

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



HPLC ANALÝZA VYBRANÝCH ISOFLAVONŮ

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Vladimír Kubíček CSc.

Hradec Králové 2020

Lidmila Nováková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 3.9.2020

.....

Lidmila Nováková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu Ing. Vladimíru Kubíčkoví CSc. za poskytnutí cenných rad, za pomoc a čas věnovaný v průběhu zpracovávání této diplomové práce. Děkuji za trpělivost a vřelý přístup.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Autor: Lidmila Nováková

Školitel: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Název diplomové práce: HPLC analýza vybraných isoflavonů

Diplomová práce se zabývá vývojem metody stanovení koncentrace vybraných isoflavonů ve vzorcích biologického materiálu pomocí HPLC. Metoda je použitelná pro glykosylované (daidzin, genistin a glycitin) i volné formy isoflavonů (daidzein, genistein).

K analýze byla použita kolona Ascentis® Express RP 2,7 μm , 10 cm x 3 mm. Mobilní fáze byla složena z roztoku kyseliny mravenčí a acetonitrilu a měření probíhalo v režimu gradientové eluce. Konstantní průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. Kolona byla termostatována na 30 °C. Bylo nastříkováno 10 μl vzorku. UV detekce byla prováděna při 249 nm a 260 nm.

Dále bylo analyzováno 6 vzorků biologického materiálu obsahujících isoflavony. V těchto vzorcích byly úspěšně stanoveny koncentrace jednotlivých isoflavonů na základě předem provedené kalibrace.

Klíčová slova: HPLC, daidzin, genistin, glycitin, analýza

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Author: Lidmila Nováková

Supervisor: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Title of thesis: HPLC analysis of selected isoflavones

The diploma thesis deals with the development of a method for determination of the concentration of selected isoflavones in samples of biological material by using HPLC. The method is applicable to both glycosylated (daidzeine, genistine and glycitine) and free forms of isoflavones (daidzeine, genisteine).

The Ascentis® Express RP column 2,7 µm, 10 cm x 3 mm was used for analysis. The mobile phase was composed of a solution of formic acid and acetonitrile and the measurement was performed in a gradient elution mode. The constant flow rate of the mobile phase was set at 0.5 ml / min. The column was thermostated at 30 ° C. The sample injection volume was 10 µl. UV detection was performed at 249 nm and 260 nm.

Six samples of biological material containing isoflavones were analyzed consequently. Based on the calibration previously carried out, concentrations of the isoflavones were determined in the biological samples.

Key words: HPLC, daidzine, genistine, glycitine, analysis

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Chromatografické metody	9
2.1.1 Historie chromatografie.....	9
2.1.2 Rozdělení chromatografických metod.....	9
2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	11
2.2.1 Zásobník mobilní fáze.....	11
2.2.2 Odplyňovač	11
2.2.3 Vysokotlaké čerpadlo.....	11
2.2.4 Dávkořovač vzorků.....	12
2.2.5 Směřovací zařízení	12
2.2.6 Chromatografická kolona.....	13
2.2.7 Termostat kolony	13
2.2.8 Detektory	13
2.2.9 Počítač	15
2.2.10 Stacionární fáze.....	15
2.3 Validace metody	17
2.4 Fytoestrogeny	18
2.4.1 Isoflavony	18
2.4.2 Účinky isoflavonů.....	19
2.4.3 Farmakokinetika isoflavonů.....	20
2.4.4 Popis vybraných isoflavonů	21
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Použitý materiál	24
3.1.1 Chemikálie.....	24
3.1.2 Standardy	24
3.1.3 Pomůcky a přístroje.....	24
3.1.4 HPLC systém.....	24
3.1.5 Kolona	25
3.2 Příprava pracovních roztoků.....	25

3.2.1 Příprava roztoku kyseliny mravenčí	25
3.2.2 Příprava zásobních roztoků standardů.....	25
3.2.3 Příprava měřených roztoků standardů	26
3.2.4 Příprava roztoků na měření kalibračních křivek	26
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	27
4.1 Roztoky standardů.....	27
4.1.1 Mobilní fáze voda/acetonitril.....	27
4.1.2 Mobilní fáze kyselina mravenčí/acetonitril.....	28
4.2 Kalibrace	32
4.2.1 Genistin	32
4.2.2 Genistein.....	34
4.2.3 Daidzin.....	35
4.2.4 Daidzein.....	37
4.2.5 Glycitin	38
4.3 Vzorke biologického materiálu.....	40
4.3.1 Vzorek č. 1.....	40
4.3.2 Vzorek č. 2.....	41
4.3.3 Vzorek č. 3.....	43
4.3.4 Vzorek č. 4.....	44
4.3.5 Vzorek č. 5.....	45
4.3.6 Vzorek č. 6.....	46
5. ZÁVĚR	50
6. SEZNAM TABULEK	51
7. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	52
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	54

1. ÚVOD

Isoflavony jsou přírodní látky, které se vyskytují v rostlinách buď ve formě glykosidů, nebo ve formě volných aglykonů. V jejich molekulách se nacházejí dvě fenolické skupiny, díky kterým se isoflavony podobají struktuře molekuly 17β -estradiolu. To jim umožňuje vázat se na estrogenní receptory, především na beta-estradiolové receptory, ke kterým mají větší afinitu. Beta-estradiolové receptory se vyskytují například v kostech nebo v epitelu krevních kapilár, čímž se vysvětluje pozitivní vliv isoflavonů na prevenci kardiovaskulárních onemocnění a osteoporózy. Ovlivňují také řadu menopauzálních symptomů – návaly horka, výkyvy nálad, únavu či poruchy spánku. Kromě estrogenních účinků vykazují isoflavony i účinky antioxidační a protizánětlivé.

Cílem této diplomové práce bylo provést základní pokusy pro vývoj metody stanovení koncentrace vybraných isoflavonů ve vzorcích biologického materiálu pomocí HPLC. Předmětem stanovení byly glykosylované formy (daidzin, genistin a glycitin) i volné formy (daidzein, genistein) isoflavonů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody umožňují analýzu směsí (kvalitativní i kvantitativní) a v analýze léčiv jsou proto široce využívány. Jedná se o metody separační, dochází tedy k oddělování složek vzorku mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi na základě odlišné afinity dělených látek ke stacionární (pevné, nepohyblivé) a mobilní (pohyblivé) fázi. Základním předpokladem pro separaci látek je vzájemná interakce dělených složek s fázemi (mobilní i stacionární), ke kterým dochází v průběhu chromatografického procesu. (1)

2.1.1 Historie chromatografie

Za objevitele chromatografie je uznáván ruský botanik Michail Semjonovič Cvět (1872-1919). K jeho největším zájmům už od studentských let patřila fotosyntéza, zejména chloroplasty. Snažil se najít účinnou metodu pro separaci barviva chlorofylu z chloroplastů, aby jeho vlastnosti v přírodním stavu zůstaly zachovány, a vyvinul novou fyzikálně-chemickou metodu založenou na adsorpčních jevech, s níž dokázal na koloně naplněné uhlíčitánem vápenatým rozdělit pigmenty z chloroplastů a určit je kvalitativně i kvantitativně. Upozorňoval i na důležitost volby vhodných adsorbentů, rozpouštědel a pracovních podmínek (rozměry kolony, tlak atd.)

Cvětova metoda měla spoustu oponentů, což byl jeden z důvodů proč tento objev byl několik let opomíjen. Až koncem 30. let se tato chromatografická metoda stává uznávanou a je stále více využívána. Roku 1948 dostal A. Tiselius Nobelovu cenu za rozvoj metody, za výzkumy elektroforézy a adsorpční chromatografie.

Velkým milníkem v historii chromatografie se stal objev rozdělovací chromatografie Martinem a Syngem, kteří za tento objev, jeho význam a dosah získali roku 1952 Nobelovu cenu. A v následujících letech došlo k velkému rozvoji chromatografie. Zdokonalovala se instrumentace, vznikaly stále účinnější kolony. Martin spolu s Jamesem položili základ plynové chromatografii. Na základě Cvětovy kolonové kapalinové chromatografie vznikla vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Do této doby byla chromatografie stále jen prostředkem bádání. Teprve v 60. letech se začala uplatňovat i v řadě průmyslových odvětví (petrochemický, farmaceutický, potravinářský či kosmetický průmysl). (2)

2.1.2 Rozdělení chromatografických metod

- *podle charakteru mobilní fáze*
 - a) plynová chromatografie – mobilní fází je inertní plyn
 - b) kapalinová chromatografie – mobilní fází je kapalina

- *podle uspořádání stacionární fáze*
 - a) kolonové uspořádání
 - kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v koloně
 - nejčastěji využívaná je HPLC
 - b) plošné uspořádání
 - papírová chromatografie – starší metoda, dnes již překonána, nahrazována tenkovrstvou chromatografií
 - stacionární fáze je součástí chromatografického papíru
 - tenkovrstvá chromatografie – stacionární fáze je nanesená na pevném plochém podkladu (např. skleněné desce nebo hliníkové fólii)
- *podle podstaty separačního procesu* – při separaci se uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů současně, ale jeden z nich převládá
 - a) rozdělovací chromatografie – separace probíhá na základě rozdílných rozpustností složek směsi v mobilní (kapalina nebo plyn) a stacionární fázi (kapalina)
 - v kapalinové chromatografii jsou využívány dvě vzájemně nemísitelné kapaliny, kde kapalná stacionární fáze je ukotvena na vhodném inertním nosiči
 - v plynové chromatografii jsou separované látky unášeny nosným plynem v kapalně stacionární fázi
 - b) adsorpční chromatografie – separace probíhá na základě rozdílných schopností složek směsi se poutat (adsorbovat se) na pevnou stacionární fázi, kterou bývá nejčastěji silikagel nebo oxid hlinitý
 - c) ionově – výměnná chromatografie – pouze v kapalinové chromatografii
 - separace probíhá na základě rozdílných afinit (přitažlivých sil) složek směsi iontového charakteru ke stacionární fázi, která je tvořena iontoměničem s iontovýměnnými skupinami
 - katexy – měniče kationtů
 - anexy – měniče aniontů
 - d) gelová chromatografie – separace probíhá na základě různé velikosti molekul složek směsi – molekulový síťový efekt
 - stacionární fáze je tvořena porézním materiálem – nejčastěji to bývá nabobtnalý dextranový gel

- menší molekuly analytu pronikají do všech pórů stacionární fáze a zadržují se tedy ve stacionární fázi déle než velké molekuly, které pronikají jen do větších pórů a jsou tak vymyty rychleji

e) afinitní chromatografie – její uplatnění v analýze léčiv je omezené

- stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku pouze určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu) (1, 3)

2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf se skládá se těchto částí:

2.2.1 Zásobník mobilní fáze

Zásobník mobilní fáze je důležitý pro udržení kontinuálního provozu HPLC systému. Jedná se o tlustostěnné skleněné nádoby opatřené speciálními filtry zajišťující záchyt suspendovaných tuhých částic před vstupem do HPLC systému. Filtry jsou vyrobené z kovu nebo teflonu a jejich porozita je 0,2 μm . Zásobníky musí být uzavřeny, aby z nich neunikaly páry rozpouštědla do okolí a aby nedošlo ke kontaminaci mobilní fáze z okolního prostředí (prach, mikroorganismy). (4)

2.2.2 Odplyňovač

Odplyňovač se nachází mezi zásobníkem mobilní fáze a čerpadlem, slouží k odplynění mobilní fáze a zajišťuje kontinuitu průtoku mobilní fáze. Plyny v mobilní fázi mohou ovlivnit funkci vysokotlakého čerpadla, může docházet k uvolnění bublin v sacích ventilech a k zavzdušnění hlavy pumpy. Průtok mobilní fáze pak není bezpulzní a opakovatelný a důsledkem je kolísání tlaku v systému HPLC. (4)

2.2.3 Vysokotlaké čerpadlo

Vysokotlaká čerpadla vytlačují mobilní fázi ze zásobníku a jejich cílem je dosažení průtoku v rozsahu od mikrolitrů/min do desítek mililitrů/min s méně než 1% kolísáním průtoku při tlaku až 130 MPa. (3) Čerpadla bývají nejčastěji z nerezové oceli, keramiky nebo titanu, aby byla odolná vůči korozi i při použití mobilních fází, které mohou být agresivní. (4) Nesmí docházet k narušování mobilních fází a nesmí se do ní uvolňovat žádné látky. (3)

2.2.4 Dávkovač vzorků

V současné době se k nástřiku vzorků do chromatografického systému používají manuální smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů nebo automatické dávkovače (tzv. autosamplery).

Vzorek je dávkován pomocí dávkovací smyčky s šesticestným ventilem nebo s několika třicestnými ventily. V plnicí fázi se smyčka naplní vzorkem a mobilní fáze protéká mimo dávkovací smyčku. Po otočení ventilu začne mobilní fáze protékat smyčkou a vzorek je unášen proudem mobilní fáze.

Mezi nástřiky jednotlivých vzorků se musí jehla i smyčka opláchnout, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků.

Autosamplery jsou výhodnější díky možnosti automatizace, zejména při zpracovávání velkého počtu vzorků. Vzorky jsou v autosampleru umístěny ve vialkách. Vialky jsou malé skleněné nebo plastové lahvičky o různých objemech (nejčastěji 2 ml), uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Vnitřní část septa je pokryta teflonem a zamezuje přímému kontaktu vzorku s pryžovým septem. Do vialek je možné vložit tzv. inserty, které mají menší objem. (4)

2.2.5 Směšovací zařízení

Směšovač se používá při gradientové eluci, kdy jsou míseny proudy ze dvou nebo více zásobníků. Bývá umístěn před nebo i za vysokotlakým čerpadlem.

