

Příloha 1. Návod pro laboratorní úlohu

VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE
ÚSTAV CHEMIE A ANALÝZY POTRAVIN

Technická 5, 166 28 Praha 6

tel./fax.: + 420 224 353 185; jana.hajslova@vscht.cz



**Analýza fytoestrogenů daidzeinu a genisteinu v sóji,
sójových potravinách a krmivech
technikou HPLC-DAD**

Analýza fytoestrogenů daidzeinu a genisteinu v sóji, sójových potravinách a krmivech technikou HPLC-DAD

1. Vymezení oboru metody

Cílem této úlohy je seznámit studenty s aplikací techniky HPLC-DAD při kontrole hladin fytoestrogenů daidzeinu a genisteinu v sójových bobech, sójovém extrudátu, sójové mouce, sójových klíčcích, krmivu s přídavkem sóji atd. Danou metodou lze stanovit i celkový obsah daidzeinu a genisteinu po kyselé hydrolyze přítomných glykosidů (daidzin, genistin a jejich malonyl popř. acetyl estery).

Vedoucí úlohy nejprve shrne základní informace o aplikačním potenciálu techniky HPLC-DAD a poté bude demonstrovat funkci instrumentu. Studenti pak pod dohledem pedagoga provedou vlastní analýzu. Podle požadovaného rozsahu úlohy vyučující rozhodne, jestli budou studenti analyzovat již připravený a přečištěný extrakt nebo budou v rámci laboratorní práce připravovat extrakt (případně hydrolyzát), který budou před vlastním stanovením ještě přečišťovat. Diskutována bude interpretace získaných záznamů a odhad pracovních charakteristik postupu. Zjištěné hladiny fytoestrogenů budou diskutovány s údaji v literatuře.

2. Princip metody

Stanovení volných aglykonů a glykosidů vedle sebe

Analyty se extrahují z matrice 80%ním methanolem. Hrubý extrakt se přečistí metodou SPE. Vlastní stanovení se provede pomocí HPLC-DAD.

Stanovení celkového obsahu daidzeinu a genisteinu ve vzorku

Glykosidy daidzeinu a genisteinu se zhydrolyzují pomocí kyselé hydrolyzy (HCl) za tepla. Získaný hydrolyzát se přečistí pomocí SPE a vlastní stanovení se provede pomocí HPLC-DAD

3. Chemikálie a laboratorní pomůcky

Chemikálie, spotřební materiál, standardy

- methanol (LichroSolv for HPLC gradient grade, Merck, Německo)
- ethanol konzumní, velemný
- deionizovaná voda (přečištěná z destilované vody pomocí zařízení Milli-Q, Millipore, Německo)
- chlorovodíková kyselina (p.a., Penta, Česká Republika)
- octová kyselina (glacial, 99,99+%, Aldrich, Německo)
- SPE kolonky Oasis HLB 60 mg (Waters)
- Filtrační papíry, Filtrak (modrý 390, VEB Freiburger)

Certifikované standardy : daidzein, genistein - čistota $\geq 98\%$, Sigma,

Sloučenina	Název	CAS number	M _r
Daidzein (DAI)	4',7-Dihydroxyisoflavon	486-66-8	254,2
Genistein (GEN)	4',5,7-Trihydroxyisoflavon	446-72-0	270,2

Příprava zásobních roztoků standardů

Zásobní roztoky jednotlivých standardů byly připraveny rozpuštěním 7,9 mg daidzeinu a 11,4 mg genisteinu v 10 ml methanolu. Zásobní standardní roztoky standardů jsou získány

rozpuštěním pevného standardu v methanolu. Takto připravený zásobní standardní roztok uložen v mrazničce při -18°C . Doba použitelnosti 1 rok.

Pracovní roztoky standardů, ze kterých jsou pak ředěny jednotlivé koncentrace kalibrační křivky, jsou připravovány ze zásobního standardu ředěním v mobilní fázi. Pracovní standardy jsou uchovávány v chladničce při $+5^{\circ}\text{C}$ a používají se max. 4 měsíce.

Pro ředění jsou používány mikrostříkačky Hamilton (objem 100, 250, 500 a 1000 μl). Při ředění standardních roztoků se používá odměrné kalibrované sklo (ČSN A, třídy K10).

