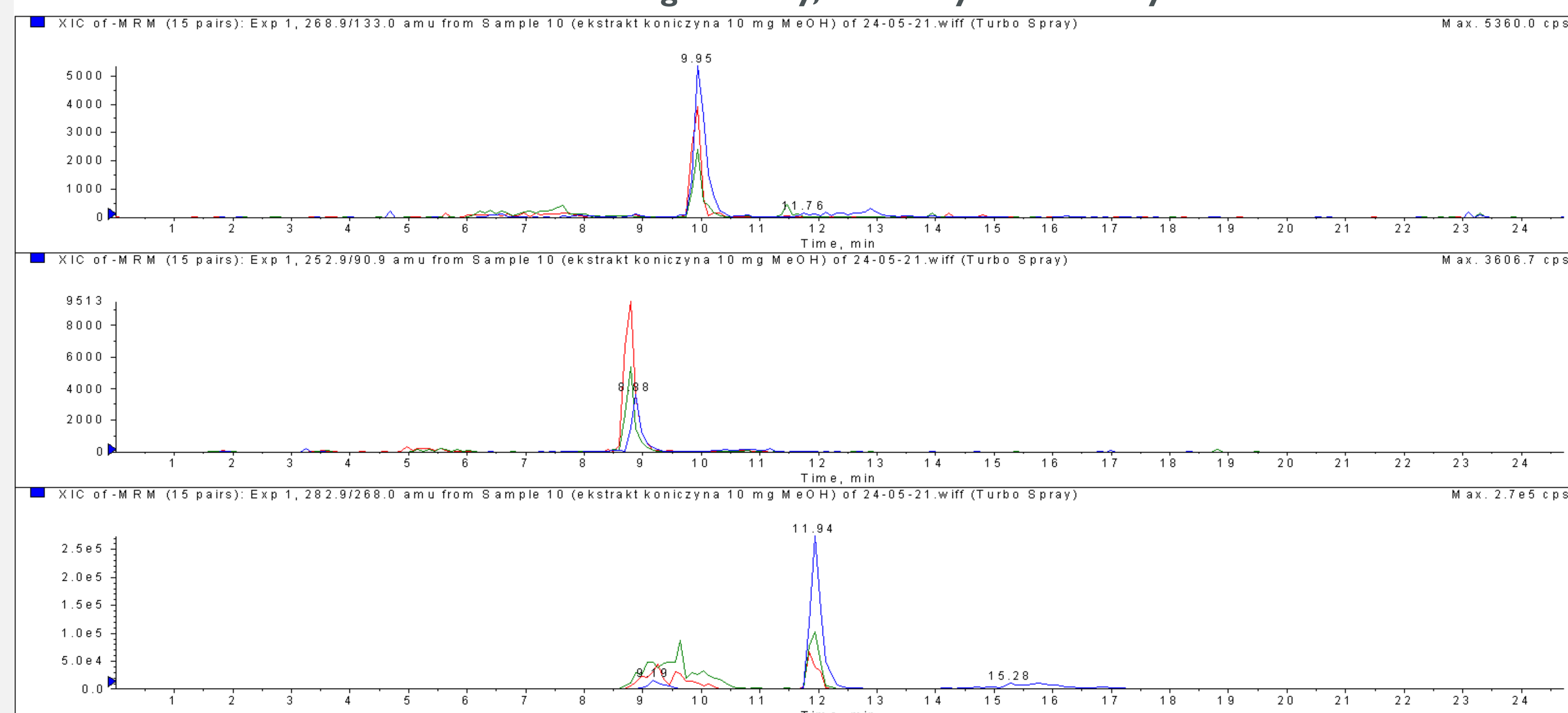
Wartość rozdzielczości pomiędzy Daidzeiną i Glicyteiną – elucja izokratyczna

	20% ACN	25% ACN	35% ACN
C18	3,74	2,11	0,71
C8	2,16	1,99	0,1

Chromatogramy związków otrzymane za pomocą LC-MS/MS



Wpływ zawartości % metanolu w roztworach do ekstrakcji izoflawonów z koniczyny czerwonej - widma mas dla genisteiny, daidzeiny i biochaniny A.



Podczas optymalizacji ekstrakcji izoflawonów z materiału roślinnego zostały opracowane takie parametry jak skład ekstrahenta, czas oraz temperatura prowadzenia ekstrakcji. Widać, że w zależności od oznaczanego izoflawonu roztwór metanolu do ekstrakcji powinien mieć inną zawartość procentową.

Na chromatogramach dla koniczyny czerwonej obserwujemy tylko 3 z 4 oznaczanych izoflawonów i są to - genisteina, daidzeina i biochanina A. Dla soi sytuacja jest podobna, jesteśmy w stanie oznaczyć tylko genisteinę, daidzeinę i glicyteinę.

- 50% roztwór metanolu
- 60% roztwór metanolu
- 75% roztwór metanolu