Rozlišujeme směšování za vysokého a nízkého tlaku:

- nízkotlaký gradient – mísení probíhá za atmosférického tlaku ve směšovací komůrce před vstupem do vysokotlakého čerpadla

- poměr složek mobilní fáze pro gradientovou eluci je řízen otevíráním a zavíráním ventilů na vstupu do směšovací komůrky

- **výhoda** – vysoká přesnost tvorby gradientu

- **nevýhoda** – velký mrtvý objem a časové zpoždění gradientu

- vysokotlaký gradient – každá složka mobilní fáze je přiváděna svým vlastním vysokotlakým čerpadlem do směšovací komůrky, která je umístěna v prostoru za pumpou

- **výhoda** – menší mrtvý objem - malé zpoždění gradientu a rychlá odezva na změnu složení mobilní fáze

- **nevýhoda** – nízká přesnost tvorba gradientu a nutnost použití dvou vysokotlakých čerpadel (4)

2.2.6 Chromatografická kolona

Chromatografická kolona je trubice s hladkým vnitřním povrchem, naplněná stacionární fází (4), v níž dochází k rozdělování směsi na jednotlivé složky, které jsou unášeny mobilní fází do detektoru (1). Vnitřní průměr kolony bývá v rozmezí 2,1 až 5 mm a její délka je 10 až 300 mm. K výrobě kolon se používají materiály, které jsou schopné odolávat vysokým tlakům (do 100 MPa) a jsou odolné proti chemickému působení mobilní fáze. Nejčastěji se pro jejich výrobu používá nerezová ocel, PEEK (polyetheretherketon) nebo speciálně tvrzené sklo vložené do kovového pouzdra. (4)

K ochraně hlavní kolony se používají předkolony, které jsou umístěny buď mezi čerpadlem a dávkovacím zařízením, nebo mezi dávkovacím zařízením a kolonou. Jejich úkolem je ochrana kolony před nečistotami a nerozpustnými materiály. (3)

2.2.7 Termostat kolony

Průtokem/třením mobilní fáze kolonou vzniká tepelná energie, která se následně rozptyluje celou chromatografickou kolonou a vznikají teplotní gradienty. Vlivem rozdílné teploty může docházet ke ztrátě separační účinnosti a ovlivnění retenčních časů. Teplota má také vliv na viskozitu mobilní fáze.

Během analýz je proto důležité udržet teplotu konstantní. K tomu slouží termostat, který zajišťuje rovnoměrnou distribuci teploty v celém prostoru a zároveň brání i lokálním teplotním výkyvům.

Rozlišujeme kapalinové a teplovzdušné termostaty, přičemž lepší přenos tepla zajišťují kapalinové termostaty. (4)

2.2.8 Detektory

Detektor je zařízení sloužící k detekci analyzovaných látek. Na detektory bývají kladeny určité (ideální) požadavky:

- vysoká citlivost, linearita, specifita, nedestruktivnost, spolehlivost a snadné použití
- univerzálnost - odezva pro všechny analyty, předvídatelná odezva
- signál nezávislý na složení mobilní fáze nebo na změně teploty a průtoku atd.

(4)

2.2.8.1 Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory jsou nejčastějším typem detektorů v HPLC analýze léčiv (1). Jsou založeny na principu absorpce elektromagnetického záření v oblasti

vlnových délek od 190 do 800 nm (4). Jejich výhodou je značná citlivost a možnost jejich použití při gradientové eluci (1).

2.2.8.2 Fluorimetrické detektory

Fluorimetrické detektory fungují na principu fluorescence a měří sekundární (emisní) záření, které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického (excitačního) záření (4). Používají se v případech, kdy analyzovaná látka, její rozkladný produkt či metabolit má schopnost fluorescence. Pokud látky nefluoreskují, je možné je derivatizací s vhodnými činidly přeměnit na fluoreskující deriváty. Tyto detektory jsou citlivější a selektivnější než UV detektory. Jejich nevýhodou je nižší univerzálnost. Lze je také využívat u gradientové eluce. (1)

2.2.8.3 Elektrochemické detektory

Elektrochemické detektory se používají k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce, probíhající na fázovém rozhraní elektroda - mobilní fáze. Nejčastěji se využívá elektrochemické redoxní reakce. Umožňují měřit určité elektrochemické veličiny (např. elektrodový potenciál, proud, kapacitu (4)), jejíž hodnota je závislá na koncentraci analyzované látky (1), vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektorem.

Tyto detektory se vyznačují vysokou citlivostí (4). Jejich nevýhodou je, že je nelze použít u gradientové eluce (1).

2.2.8.4 Detektory na bázi aerosolu

Tyto detektory jsou univerzální. Uplatňují se zejména v oblasti farmaceutické a potravinářské analýzy – např. v analýze lipidů, proteinů, steroidů, polymerů atd.

HPLC eluent je za pomoci proudu dusíku jemně zmlžen, čímž vznikají jemné kapky aerosolu. Ve vyhřívané části dochází k odpaření rozpouštědla a vznikají částice analytu, které jsou následně detekovány pomocí rozptylu světla.

- *výhody* – možnost univerzální detekce netěkavých analytů, nezávislost odpovědi detektoru na chemických vlastnostech a jednoduchost ovládání

- *nevýhody* – závislost na složení mobilní fáze, nemožnost získat spektrální data, znemožňující potvrzení identity píků či vyhodnocení čistoty píků (4)

2.2.8.5 Refraktometrické detektory

Odezva refraktometrického detektoru je dána rozdílem indexu lomu mezi eluátem obsahujícím analyzovanou látku a indexem lomu mobilní fáze.

Tento detektor je sice univerzální, ale má řadu nevýhod – např. menší citlivost detekce, závislost odezvy detektoru na teplotě či nemožnost použití gradientové eluce (4).

2.2.8.6 Vodivostní detektory

Vodivostní detektory jsou univerzální detektory a měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci těchto elektrod. Využívá se zejména v iontové výměnné chromatografii.

Tento detektor je konstrukčně nenáročný. Jsou zde vysoké nároky na mobilní fázi. Ta by měla být nevodivá a zároveň musí analyzované látky dostatečně rozpouštět a mít dostatečně velkou permitivitu (4).

2.2.8.7 Hmotnostně spektrometrická detekce

Tento typ detekce je založen na spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií. Detekce je vysoce selektivní, citlivá, ale zároveň finančně náročná.

Po výstupu eluentu z HPLC je nutné odstranit mobilní fázi a molekuly vzorku v plynném stavu ionizovat, poté dojde k rozdělení iontů podle hmotnosti a náboje a následně k jejich detekci (1).

2.2.9 Počítač

Z detektoru je vhodně upravený signál přenesen do počítače s vhodným softwarem, který data zaznamená pro následné vyhodnocení (1). Počítač slouží také pro ovládání a ladění HPLC systému (4).

2.2.10 Stacionární fáze

Stacionární fáze je nepohyblivou složkou chromatografického systému, na které dochází k vlastnímu separačnímu procesu. Může se jednat o tuhou látku nebo film kapaliny zakotvený nebo chemicky navázaný na tuhou matici (nosič) (4).

2.2.10.1 Silikagel

Aktivním centrem silikagelu jsou hydroxylové skupiny, které se díky své reaktivitě používají pro přípravu tzv. chemicky vázaných stacionárních fází.

Povrch silikagelu je slabě kyselý a může se také použít jako iontoměnič. Díky jeho kyselosti dochází k zadržování bazických látek, což může vést ke chvostování píků těchto látek. Lze tomu zabránit přidáním slabé organické báze (nejčastěji triethylaminu) do mobilní fáze. Nesmí ale dojít ke zvýšení pH mobilní fáze nad hodnotu 8. Po překročení této hodnoty začíná docházet k rozpouštění silikagelu (4).

2.2.10.2 Oxid hlinitý

I na povrchu oxidu hlinitého nalezneme hydroxylové skupiny, kromě nich jsou zde také centra s elektron-akceptorovými vlastnostmi. Ty mohou interagovat s molekulami bohatými na elektrony.

Na povrchu oxidu hlinitého dochází ke katalytickému štěpení a rozkladu nebo ireverzibilní adsorpci chromatografovaných látek, což je důvod, proč se používá méně než silikagel.

2.2.10.3 Chemicky vázané stacionární fáze

Chemicky vázané stacionární fáze jsou nejčastějším typem stacionární fáze. Jejich základem je silikagel, na jehož povrchu jsou hydroxylové skupiny, na které se mohou vhodnou chemickou reakcí vázat různé ligandy. Jejich výhodou je, že nedochází k vymývání stacionární fáze z nosiče ani jejímu částečnému rozpouštění ve fázi mobilní, ani k mechanickému strhávání při velkém průtoku mobilní fáze.

Podle polarit ligandů rozlišujeme:

- polární fáze – tvořena tříuhlíkatými řetězci zakončenými skupinami $-NH_2$, $-CN$

- příkladem je aminopropyl, jehož nevýhodou je vysoká reaktivita. Může reagovat s aldehydy nebo ketony za vzniku iminů, nebo může docházet k oxidaci či za přítomnosti vody k hydrolýze NH_2 skupiny. Výsledkem hydrolýzy NH_2 skupiny je alkalické prostředí v pórech, čímž by mohlo dojít k rozpouštění silikagelu.

- nepolární (reverzní) fáze - fáze etherového typu $-Si-O-R$ - mají pouze omezené použití, za přítomnosti vody v mobilní fázi dochází k jejich hydrolýze

- fáze typu $-Si-NH-R$ - je stabilnější vůči hydrolýze

- fáze typu $-Si-O-Si-R$ - jsou zcela odolné vůči hydrolýze

- ligand R je tvořen uhlovodíkovým řetězcem - C18, C8 nebo fenylem (5)

2.3 Validace metody

Validace je proces, jehož cílem je zajištění spolehlivosti metody při opakovaném použití. Validací se zjišťuje, zda je daná metoda vhodná pro zamýšlený účel, a to ověřením charakteristických parametrů:

Správnost je definována jako shoda mezi získanou a skutečnou hodnotou.

Přesnost je definována jako míra shody mezi jednotlivými výsledky, které se získaly opakovaným měřením jednoho homogenního vzorku.

Selektivita je definována jako vlastnost, která umožňuje správně a specificky změřit danou látku za přítomnosti jiných látek (např. pomocných látek, rozkladných produktů, zbytkových rozpouštědel atd.).

Detekční limit je parametr citlivosti metody. Jedná se o nejnižší detekovatelnou koncentraci látky, kterou nestanovujeme kvantitativně.

Kvantitativní limit také vyjadřuje citlivost metody. Jedná se o nejnižší koncentraci látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností.

Linearita je definována jako schopnost metody podávat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci stanovované látky.

Rozsah je definován jako koncentrační hranice, ve kterých se může metoda použít.

Robustnost je definována jako míra vlivu proměnných podmínek na výsledek analytického stanovení. (6)

2.4 Fytoestrogeny

Fytoestrogeny jsou přírodní látky nesteroidní povahy vyskytující se v rostlinách, nejčastěji ve formě glykosidů. Mohou se vyskytovat i ve formě aglykonů. Ve svých molekulách obsahují fenolové jádro, které umožňuje vazbu fytoestrogenu na estrogení receptor, čímž fytoestrogeny získávají estrogení vlastnosti. Kromě estrogeních účinků vykazují i účinky antiestrogení.

Rozdělujeme je na isoflavony, stilbeny, lignany a kumestany, které se od sebe liší svými estrogeními vlastnostmi. (7, 8)

Nejvýznamnějším zdrojem fytoestrogenů jsou luštěniny z čeledi Fabaceae (bobovité) - sója luštinatá (*Glycine max*), červený jetel (*Trifolium pratense*), vojtěška (*Medicago*), lékořice (*Glycyrrhiza*) a ploštičník / samorostlík (*Cimicifuga / Actaea*) z čeledi Ranunculaceae (pryskyřníkovité). (8, 9)

2.4.1 Isoflavony

Isoflavony jsou sekundární metabolity, jejichž základní strukturní jednotkou jsou dvě benzenová jádra (A a B) spojená přes hyterocyklický pyronový kruh (C).

Biosyntéza isoflavonů vychází z aktivované kyseliny p-kumarové a tří molekul malonyl-CoA. Reakcí vznikne chalkon, který podléhá stereospecifické cyklizaci, a vznikne flavanon obsahující základní chromanový skelet. Působením specifické isomerázy dojde k přemístění kruhu B z polohy C2 do polohy C3, a vznikne isoflavon.

V molekule isoflavonu jsou obsaženy dvě fenolické skupiny, jejichž vzdálenost se příliš neliší od vzdálenosti dvou hydroxylů (poloha C3 a C17) v molekule 17 β -estradiolu, která je podmínkou jeho účinku.

Díky podobné struktuře s 17 β -estradiolem se isoflavony mohou vázat na estrogení, progesteronové či androgení receptory. Od 17 β -estradiolu však liší rozdílnou afinitou k alfa a beta-estradiolovým receptorům. Zatímco 17 β -estradiol má k oběma estradiolovým receptorům afinitu stejnou, isoflavony mají větší afinitu k beta-estradiolovým receptorům než k alfa-estradiolovým receptorům. Beta-estradiolové receptory se nacházejí zejména v kostech, v epitelu krevních kapilár, prostatě a vyšších centrech centrální nervové soustavy. Alfa-estradiolové receptory jsou přítomny převážně v prsní a děložní tkáni. Právě větší afinitou k beta-estradiolovým receptorům bývá vysvětlován pozitivní vliv na prevenci kardiovaskulárních onemocnění a osteoporózy (10).