Tyto zásobní standardy byly uchovávány v temnu při teplotě -18°C .

Přístroje a zařízení

- Laboratorní homogenizátor 38BL40, Dynamics Corporation of America
- Ultrazvuková lázeň
- Topné hnízdo, LTHS 100, Brněnská Drutěva v.d.
- Rotační vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114 s vodní lázní B-480, (Švýcarsko)
- Automatická SPE: Aspec XL, Gilson, Francie
- Kapalinový chromatograf HP 1200 (Hewlett-Packard, USA) s DAD a FLD detektorem

Analytická kolona a předkolona pro kapalinovou chromatografii: Discovery® C18, 15 cm x 3 mm x 5 μm ; Guard column C18, 2 cm x 0,4 mm x 5 μm ; Supelco, Německo

4. Popis jednotlivých kroků experimentu

Příprava vzorku

Vzorky jsou před analýzou skladovány v temnu při laboratorní teplotě. Vzorky bobů a krmiv jsou homogenizovány pomocí laboratorního homogenizátoru. Sójová mouka není dále upravována.

A) Stanovení obsahu volného daidzeinu, genisteinu a kumestrolu

Asi 1 g homogenizovaného vzorku je extrahován 3x20 ml směsi methanol:voda (80:20, v/v) 3x20 minut na ultrazvukové lázni. Jednotlivé extrakty se filtrují (filtr 390) a filtrační koláč se promyje extrakční směsí (cca 10 ml). Spojené filtráty se doplní nebo zahustí na vakuové rotační odparce na známý objem.

Přečištění extraktu

Odebraný alikvotní podíl extraktu se přečistí metodou SPE. Kolonky (Oasis HLB) se kondicionují 5 ml methanolu a 5 ml vody. Methanolický extrakt se ředí vodou v poměru 1 ml extraktu: 3 ml vody. Na kolonku se nanese potřebné množství zředěného extraktu (4 - 12 ml). Dále se vymyjí nečistoty 5 ml 10% vodného roztoku methanolu. Analyty se eluují 8 ml methanolu. Eluát se odpaří do sucha na vakuové rotační odparce a odparek se rozpustí v mobilní fázi.

B) Stanovení obsahu celkového daidzeinu, genisteinu a kumestrolu

Asi 1 g homogenizovaného vzorku byl hydrolyzován kyselinou chlorovodíkovou (10 ml 6mol/l) se 40 ml 96% ethanolu v jednom podílu. Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě varu ethanolu po dobu 4 hodin. Po ukončení hydrolyzy spolu s extrakcí byla směs doplněna na známý objem.

Přečištění extraktu

Extrakt se po hydrolyze přečistí metodou SPE stejným způsobem jako extrakt pro stanovení volného daidzeinu a genisteinu.

Pokud je vzorek po SPE rozpuštěný v mobilní fázi zakalený, odstředí se na rotační bubnové odstředivce (1 ml, 3 min, 4000 ot/min) a čistý supernatant se odebere pro HPLC analýzu.

HPLC-DAD analýza

Parametry separace (HP 1200)

Analytická kolona: Discovery® C18, 15 cm × 3 mm × 5 µm, SUPELCO

Předkolonka: Discovery® Guard column C18 2 cm × 0,4 mm × 5 µm, SUPELCO

Mobilní fáze: methanol : 0,1% octová kyselina (vodný roztok, v/v), gradient (0 min. 30 % methanol - 16 min. 75 % methanol - 16,1 min. 100% methanol – 18 min. 100 % methanol; 4 min. post run)