2.4.2 Účinky isoflavonů

2.4.2.1 Osteoporóza

Isoflavony jsou schopné stimulovat kostní tkáň a mohou tedy mít pozitivní účinek na osteoporózu. Ovlivňují zejména osteoklastické a osteoblastické (alkalické fosfatázy) faktory, k účinku tedy nedochází prostřednictvím estrogenových receptorů. Isoflavony jsou schopny selektivně antagonizovat účinky parathormonu, nedochází tak k aktivaci osteoklastů a vyplavování vápníku a fosforu z kostní tkáně (8).

2.4.2.2 Kardiovaskulární systém

Isoflavony mohou mít pozitivní vliv na srdeční onemocnění. Díky svým redukčním vlastnostem jsou schopny snižovat koncentraci lipidů a lipoproteinů v plazmě. Ke snižování LDL cholesterolu dochází přímou stimulací receptorů pro LDL v játrech. Navíc isoflavony mohou inhibovat lipoxygenázu, tím chrání LDL lipoproteiny před oxidací a snižují riziko aterosklerózy. (9, 11)

2.4.2.3 Menopauza

Isoflavony jsou schopny se vázat na beta-estradiolové receptory, snížit tak hladinu gonadotropinů v mozku a hypofýze a ovlivnit řadu menopauzálních symptomů – poruchy spánku, návaly horka, výkyvy nálad, deprese, únava, problémy s pamětí či obtížné soustředění. (7, 12)

Mezi nejčastější symptomy u žen v období menopauzy patří návaly. I přes velký počet studií však neexistuje žádný klinický důkaz prokazující pozitivní vliv isoflavonů na frekvenci návalů horka či na jiné menopauzální obtíže. Pozitivní efekt byl zaznamenán pouze u žen s vyšší frekvencí návalů horka a u žen, které byly schopné metabolizovat isoflavony na equol, který byl prokazatelně detekován v moči. U žen v reprodukčním věku by ale mohly být isoflavony (ve vyšších dávkách) naopak škodlivé a mohly by způsobit poruchy menstruačního cyklu, endometriózu či neplodnost (8, 13, 14).

2.4.2.4 Nádorová onemocnění

Isoflavony díky vyšší afinitě k beta-ER by měly indukovat apoptózu a inhibovat proliferaci T-47D a MCF-7 nádorových buněk prsu.

Isoflavony mohou kompetitivně inhibovat 5- α -reduktázy a omezit tak progresi rakoviny prostaty.

Výsledky studií vlivu isoflavonů na riziko vzniku či na průběh nádorového onemocnění ale nejsou jednotné. Většinový názor odborníků je, že jejich příznivý vliv na lidské zdraví převažuje nad možnými riziky (8, 11, 15).

2.4.2.5 Antioxidační aktivita

Isoflavony kromě estrogenové aktivity mají také nehormonální účinky, např. antioxidační aktivitu.

Pro antioxidační aktivitu je nezbytná přítomnost dvou hydroxylových skupin (v polohách C4 a C7) a aglykony vykazují vyšší aktivitu než glykosidy.

Antioxidační vliv isoflavonoidů je spojen s jejich schopností redukce a vazby na proteiny. Jsou schopny inhibovat tvorbu superoxidových aniontů (9), bránit LDL cholesterol před oxidací a chránit organismus před oxidačním poškozením. Významnou roli hrají v prevenci některých onemocnění u žen po menopauze (8, 16).

2.4.3 Farmakokinetika isoflavonů

Isoflavony se většinou nachází ve formě glykosidů, které mají vyšší molekulovou hmotnost a jsou hydrofilní, nemohou tak být absorbovány přímo, ale musí nejprve dojít k jejich hydrolýze.

Hydrolýza glykosidů může probíhat po celé délce gastrointestinálního traktu. Většinou dochází k hydrolýze v tenkém střevě (jejunu) střevními bakteriálními beta-glukosidázami, ale hydrolyzovány mohou být i v žaludku kyselinou chlorovodíkovou. Hydrolýzou vznikají volné aglykony, které jsou pasivní difuzí absorbovány přes střevní epitel. Poté jsou v játrech metabolizovány UDP-glukuronyltransferázou na glukuronidy. Částečně může docházet k metabolizaci i ve sliznici střev působením sulfotransferáz, čímž dojde ke vzniku sulfoglukuronidů. Tyto metabolity jsou poté vylučovány močí, případně i stolicí ven z těla. Mohou ale přecházet i do žluči a následně díky enterohepatálnímu oběhu zpět do střeva, kde může dojít k jejich dekonjugaci a k opakované absorpci.

Daidzein se metabolizuje na dihydrodaidzein, který je dále přeměňován na equol nebo O-demethylangolensin (ODMA). K metabolizaci daidzeinu na equol dochází pouze u 30-40% populace.

Nevzniká například u dětí v neonatálním věku, což je dáno absencí odpovídající střevní mikroflóry.

Genistein je metabolizován na dihydrogenistein a dále na 6-hydroxy-ODMA a p-ethylfenol (8, 11).

2.4.4 Popis vybraných isoflavonů

2.4.4.1 Genistin, genistein

Genistin je isoflavon vyskytující se především v luštěninách, kde se nachází ve formě glykosidu 5,7,4'-trihydroxyisoflavon-7-glukosid. Hydrolyzou glykosylovaného genistinu vzniká aglykon genistein (5,7,4'-trihydroxyisoflavon) (10). Hydrolyza probíhá většinou v tenkém střevě (jejunu) střevními bakteriálními beta-glukosidázami. Genistein je následně metabolizován na dihydrogenistein a dále na 6-hydroxy-ODMA a p-ethylfenol. Genistein také může podléhat enterohepatálnímu oběhu (11).

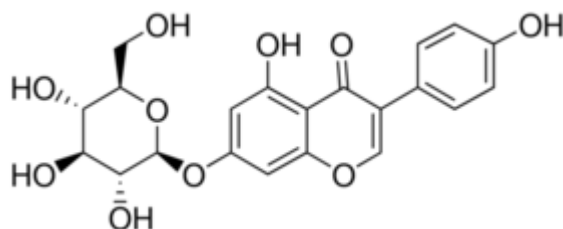
Genistein byl izolován roku 1899 z kručinky barvířské (*Genista tinctoria*, čeleď Fabaceae). V roce 1926 byla stanovena jeho struktura a o dva roky později byl syntetizován (17).

Genistin a genistein jsou strukturně podobné 17 β -estradiolu a jsou schopné vázat se na estrogení receptory (především beta-estrogení receptory). V některých tkáních napodobují účinky estrogenu a v jiných je naopak antagonistují (10).

Pro estrogení aktivitu genisteinu je nezbytná hydroxylová skupina v poloze 4' na C kruhu. Důležité je také prostorové uspořádání tohoto hydroxyly s hydroxyly v poloze 7 na kruhu A. Tato aktivita je redukována methyloací nebo přesunem fenolového kruhu C z polohy 3 do polohy 2 pyranového kruhu. Estrogení aktivita se ruší úplně v případě, že v poloze 7 bude objemný substituent – např. O-glukóza u genistinu. Genistin tedy nemá estrogení aktivitu ani antioxidační účinky. Není schopen ovlivnit topoisomerázu II či proliferaci buněk.

Genistein je schopný inhibovat topoisomerázu II a tyrosin-kinázu a tím inhibovat buněčnou proliferaci a angiogenezi. Pro inhibiční aktivitu je důležitá hydroxylová skupina v poloze 5 a hydroxyly v polohách 7 a 4' nezbytné pro projev této aktivity.

Má také antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Je možné ho použít k léčbě kardiovaskulárních onemocnění, menopauzy či rakoviny. Potlačuje funkci osteoklastů, díky čemuž je možné ho využít při léčbě osteoporózy. Schopnost stabilizovat žírné buňky je využívána při léčbě alergií (18).



Obr. 1 Struktura genistinu (22)

2.4.4.2 Daidzin, daidzein

Daidzin je isoflavon vyskytující se především v luštěninách, kde se nachází ve formě glykosidu 7,4'-dihydroxyisoflavon-7-glukosid. Hydrolýzou glykosylovaného daidzinu vzniká aglykon daidzein (7,4'-dihydroxyisoflavon) (10). Hydrolýza probíhá většinou v tenkém střevě (jejunu) střevními bakteriálními beta-glukosidázami. Daidzein je následně metabolizován na dihydrodaidzein, který je dále přeměňován na equol nebo O-demethylangolensin (ODMA). K metabolizaci daidzeinu na equol dochází pouze u 30-40% populace. Nevzniká například u dětí v neonatální věku, což je dáno absencí odpovídající střevní mikroflóry. Daidzein také může podléhat enterohepatálnímu oběhu (11).

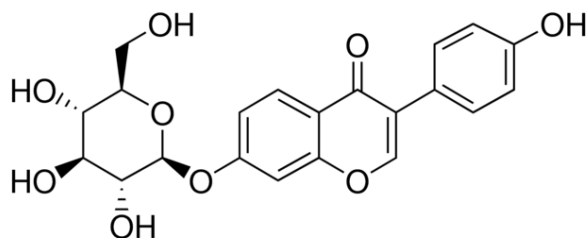
Jedná se o nesteroidní sloučeniny, které se svou strukturou podobají 17β -estradiolu a jsou schopny interagovat s estrogenními receptory (především beta-estrogenní receptory), mohou tak vyvolávat slabé estrogenní nebo i antiestrogenní účinky.

Daidzein je schopný inhibovat izoenzymy třídy I lidské alkoholové dehydrogenázy (ALDH) a lidské mitochondriální aldehyddehydrogenázy (ALDH-2). Inhibice ADH i ALDH-2 vede k potlačení konzumace alkoholu u lidí. Dá se tak využít k léčbě závislosti na alkoholu (19).

Daidzein vykazuje také řadu dalších biologických účinků, které nesouvisejí s jeho vazbou na estrogenní receptory. Jsou to například protizánětlivé, protirakovinné, antioxidantní účinky nebo ochrana kůže a nervů. Tyto příznivé účinky jsou způsobeny hlavně regulací imunitní odpovědi, vychytáváním volných radikálů kyslíku, inhibicí proliferace atd.

Daidzein se používá i v tradiční čínské medicíně, kde se používá k léčbě horečky, akutní úplavice, cukrovky, srdečních dysfunkcí, poškození jater atd.

Biologický aktivní je pouze aglykon daidzein a některé jeho metabolity. Daidzin obsahující cukernou složku je neaktivní (20).

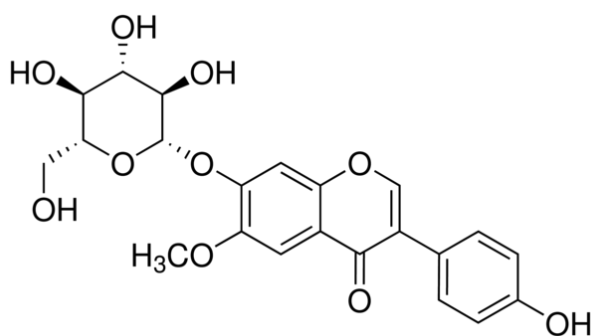


Obr. 2 Struktura daidzinu (22)

2.4.4.3 Glycitin, glycitein

Glycitin je stejně jako genistin a daidzin isoflavon vyskytující se především v rostlinách čeledi Fabaceae, kde se nachází ve formě glykosidu 7,4'-dihydroxy-6-methoxyisoflavon-7-glukosid. Hydrolýzou glykosylovaného glycitinu vzniká aglykon glycitein (7,4'-dihydroxy-6-methoxyisoflavon) (10). Hydrolýza probíhá většinou v tenkém střevě (jejunu) střevními bakteriálními beta-glukosidázami. Glycitein také může podléhat enterohepatálnímu oběhu (11).

Patří mezi fytoestrogeny, strukturně se tedy podobají 17β -estradiolu. Důležitá je přítomnost fenolického kruhu, díky kterému můžou interagovat s estrogenovými receptory a vykazují estrogenové biologické účinky (21). Mají větší afinitu k beta-estradiolovým receptorům než k alfa-estradiolovým receptorům, proto se používají k prevenci osteoporózy, působením na resorpci kostí, a ke snížení rizika kardiovaskulárních chorob. Kromě toho mají antioxidační a protizánětlivé účinky (10).



Obr. 3 Struktura glycitinu (22)

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části je uveden seznam použitých chemikálií, pomůcek a přístrojů. Dále jsou zde uvedeny postupy přípravy roztoků použitých k HPLC analýze.

3.1 Použitý materiál

3.1.1 Chemikálie

- Deionizovaná voda čištěná reverzní osmózou (FaF)
- Kyselina mravenčí p. a. 99% (Penta)
- Acetonitril for gradient elution CHROMASOLV[®], (Aldrich)

3.1.2 Standardy

- Daidzein - 7,4'-dihydroxyisoflavon (Toronto Research Chemicals)
- Daidzin - 7,4'-dihydroxyisoflavon-7-glukosid (Toronto Research Chemicals)
- Genistein - 5,7,4'-trihydroxyisoflavon (Toronto Research Chemicals)
- Genistin - 5,7,4'-trihydroxyisoflavon-7-glukosid (Toronto Research Chemicals)
- Glycitin - 7,4'-dihydroxy-6-methoxyisoflavon-7-glukosid (Toronto Research Chemicals)

3.1.3 Pomůcky a přístroje

- Automatické pipety
- Odměrná baňka
- Odměrný válec
- Vialky
- Kádinky
- Laboratorní lžička
- Skleněná nálevka
- Váženka
- Analytické váhy

3.1.4 HPLC systém

K chromatografické analýze byl použit chromatografický systém Agilent® Series 1200 SL, který zahrnoval:

- vakuový mikrodegasér
- binární čerpadlo 1200 SL
- autosampler 1200 SL plus
- termostat autosampleru
- kolonový termostat TCC Infinity 1290
- detektor s diodovým polem 1200 SL
- fluorescenční detektor 1200
- software: Agilent ChemStation, verze B. 04.02.

3.1.5 Kolona

K experimentům v této diplomové práci byly používány dvě kolony:

- 1) Ascentis® Express RP – Amide (Supelco), 2,7 µm, 10 cm x 3 mm
- 2) Zorbax Eclipse® XDB-C18 (Agilent Technologies), 5,0 µm, 25 cm x 4,6 mm.

3.2 Příprava pracovních roztoků

3.2.1 Příprava roztoku kyseliny mravenčí

Roztok kyseliny mravenčí byl použit jako jedna ze složek mobilní fáze. Do 500 ml odměrné baňky bylo automatickou pipetou napipetováno 565 µl 99 % kyseliny mravenčí. Po rysku odměrné baňky se doplnila ultračistá voda a roztok byl řádně promísen několikerým překlopením. Takto připravený roztok měl koncentraci 0,03 mol/l.

3.2.2 Příprava zásobních roztoků standardů

Jednotlivé standardy byly naváženy a v odměrné baňce rozpuštěny v rozpouštědle. Jako rozpouštědlo byl zvolen acetonitril a kyselina mravenčí. Připravené zásobní roztoky standardů byly uchovávány v lednici (při 4-8 °C).

V tab. 1 je uveden přehled použitých standardů isoflavonů, jejich navážek, molárních hmotností a koncentrací.

Tab. 1 Přehled isoflavonů pro analýzu

	navážka [mg]	molární hmotnost [g/mol]	molární koncentrace [mol/l]
genistin	1,0	432,4	$2,31 \times 10^{-4}$
genistein	1,0	270,2	$3,70 \times 10^{-4}$
daidzin	1,0	416,4	$2,40 \times 10^{-4}$
daidzein	1,0	254,2	$3,93 \times 10^{-4}$
glycitin	0,9	446,4	$2,02 \times 10^{-4}$

3.2.3 Příprava měřených roztoků standardů

Ze zásobních roztoků standardů bylo do vialek odpipetováno 100 μ l. Poté bylo přidáno 900 μ l směsi mobilní fáze, která byla složena z roztoku kyseliny mravenčí a acetonitrilu v poměru 17:3, a následně byl roztok řádně promísen.

3.2.4 Příprava roztoků na měření kalibračních křivek

Do vialek bylo odměřeno 250 μ l, 500 μ l a 750 μ l z každého ze zásobních roztoků standardů. Poté byl každý roztok doplněn do jednoho mililitru roztokem kyseliny mravenčí a důkladně promísen.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

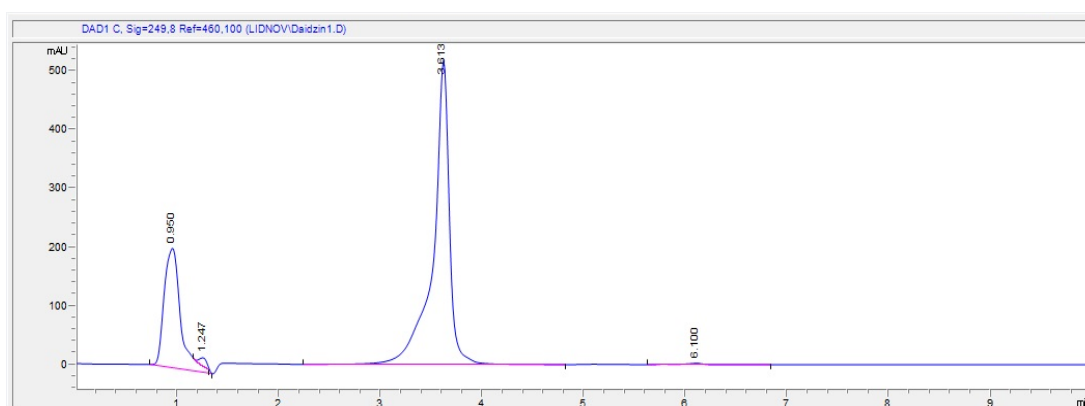
4.1 Roztoky standardů

4.1.1 Mobilní fáze voda/acetonitril

První pokusy byly provedeny s kolonou Ascentis® Express RP – Amide (Supelco), 2,7 μm , 10 cm x 3 mm. Nejprve byla použita mobilní fáze skládající se z vody a acetonitrilu. Měření probíhalo gradientovou elucí. Procentuální složení gradientu mobilní fáze voda/acetonitril v průběhu analýzy je uvedeno v tab. 2. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. Kolona byla termostatována na 30 °C. Na kolonu se nastříkaly roztoky standardů o objemu 10 μl . Vzorokly byly detekovány pomocí detektoru s diodovým polem. Sledovány byly dvě vlnové délky, a to 249 nm a 260 nm, ve kterých mají stanovované isoflavony absorpční maxima (23).

Tab. 2 Složení gradientu mobilní fáze voda/acetonitril v průběhu analýzy

čas [min]	voda [%]	acetonitril [%]
0	85	15
1	80	20
3	75	25
10	85	15



Obr. 4 Chromatogram daidzinu. Chromatografické podmínky: voda/acetonitril (gradientová eluce viz. tab. 2), průtok 0,5 ml/min, teplota 30 °C, nástřik 10 μl , spektrofotometrická detekce $\lambda = 249 \text{ nm}$, $t_R = 3,6 \text{ min}$

Tab. 3 Retenční časy isoflavonů, mobilní fáze - voda/acetonitril

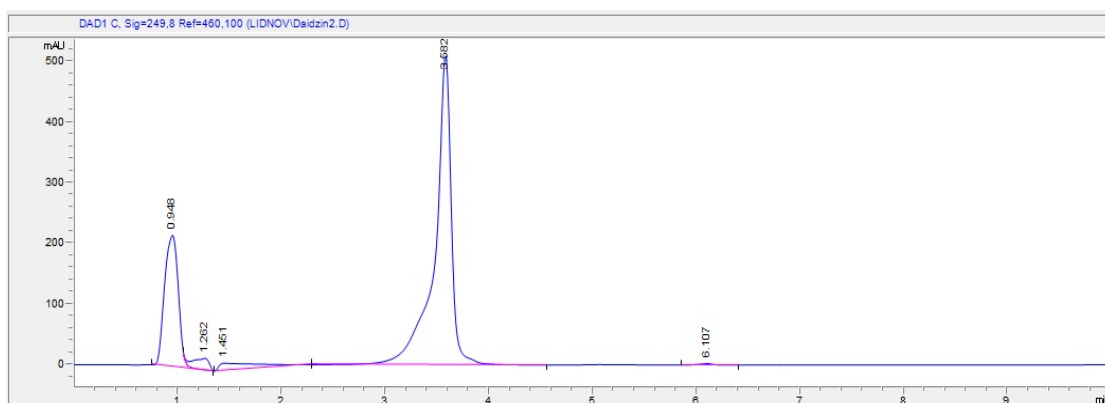
	retenční čas [min]
Daidzein	9,7
Daidzin	3,6
Genistein	5,9
Genistin	5,7
Glycitin	3,8

4.1.2 Mobilní fáze kyselina mravenčí/acetonitril

V dalších měřeních byla zkoušena mobilní fáze skládající se z vodného roztoku kyseliny mravenčí a acetonitrilu. Měření také probíhalo gradientovou elucí. Procentuální složení gradientu mobilní fáze kyselina mravenčí/acetonitril v průběhu analýzy je uvedeno v tab. 4. Další podmínky analýzy změněny nebyly. Oproti mobilní fázi voda/acetonitril došlo pouze k mírnému zkrácení retenčních časů (viz tab. 5).

Tab. 4 Složení gradientu mobilní fáze kyselina mravenčí/acetonitril 1 v průběhu analýzy

čas [min]	Kyselina mravenčí [%]	acetonitril [%]
0	85	15
1	80	20
3	75	25
10	85	15



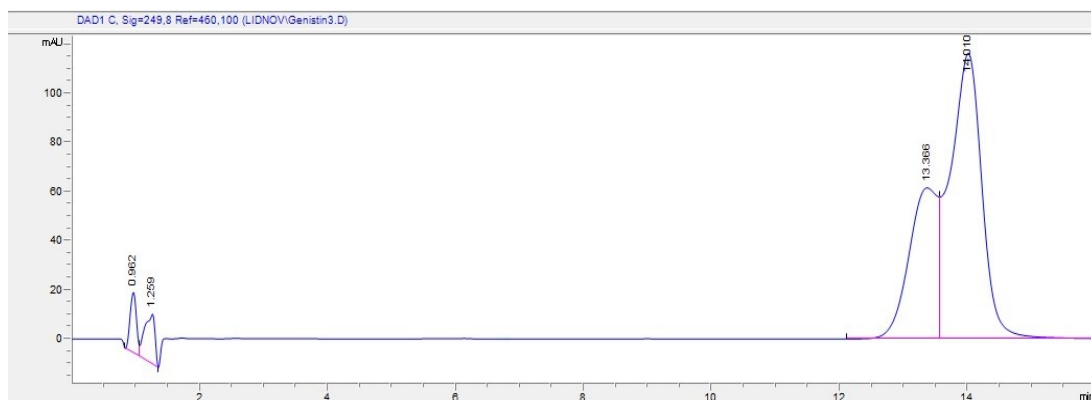
Obr. 5 Chromatogram daidzinu. Chromatografické podmínky: kyselina mravenčí/acetonitril (gradientová eluce viz. tab. 4), průtok 0,5 ml/min, teplota 30 °C, nástřik 10 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 249$ nm, $t_R = 3,6$ min

Tab. 5 Retenční časy isoflavonů, mobilní fáze – kyselina mravenčí/acetonitril 1

	retenční čas [min]
Daidzein	9,5
Daidzin	3,6
Genistein	5,6
Genistin	5,7
Glycitin	3,8

Následně byla vyzkoušena mobilní fáze kyselina mravenčí /acetonitril i k isokratické eluci. K analýze byl použit roztok kyseliny mravenčí a acetonitril v poměru 17:3.

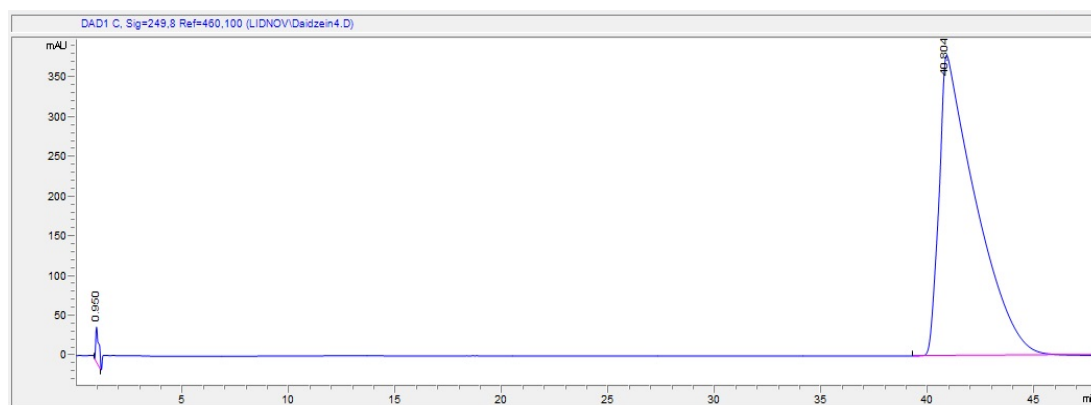
Na chromatogramu roztoku standardu genistinu se objevil dvojitý pík. Proto byla provedena změna poměru složek mobilní fáze. Snížilo se množství acetonitrilu o 3%. Snížením eluční síly mobilní fáze, ale k rozdělení dvojitého píku nedošlo.



Obr. 6 Chromatogram genistinu. Chromatografické podmínky: kyselina mravenčí /acetonitril v poměru 17:3, průtok 0,5 ml/min, teplota 30 °C, nástřik 10 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 249$ nm

Poté byl proveden výplach kolony pomocí mobilní fáze voda/acetonitril v poměru 1:9. Při výplachu byl detekován pík při obou vlnových délkách. Proto byla kolona vyměněna za kolonu Zorbax Eclipse® XDB-C18 (Agilent Technologies), 5,0 μ m, 25 cm x 4,6 mm.

Testování probíhalo v režimu gradientové eluce a byla použita mobilní fáze skládající se z vodného roztoku kyseliny mravenčí a acetonitrilu. Procentuální složení gradientu mobilní fáze v průběhu analýzy je uvedeno v tab. 4. Analýza probíhala při konstantním průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Kolona byla termostatována na 30 °C. Vzorky byly detekovány pomocí detektoru s diodovým polem. Sledovány byly dvě vlnové délky - 249 nm a 260 nm.