Teplota kolony: 45°C

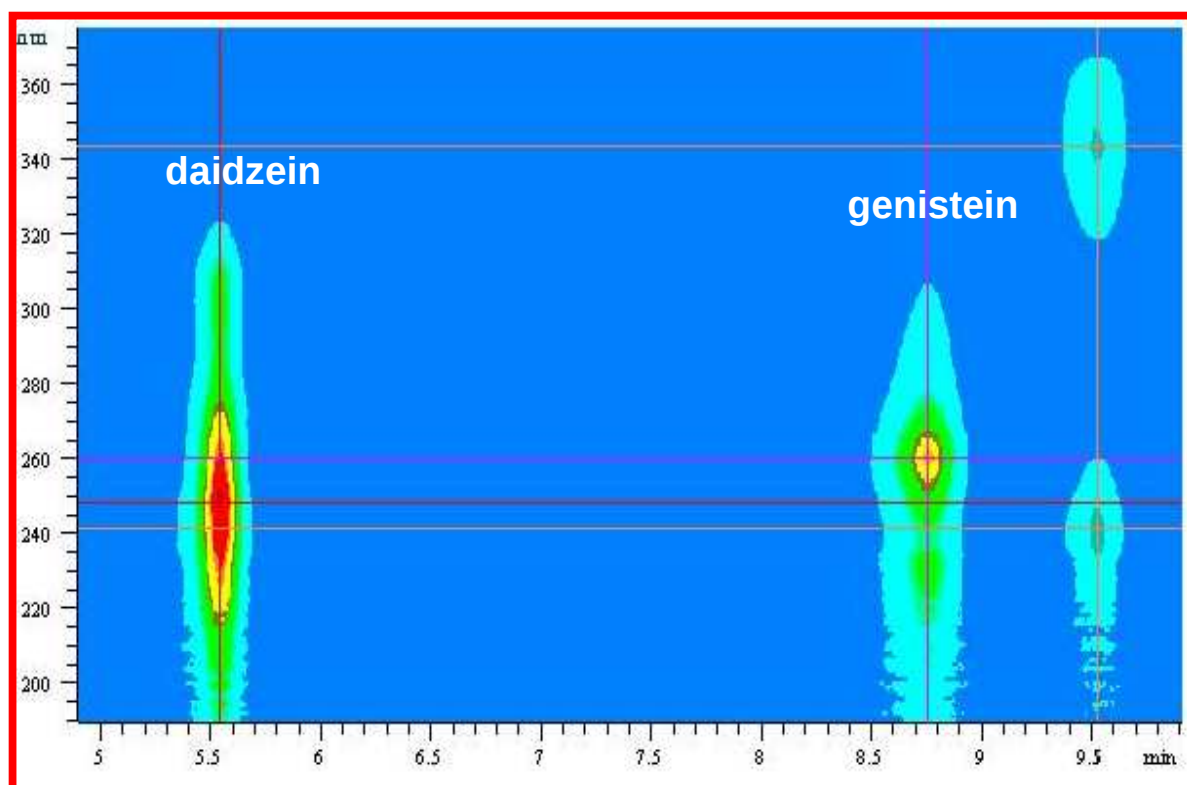
Nástřik vzorku: 20 µl

Objemový průtok: 0,7 ml/min

Nastavení DAD detektoru

Vlnová délka pro měření: 260 nm, referenční vlnová délka 360 nm

Pro analytické stanovení je používána vlnová délka odpovídající absorpčnímu maximu sledovaných analytů: Výhodou DAD detektoru je možnost zjištění těchto absorpčních maxim a tím i možnost stanovení cílových analytů při největší citlivost detekce (viz obr. 1). UV spektra jako mohou sloužit jako další možnost identifikace sledovaných látek (kromě retenčních časů), softwarová funkce peak purity je vhodná ke zjištění případných koelucí ze vzorku.



Obrázek 1 UV spektrum daidzeinu a genisteinu

5. Vyhodnocení naměřených dat

Pro vyhodnocení nálezů v reálných vzorcích je nutno připravit směsný rozpouštědlový standard daidzeinu a genisteinu v mobilní fázi.

Ke kvantifikaci se použije model kalibrační křivky.

Součástí protokolu vypracovaného v souladu s interními předpisy Ústavu chemie a analýzy potravin budou i popsané chromatogramy.

6. Stanovení pracovních charakteristik (výsledky validace)

Výtěžnost

V současné době není komerčně dostupný vhodný certifikovaný referenční materiál pro dané matrice a analyty. Výtěžnost metody byla ověřena opakovanou analýzou uměle kontaminovaných vzorků, výtěžnost čistícího kroku je pravidelně ověřena použitím roztoku standardu, který je pak analyzován v dané sekvenci spolu s reálnými vzorky.

Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla stanovena jako relativní směrodatná odchylka (RSD, %) získaná opakovanými analýzami vzorku ($n = 6$). Ke stanovení RSD byly použity matrice uměle kontaminované standardy cílových analytů na hladině 50-250 $\mu\text{g/l}$.

Rozsah metody a linearita

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

Linearita je ověřena v rozsahu koncentrací měřených standardů (20 ng/ml – 5000 ng/ml) pomocí regresního koeficientu R^2 (0,9999).

Mez detekce:

Mez detekce (LOD) byla stanovena jako nejmenší množství analytu ve vzorku, které lze ještě spolehlivě detekovat s přihlédnutím k šumu v okolí eluční zóny (píku) analytu. LOD zde byla stanovena jako poměr signálu a šumu 3/1

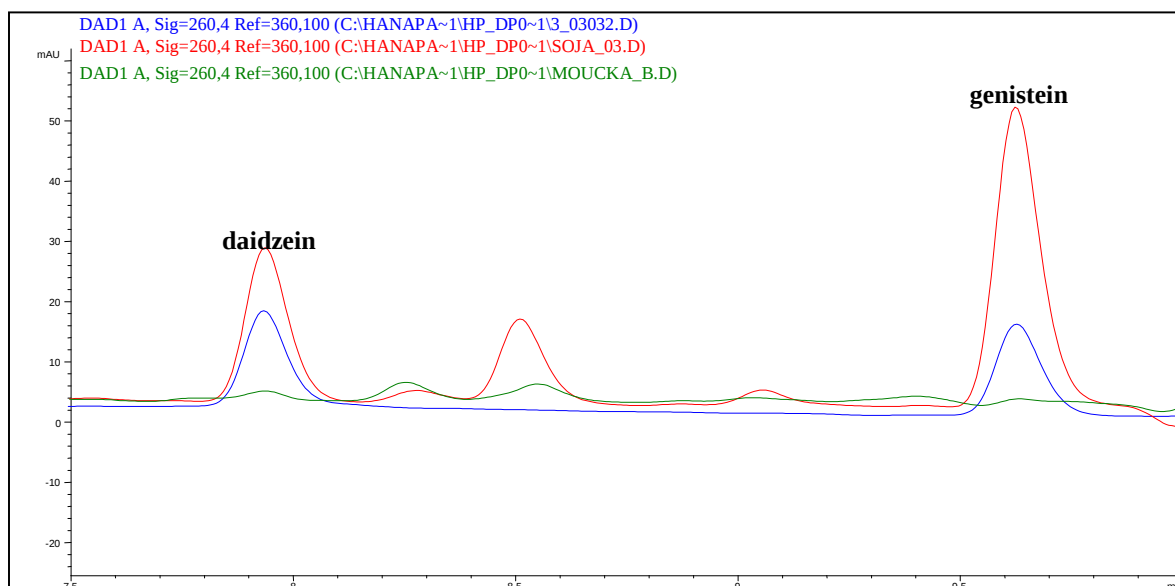
Pracovní charakteristika Analyt	Výtěžnost %	Opakovatelnost (RSD) %	LOD mg/kg
Daidzein	90,1	4,1	3,5
Genistein	84,5	4,9	2,8

Příklad analýzy reálných vzorků

Analýza krmiva: byly analyzovány dva druhy krmiva – sója a rybí moučka. Na obr. 2 je uveden chromatogram vzorků krmiva a analytických standardů.

V rybí moučce byly nálezy analytů pod detekčním limitem, v krmivu s přídavkem sóji bylo nalezeno 107,8 mg/kg daidzeinu a 174,6 mg/kg genisteinu. Poměr obsahu genisteinu a daidzeinu ve vzorku krmiva se sójou je cca 1,6. Ten odpovídá běžnému poměru nálezů těchto analytů v sóji, který se pohybuje v intervalu 1,5 – 1,7.

Dle údajů v literatuře se hladiny analytů daidzeinu a genisteinu pohybují podle odrůdy sóji v rozmezí 100 – 560 mg/kg pro daidzein a 150 – 840 mg/kg pro genistein.



Obrázek 2 Ukázka chromatogramu vzorku krmiva:

a) modře – standard (daidzein c = 790 ng/ml, genistein c = 570 ng/ml), b) červeně - vzorek sóji
c) zeleně – vzorek rybí moučky