Obr. 7 Chromatogram daidzeinu. Chromatografické podmínky: kyselina mravenčí /acetonitril (gradientová eluce viz. tab. 4), průtok 0,5 ml/min, teplota 30 °C, nástřik 10 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 249$ nm, $t_R = 40,8$ min

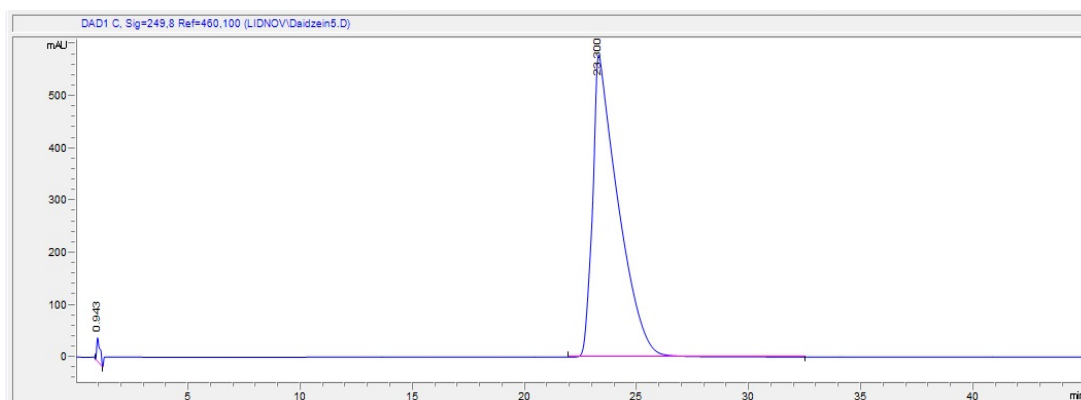
Tab. 6 Retenční časy isoflavonů, mobilní fáze – kyselina mravenčí/acetonitril 2

	retenční čas [min]
Daidzein	40,8
Daidzin	4,1
Genistein	7,4
Genistin	7,3
Glycitin	4,2

Z retenčních časů uvedených v tab. 6 je poznat, že retenční čas daidzeinu ($t_R = 40,8$ min) je v porovnání s retenčními časy zbylých vzorků standardů poměrně dlouhý. Proto byl změněn poměr složek mobilní fáze. Došlo k navýšení množství acetonitrilu o 2% (viz. tab. 7), čímž by se hodnota retenčního času měla snížit. Retenční čas daidzeinu se zkrátil skoro o polovinu ($t_R = 23,3$ min). Z důvodu rozdílných retenčních časů daidzeinu a daidzinu by se tato metoda dala použít pro jejich rozlišení či separaci aglykonu a glykosidu.

Tab. 7 Složení gradientu mobilní fáze kyselina mravenčí/acetonitril 2 v průběhu analýzy

čas [min]	Kyselina mravenčí [%]	acetonitril [%]
0	83	17
1	78	22
3	73	27
10	83	17



Obr. 8 Chromatogram daidzeinu. Chromatografické podmínky: kyselina mravenčí /acetonitril (gradientová eluce viz. tab. 7), průtok 0,5 ml/min, teplota 30 °C, nástřik 10 μ l, spektrofotometrická detekce $\lambda = 249$ nm, $t_R = 23,3$ min

4.2 Kalibrace

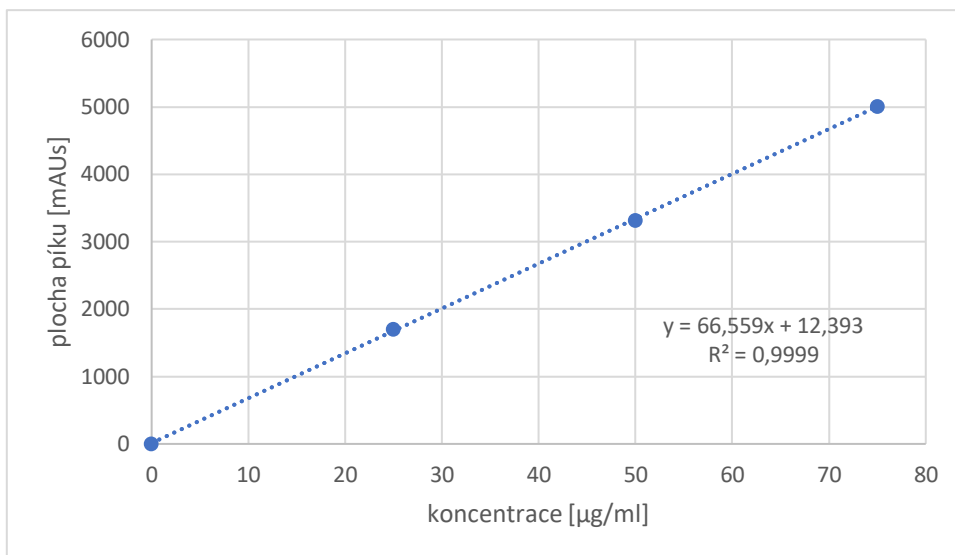
Kalibrační roztoky o různých koncentracích byly použity pro zjištění kalibrační závislosti. Příprava kalibračních roztoků je popsána v kapitole 3.2.4.

Rovnice lineární regrese byly následně použity pro stanovení koncentrace isoflavonů ve vzorcích biologického materiálu.

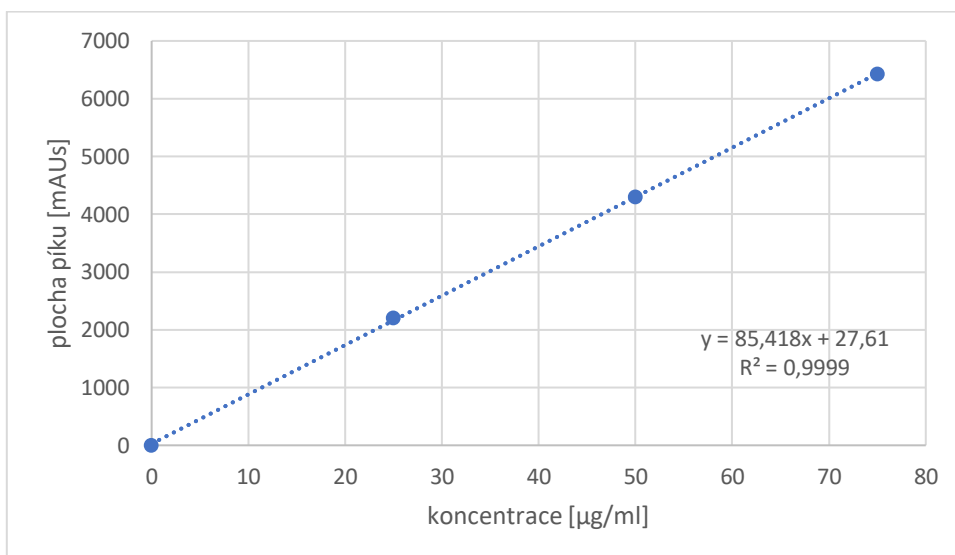
4.2.1 Genistin

Tab. 8 Kalibrační závislost genistinu

koncentrace [μ g/ml]	plocha píku [mAU]	
	249 nm	260 nm
25	1706,81	2206,2
50	3316,61	4295,1
75	5009,96	6421,9



Obr. 9 Kalibrační křivka genistinu při 249 nm

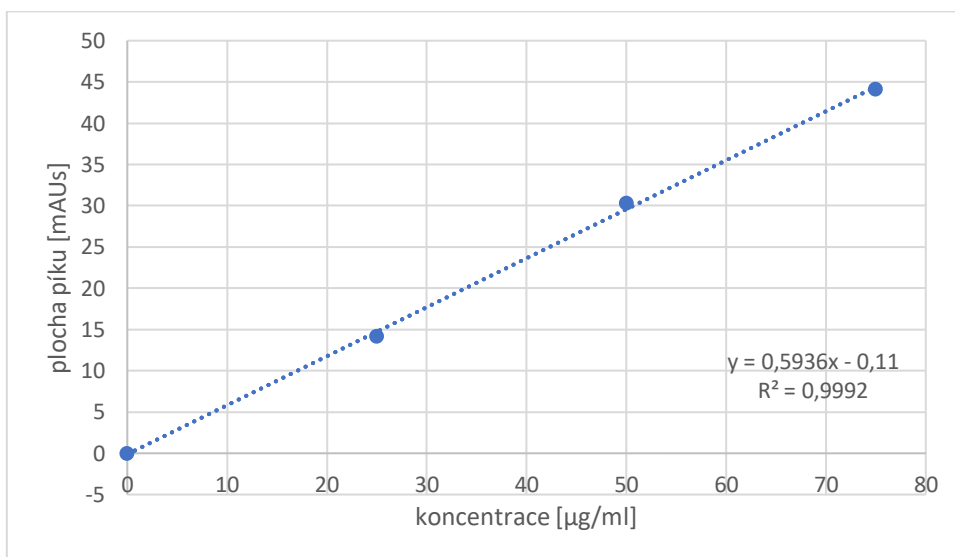


Obr. 10 Kalibrační křivka genistinu při 260 nm

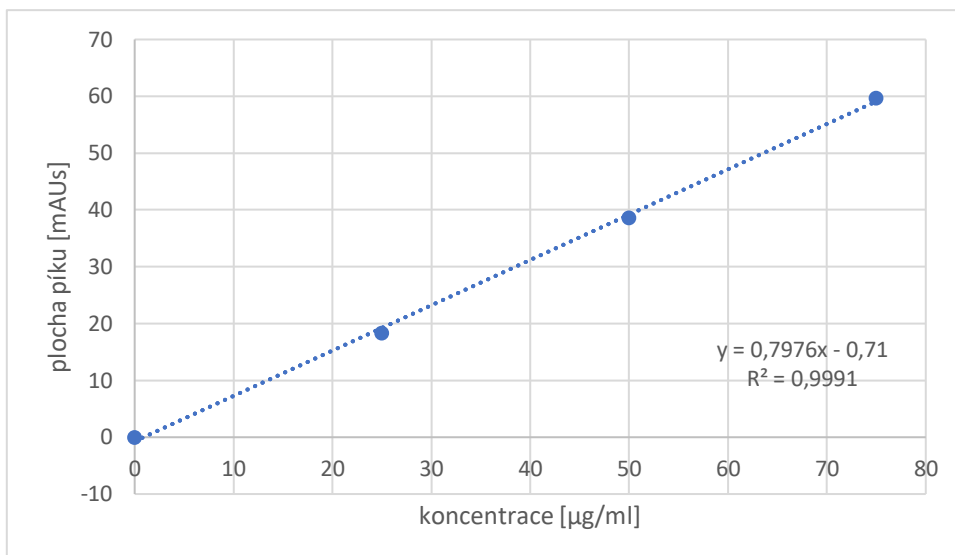
4.2.2 Genistein

Tab. 9 Kalibrační závislost genisteinu

koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	plocha píku [mAU]	
	249 nm	260 nm
25	14,2	18,4
50	30,3	38,7
75	44,1	59,7



Obr. 11 Kalibrační křivka genisteinu při 249 nm

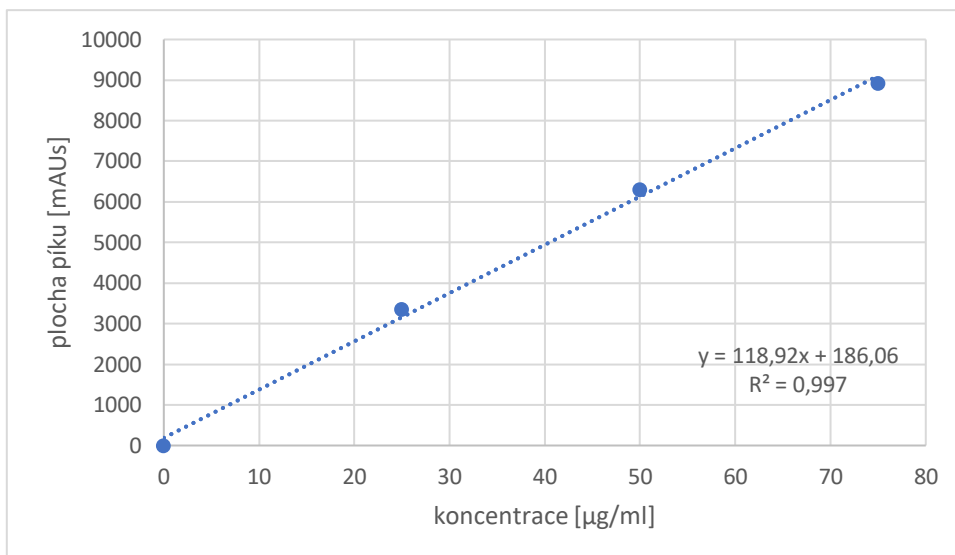


Obr. 12 Kalibrační křivka genisteinu při 260 nm

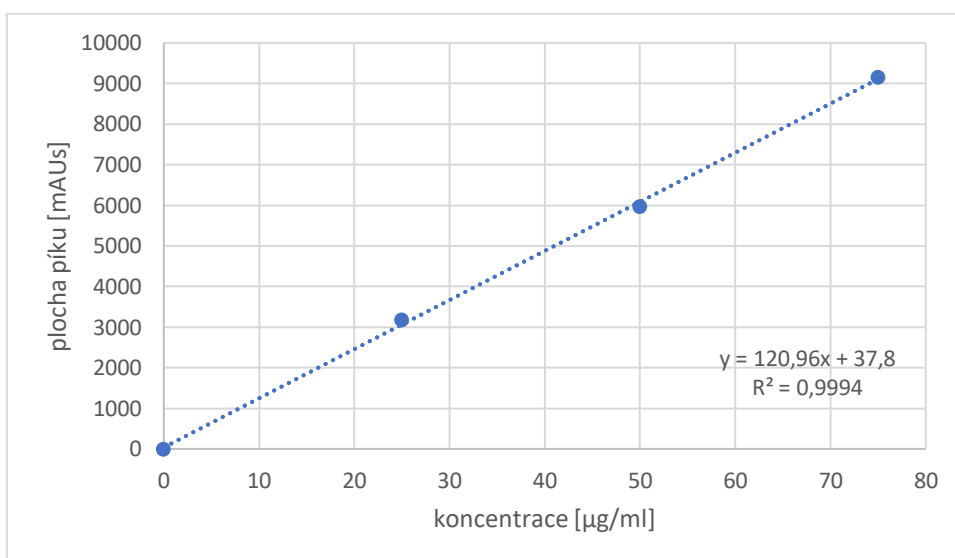
4.2.3 Daidzin

Tab. 10 Kalibrační závislost daidzinu

koncentrace [μg/ml]	plocha píku [mAU]	
	249 nm	260 nm
25	3353,3	3176,3
50	6302,2	5970,4
75	9672,4	9148,8



Obr. 13 Kalibrační křivka daidzinu při 249 nm

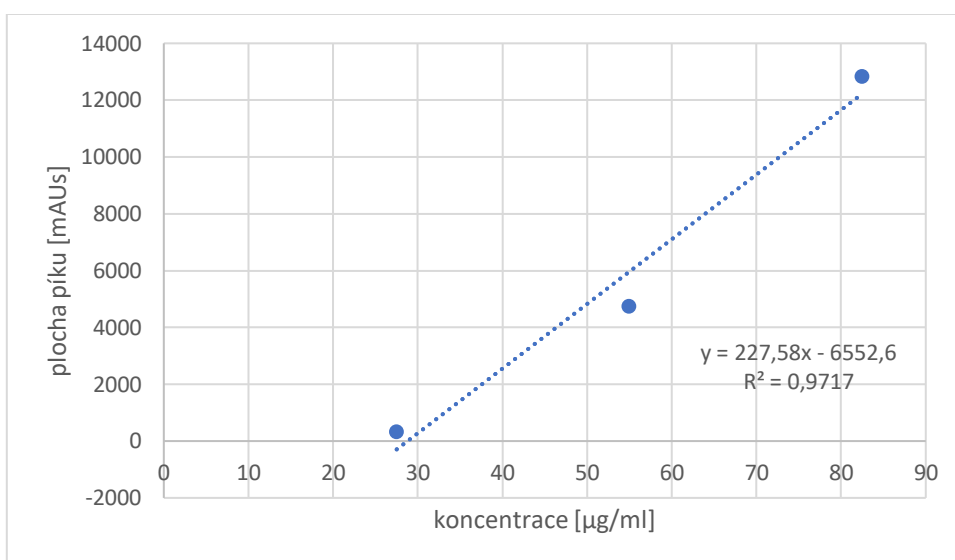


Obr. 14 Kalibrační křivka daidzinu při 260 nm

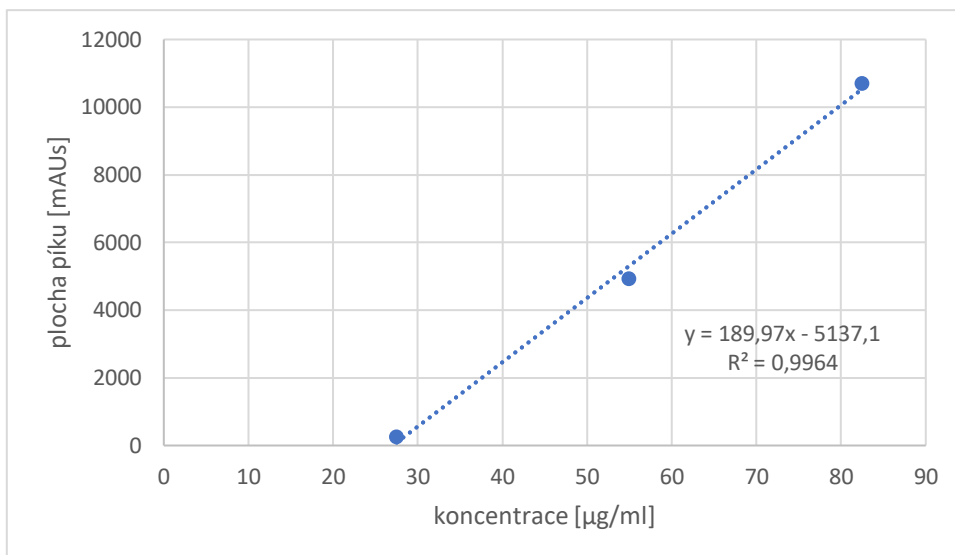
4.2.4 Daidzein

Tab. 11 Kalibrační závislost daidzeinu

koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	plocha píku [mAU]	
	249 nm	260 nm
25	322,9	269,4
50	5946,2	4946,2
75	12839,9	10717,5



Obr. 15 Kalibrační křivka daidzeinu při 249 nm

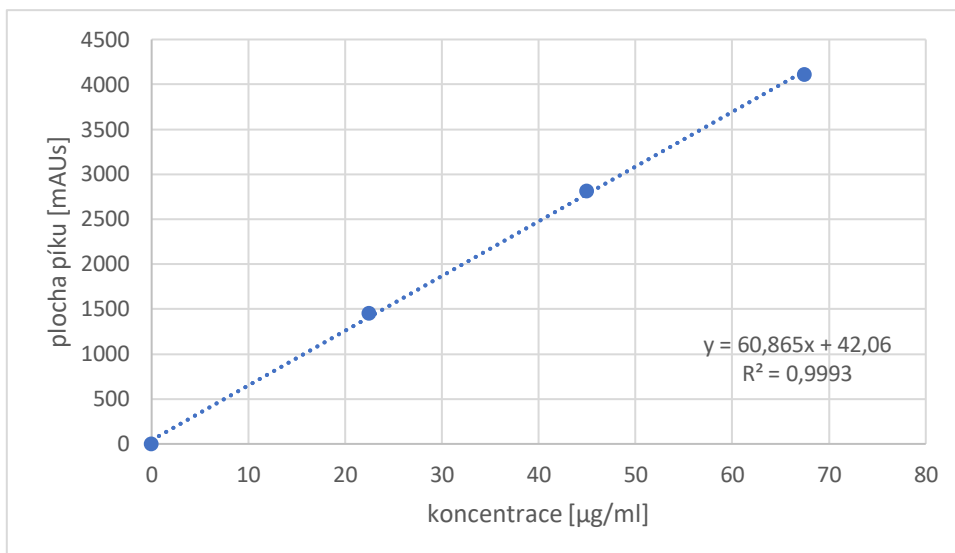


Obr. 16 Kalibrační křivka daidzeinu při 260 nm

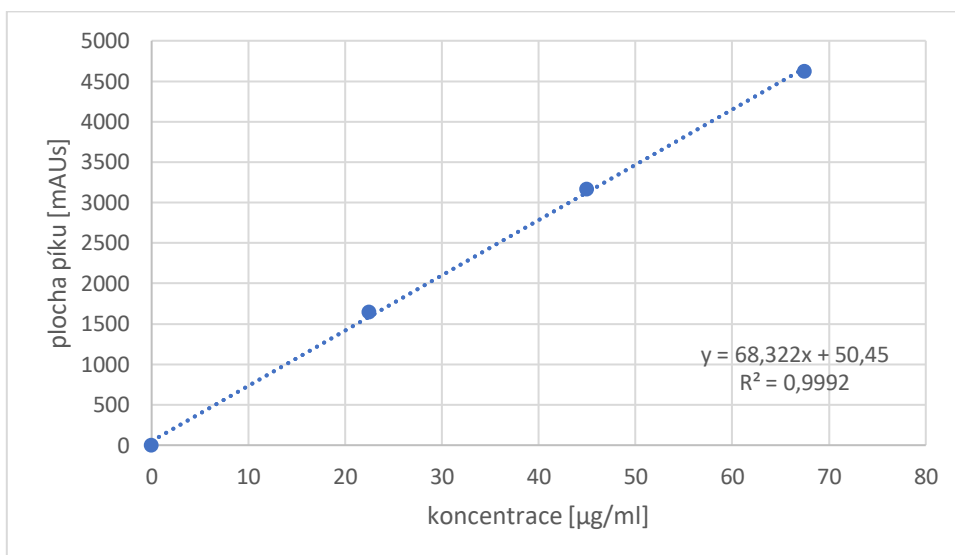
4.2.5 Glycitin

Tab. 12 Kalibrační závislost glycitinu

koncentrace [μg/ml]	plocha píku [mAU]	
	249 nm	260 nm
22,5	1458,4	1643,6
45	2813,4	3164,5
67,5	4113,2	4617,2



Obr. 17 Kalibrační křivka glycitinu při 249 nm



Obr. 18 Kalibrační křivka glycitinu při 260 nm

4.3 Vzorky biologického materiálu

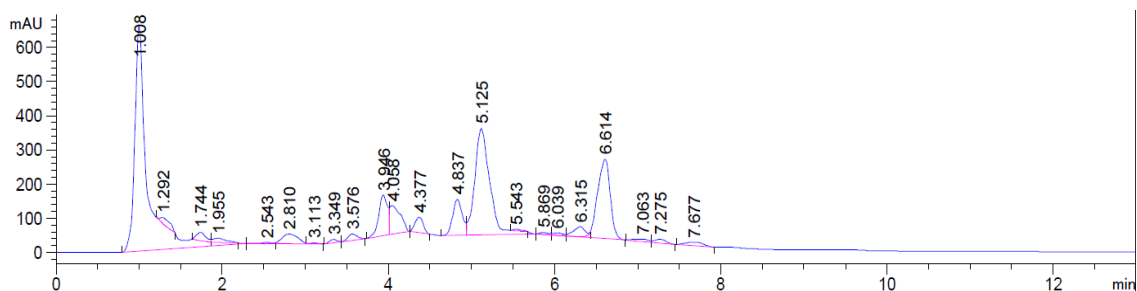
Potom byla provedena analýza 6 vzorků biologického materiálu. Jednalo se o skutečné vzorky z pokusů prováděných na Katedře biochemických věd FaF UK. K analýze byly dodány již extrakty biologického materiálu, které byly rekonstituovány ve výchozím slzení mobilní fáze. Na základě výsledků předchozích experimentů byla pro analýzu biologických vzorků vybrána kolona Ascentis® Express RP – Amide (Supelco), 2,7 μm , 10 cm x 3 mm.

K analýze byla použita mobilní fáze složená z roztoku kyseliny mravenčí a acetonitrilu. Měření probíhalo v režimu gradientové eluce. Procentuální složení gradientu mobilní fáze kyselina mravenčí/acetonitril v průběhu analýzy je uvedeno v tab. 4. Konstantní průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. Kolona byla termostatována na 30 °C. Na kolonu byly nastříkovány vzorky biologického materiálu o objemu 10 μl . Vzorky byly detekovány pomocí detektoru s diodovým polem. Sledovány byly opět dvě vlnové délky - 249 nm a 260 nm.

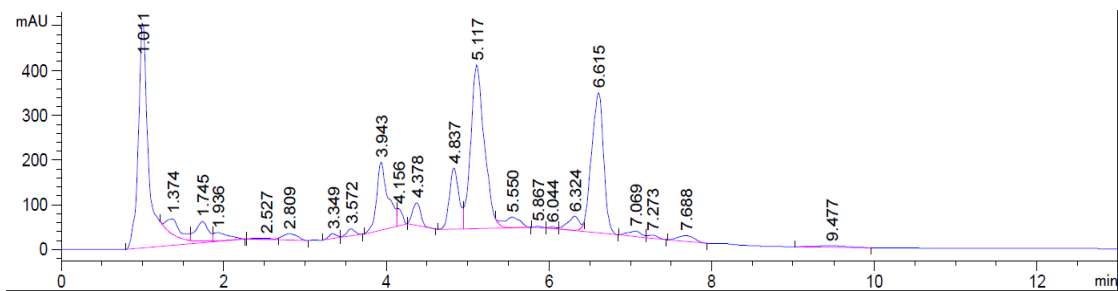
Na chromatogramech každého vzorku biologického materiálu byly na základě retenčních časů standardů, které jsou shrnuty v tab. 5, identifikovány píky isoflavonů. Každý vzorek byl nastříknut třikrát a hodnoty ploch píků jednotlivých isoflavonů byly zprůměrovány. V případě, že se některá z ploch jevila jako odlehlá, nebyla do průměru zahrnuta. Odlehlé hodnoty jsou v tab. 13 – 18 vyznačeny kurzívou. Koncentrace isoflavonů ve vzorcích byly vypočítány pomocí dříve naměřených kalibračních přímek. Výsledné koncentrace isoflavonů ve vzorcích jsou shrnuty v tab. 19 a 20.

4.3.1 Vzorek č. 1

V biologickém vzorku č. 1 byly při vlnové délce 249 nm nalezeny píky, jejichž retenční časy odpovídaly retenčním časům daidzinu ($t_R = 3,6$ min) a genisteinu ($t_R = 5,6$ min). Při vlnové délce 260 nm byl kromě píky daidzinu a genisteinu zaznamenán i pík daidzeinu ($t_R = 9,5$ min).



Obr. 19 Chromatogram biologického vzorku č. 1, $\lambda = 249$ nm



Obr. 20 Chromatogram biologického vzorku č. 1, $\lambda = 260 \text{ nm}$

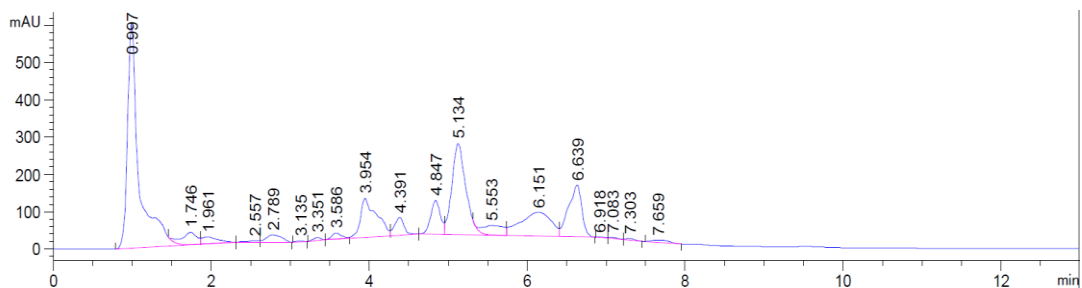
Tab. 13 Plochy píků ve vzorku č. 1

	249 nm		260 nm		
	plocha píku [mAU]		plocha píku [mAU]		
	daidzin	genistein	daidzin	genistein	Daidzein
1.	166,0	35,6	123,7	342,5	80,2
2.	145,1	36,3	110,5	320,0	78,4
3.	158,0	38,6	122,0	349,0	77,5
průměr	162,0	36,8	122,9	345,8	78,7

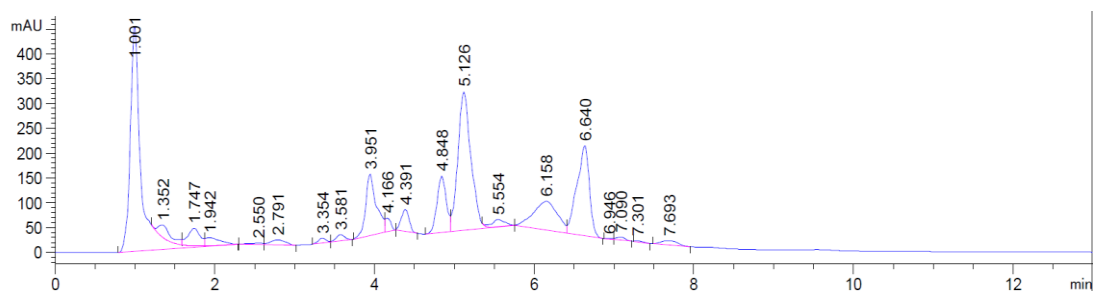
Koncentrace daidzinu vypočtená dosazením do rovnice lineární regrese odpovídala 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Vypočítaná koncentrace genisteinu se u obou vlnových délek lišila. Podle vlnové délky 249 nm odpovídala koncentrace 62 $\mu\text{g/ml}$, zatímco při vlnové délce 260 nm činila koncentrace 434 $\mu\text{g/ml}$. Pík daidzeinu se objevil pouze při vlnové délce 260 nm. Plocha jeho píku odpovídala koncentraci 27,5 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.2 Vzorek č. 2

V biologickém vzorku č. 2 byly nalezeny píky, jejichž retenční časy odpovídaly retenčním časům daidzinu ($t_R = 3,6 \text{ min}$) a genisteinu ($t_R = 5,6 \text{ min}$).



Obr. 21 Chromatogram biologického vzorku č. 2, $\lambda = 249$ nm



Obr. 22 Chromatogram biologického vzorku č. 2, $\lambda = 260$ nm

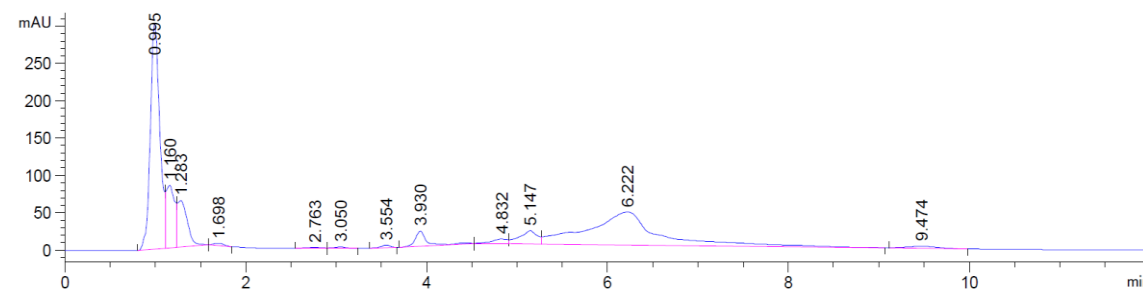
Tab. 14 Plochy píků ve vzorku č. 2

	249 nm		260 nm	
	plocha píku [mAU.s]		plocha píku [mAU.s]	
	daidzin	genistein	daidzin	genistein
1	134,5	471,7	90,2	166,4
2	119,2	67,4	92,2	97,6
3	115,0	108,1	89,3	177,9
průměr	122,9	-	90,6	172,2

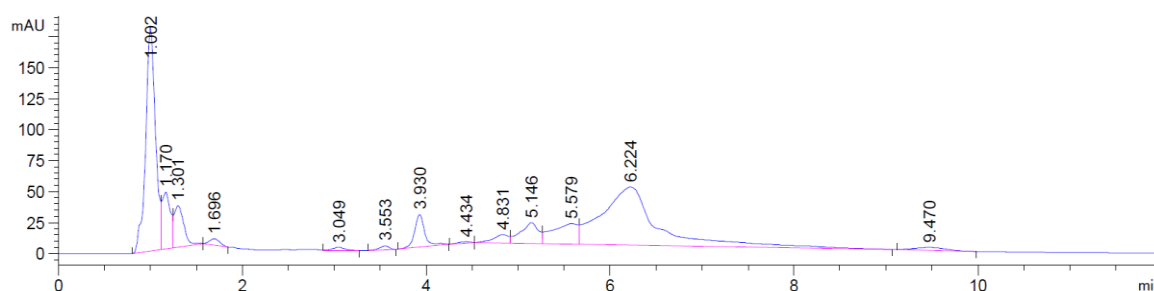
Koncentrace daidzinu vypočtená dosazením do rovnice lineární regrese odpovídala 0,8 $\mu\text{g/ml}$. V případě genisteinu je z tab. 14 vidět, že při 249 nm nelze získané hodnoty průměrovat, protože se naprosto neshodují. Proto byla jeho koncentrace určena pouze při vlnové délce 260 nm. Její hodnota činila 216,8 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.3 Vzorek č. 3

V biologickém vzorku č. 3 byly při vlnové délce 249 nm nalezeny píky, jejichž retenční časy odpovídaly retenčním časům daidzinu ($t_R = 3,6$ min) a daidzeinu ($t_R = 9,5$ min). Při vlnové délce 260 nm byl kromě píku daidzinu a daidzeinu zaznamenán i pík genisteinu ($t_R = 5,6$ min), jehož absorpční maximum je v 260 nm.



Obr. 23 Chromatogram biologického vzorku č. 3, $\lambda = 249$ nm



Obr. 24 Chromatogram biologického vzorku č. 3, $\lambda = 260$ nm

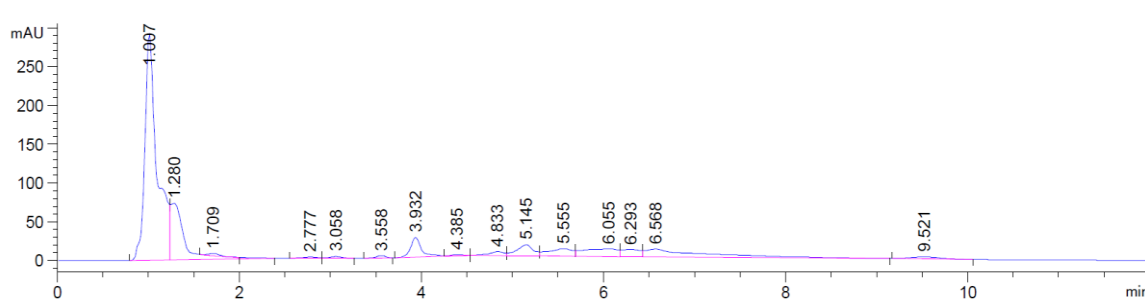
Tab. 15 Plochy píků ve vzorku č. 3

	249 nm		260 nm		
	plocha píku [mAU]		plocha píku [mAU]		
	daidzin	daidzein	daidzin	Genistein	daidzein
1	20,7	62,0	19,7	307,8	51,9
2	24,5	62,6	22,3	316,1	51,4
3	22,6	61,1	21,3	313,6	49,8
průměr	22,6	61,9	21,1	312,5	51,0

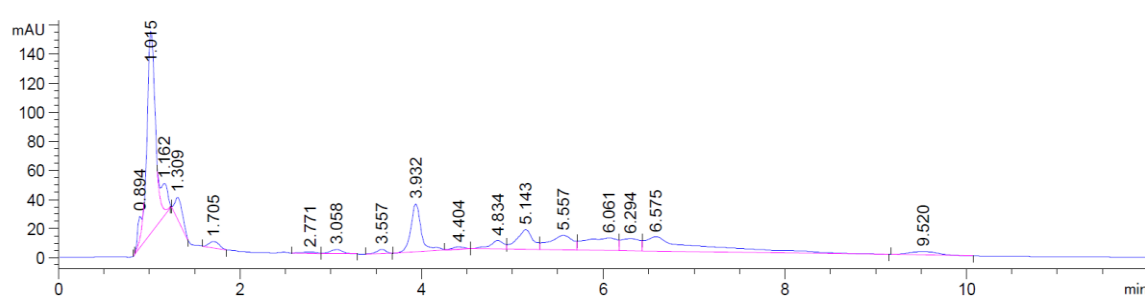
Plochy píků daidzinu na chromatogramech jsou velmi malé a nelze je vyhodnotit pomocí kalibračních přímk, proto není koncentrace daidzinu v tomto případě stanovena. Koncentrace daidzeinu odpovídala 27 $\mu\text{g/ml}$. Pík genisteinu se objevil pouze při vlnové délce 260 nm. Plocha jeho píku odpovídala koncentraci 393 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.4 Vzorek č. 4

V biologickém vzorku č. 4 byly nalezeny píky, jejichž retenční časy odpovídaly retenčním časům daidzinu ($t_R = 3,6$ min), genisteinu ($t_R = 5,6$ min) a daidzeinu ($t_R = 9,5$ min).



Obr. 25 Chromatogram biologického vzorku č. 4, $\lambda = 249$ nm



Obr. 26 Chromatogram biologického vzorku č. 4, $\lambda = 260$ nm

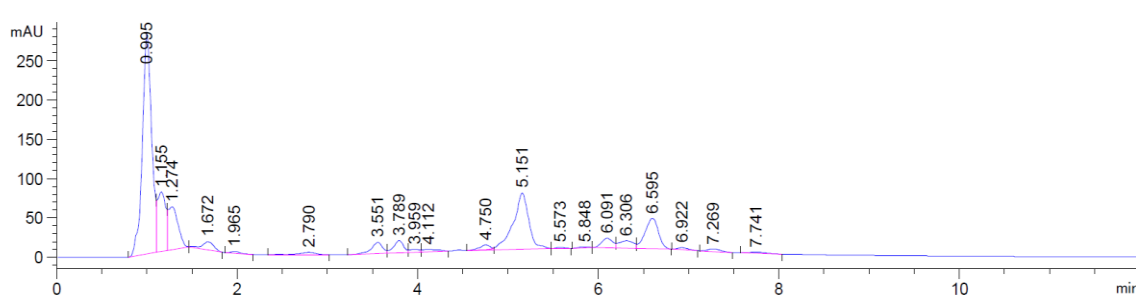
Tab. 16 Plochy píků ve vzorku č. 4

	249 nm			260 nm		
	plocha píku [mAU]			plocha píku [mAU]		
	daidzin	Genistein	daidzein	daidzin	genistein	Daidzein
1	19,2	130,4	59,9	18,1	150,3	49,7
2	21,8	124,6	60,6	20,3	174,5	50,3
3	20,8	114,5	58,8	19,3	167,1	49,9
průměr	20,6	123,2	59,8	19,2	164,0	50,0

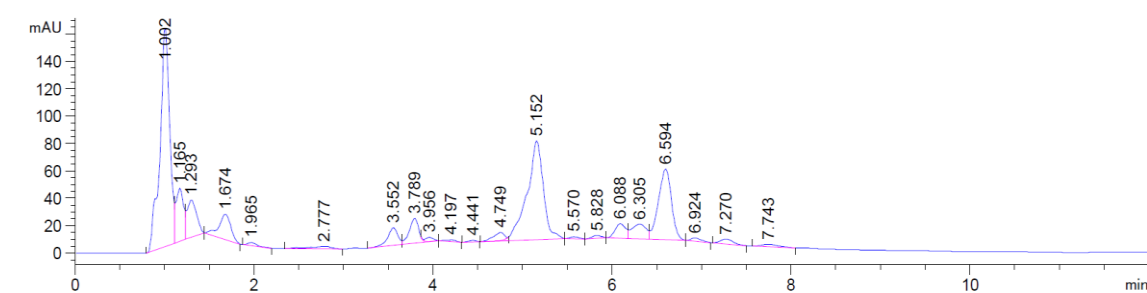
Plochy píků daidzinu na chromatogramech jsou velmi malé a nelze je vyhodnotit pomocí kalibračních přímk, proto není koncentrace daidzinu v tomto případě stanovena. Koncentrace genisteinu odpovídala 207 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace daidzeinu odpovídala 27 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.5 Vzorek č. 5

V biologickém vzorku č. 5 byly nalezeny píky, jejichž retenční časy odpovídaly retenčním časům daidzinu ($t_R = 3,6$ min), glycitinu ($t_R = 3,8$ min) a genisteinu ($t_R = 5,6$ min).



Obr. 27 Chromatogram biologického vzorku č. 5, $\lambda = 249$ nm



Obr. 28 Chromatogram biologického vzorku č. 5, $\lambda = 260$ nm

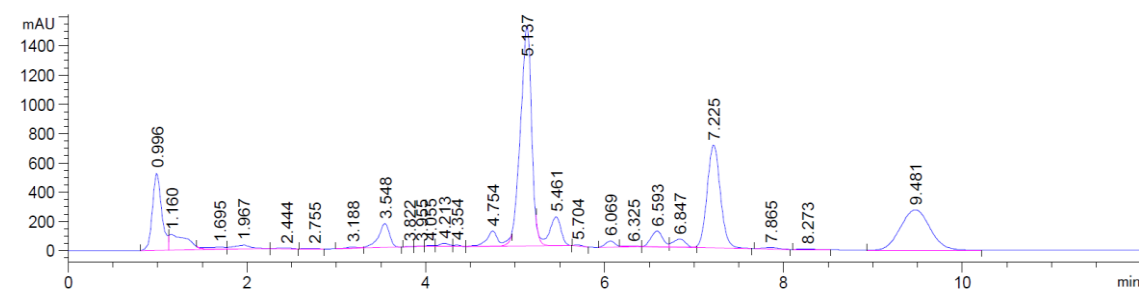
Tab. 17 Plochy píků ve vzorku č. 5

	249 nm			260 nm		
	plocha píku [mAU]			plocha píku [mAU]		
	daidzin	Glycitin	genistein	daidzin	glycitin	genistein
1	100,8	106,8	7,0	81,3	115,4	11,3
2	108,8	111,7	7,5	88,1	121,3	7,9
3	125,4	121,0	8,7	104,5	136,5	9,4
průměr	111,7	113,2	7,7	84,7	118,4	9,5

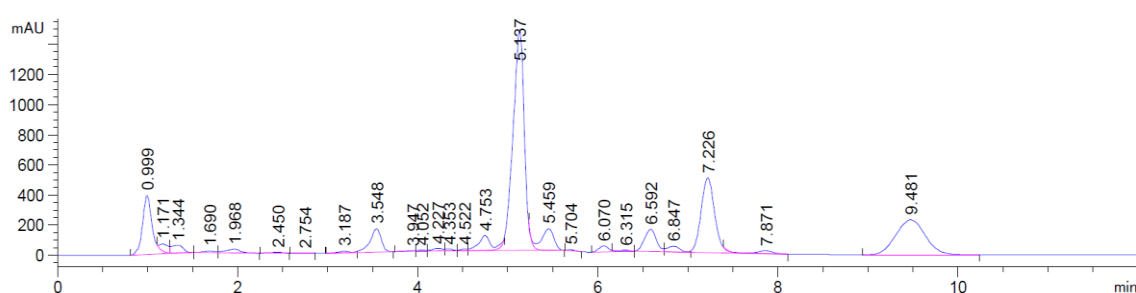
Koncentrace daidzinu vypočtená dosazením do rovnice lineární regrese odpovídala 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace genisteinu odpovídala 13 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace glycitinu odpovídala 1 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.6 Vzorek č. 6

V biologickém vzorku č. 6 byly nalezeny píky, jejichž retenční časy odpovídaly retenčním časům daidzinu ($t_R = 3,6$ min), genistinu ($t_R = 5,7$ min) a daidzeinu ($t_R = 9,5$ min).



Obr. 29 Chromatogram biologického vzorku č. 6, $\lambda = 249$ nm



Obr. 30 Chromatogram biologického vzorku č. 6, $\lambda = 260$ nm

Tab. 18 Plochy píků ve vzorku č. 6

	249 nm			260 nm		
	plocha píku [mAU]			plocha píku [mAU]		
	daidzin	genistin	daidzein	daidzin	genistin	daidzein
1	1168,4	33,2	6273,6	1104,8	28,3	5245,5
2	1218,3	31,9	6082,8	1151,2	27,5	5087,4
3	1436,8	44,4	6338,9	1359,7	37,8	5302,7
průměr	1193,4	32,6	6231,8	1205,2	27,9	5211,9

Koncentrace daidzinu vypočtená dosazením do rovnice lineární regrese odpovídala 9 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace genistinu odpovídala 0,003 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace daidzeinu odpovídala 54 $\mu\text{g/ml}$.

Tab. 19 Koncentrace jednotlivých isoflavonů v biologických vzorcích (při 249 nm)

	koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]				
	daidzin	daidzein	Genistein	genistin	Glycitin
vzorek č. 1	0,1	-	62,2	-	-
vzorek č. 2	0,84	-	-	-	-
vzorek č. 3	- 1,4	27,2	-	-	-
vzorek č. 4	- 1,4	27,2	207,7	-	-
vzorek č. 5	0,3	-	13,2	-	1,2
vzorek č. 6	8,5	54,4	-	0,002	-

Tab. 20 Koncentrace jednotlivých isoflavonů v biologických vzorcích (při 260 nm)

	koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]				
	daidzin	daidzein	Genistein	genistin	Glycitin
vzorek č. 1	0,1	27,5	434,4	-	-
vzorek č. 2	0,72	-	216,8	-	-
vzorek č. 3	- 0,7	27,3	392,7	-	-
vzorek č. 4	- 0,7	27,3	206,5	-	-
vzorek č. 5	0,7	-	12,8	-	1,0
vzorek č. 6	8,9	54,5	-	0,003	-

Z tab. 19 a 20 vyplývá, že volné formy isoflavonů byly obsaženy ve vzorcích ve vyšších koncentracích než formy glykosylované. Je tedy možné, že došlo k rozpadu glykosidické vazby glykosylovaných isoflavonů ve vzorcích, čímž se zvýšila koncentrace volných forem isoflavonů.

Na chromatogramech všech vzorků biologického materiálu byl nalezen pík daidzinu. V některých případech však nebyly plochy píku daidzinu vyhodnotitelné. Tuto nevýhodu by bylo možné řešit zvýšením objemu nástřiku. K tomu by bylo nutné naměřit nové kalibrační závislosti.

Většina vzorků obsahovala daidzein a genistein. Jejich koncentrace ve vzorcích byly ale poměrně variabilní. Genistin byl ve velmi nízké koncentraci nalezen ve vzorku č. 6 a glycitinu byl obsažen ve vzorku č. 5. Nejvyšších koncentrací dosahoval genistein, nejnižších naopak genistin. V případě genisteinu je dále vidět u některých vzorků velký rozdíl v hodnotách zjištěných koncentrací při obou vlnových délkách. To je zřejmě možné přičíst vlivu biologické matrice, jejíž složky mohly znečistit pík genisteinu. Tuto hypotézu nebylo možné ověřit, protože nebyl k dispozici slepý vzorek. To samozřejmě vede k pochybnostem o čistotě píků dalších isoflavonů. Nedostupnost slepého vzorku je také důvodem, proč nemohla být stanovena selektivita metody, detekční limit a kvantitativní limit.

Kladem je, že u ostatních isoflavonů se koncentrace zjištěné při obou vlnových délkách velmi shodují.

5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo provést pilotní pokusy pro vývoj metody ke stanovení koncentrace vybraných isoflavonů ve vzorcích biologického materiálu pomocí HPLC pro výzkumné účely. Předmětem pokusů byly glykosylované formy (daidzin, genistin a glycitin) i volné formy (daidzein, genistein) isoflavonů.

Byly vyzkoušeny různé chromatografické podmínky a nakonec byla za vhodných chromatografických podmínek provedena kalibrace pro jednotlivé isoflavony při dvou vlnových délkách. Při všech pokusech byla používána UV detekce. Připravenou metodou bylo následně analyzováno 6 biologických vzorků, které pocházely z Katedry biochemických věd FaF UK.

Z výsledků vyplývá, že volné formy isoflavonů byly obsaženy ve vzorcích ve vyšších koncentracích než formy glykosylované. Pík daidzinu byl nalezen ve všech vzorcích biologického materiálu. Jeho plocha ale byla v některých případech tak malá, že koncentraci nebylo možné určit. Většina vzorků obsahovala i daidzein a genistein. Jejich koncentrace byly ale poměrně variabilní. Genistin byl v nízké koncentraci nalezen ve vzorku č. 6 a glycitinu byl obsažen ve vzorku č. 5.

Vyvinutá metoda je tedy principiálně schopná sloužit ke stanovenému účelu. Jejím kladem je, že bylo možné stanovovat koncentrace příslušných isoflavonů pomocí UV detekce při velice malém nástřiku (10 μ l), který by navíc bylo možné v případě potřeby zvýšit s ohledem na objem použité kolony. Již zmíněným dalším pozitivem je velmi dobrá shoda stanovených koncentrací při obou vlnových délkách.

Naproti tomu neexistence slepého vzorku vrhá na tuto metodu stín, protože nebylo možné ověřit její selektivitu.

V případě potřeby bude možné tuto metodu dále modifikovat, například otestováním fluorescenční detekce pro zvýšení citlivosti.

6. SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Přehled isoflavonů pro analýzu	26
Tab. 2 Složení gradientu mobilní fáze voda/acetonitril v průběhu analýzy	27
Tab. 3 Retenční časy isoflavonů, mobilní fáze - voda/acetonitril	28
Tab. 4 Složení gradientu mobilní fáze kyselina mravenčí/acetonitril 1 v průběhu analýzy.....	28
Tab. 5 Retenční časy isoflavonů, mobilní fáze – kyselina mravenčí/acetonitril 1	29
Tab. 6 Retenční časy isoflavonů, mobilní fáze – kyselina mravenčí/acetonitril 2	31
Tab. 7 Složení gradientu mobilní fáze kyselina mravenčí/acetonitril 2 v průběhu analýzy	31
Tab. 8 Kalibrační závislost genistinu	32
Tab. 9 Kalibrační závislost genisteinu	34
Tab. 10 Kalibrační závislost daidzinu	35
Tab. 11 Kalibrační závislost daidzeinu	37
Tab. 12 Kalibrační závislost glycitinu	38
Tab. 13 Plochy píků ve vzorku č. 1	41
Tab. 14 Plochy píků ve vzorku č. 2	42
Tab. 15 Plochy píků ve vzorku č. 3	43
Tab. 16 Plochy píků ve vzorku č. 4	45
Tab. 17 Plochy píků ve vzorku č. 5	46
Tab. 18 Plochy píků ve vzorku č. 6	47
Tab. 19 Koncentrace jednotlivých isoflavonů v biologických vzorcích (při 249 nm) ...	48
Tab. 20 Koncentrace jednotlivých isoflavonů v biologických vzorcích (při 260 nm) ...	48

7. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Struktura genistinu (22)	21
Obr. 2 Struktura daidzinu (22)	22
Obr. 3 Struktura glycitinu (22)	23
Obr. 4 Chromatogram daidzinu. Chromatografické podmínky: voda/acetonitril (gradientová eluce viz. tab. 2), průtok 0,5 ml/min, teplota 30 °C, nástřik 10 µl, spektrofotometrická detekce $\lambda = 249$ nm, $t_R = 3,6$ min	27
Obr. 5 Chromatogram daidzinu. Chromatografické podmínky: kyselina mravenčí/acetonitril (gradientová eluce viz. tab. 4), průtok 0,5 ml/min, teplota 30 °C, nástřik 10 µl, spektrofotometrická detekce $\lambda = 249$ nm, $t_R = 3,6$ min.....	29
Obr. 6 Chromatogram genistinu. Chromatografické podmínky: kyselina mravenčí /acetonitril v poměru 17:3, průtok 0,5 ml/min, teplota 30 °C, nástřik 10 µl, spektrofotometrická detekce $\lambda = 249$ nm	30
Obr. 7 Chromatogram daidzeinu. Chromatografické podmínky: kyselina mravenčí /acetonitril (gradientová eluce viz. tab. 4), průtok 0,5 ml/min, teplota 30 °C, nástřik 10 µl, spektrofotometrická detekce $\lambda = 249$ nm, $t_R = 40,8$ min.....	30
Obr. 8 Chromatogram daidzeinu. Chromatografické podmínky: kyselina mravenčí /acetonitril (gradientová eluce viz. tab. 7), průtok 0,5 ml/min, teplota 30 °C, nástřik 10 µl, spektrofotometrická detekce $\lambda = 249$ nm, $t_R = 23,3$ min.....	32
Obr. 9 Kalibrační křivka genistinu při 249 nm	33
Obr. 10 Kalibrační křivka genistinu při 260 nm	33
Obr. 11 Kalibrační křivka genisteinu při 249 nm	34
Obr. 12 Kalibrační křivka genisteinu při 260 nm	35
Obr. 13 Kalibrační křivka daidzinu při 249 nm	36
Obr. 14 Kalibrační křivka daidzinu při 260 nm	36
Obr. 15 Kalibrační křivka daidzeinu při 249 nm	37
Obr. 16 Kalibrační křivka daidzeinu při 260 nm	38
Obr. 17 Kalibrační křivka glycitinu při 249 nm	39
Obr. 18 Kalibrační křivka glycitinu při 260 nm	39
Obr. 19 Chromatogram biologického vzorku č. 1, $\lambda = 249$ nm	40
Obr. 20 Chromatogram biologického vzorku č. 1, $\lambda = 260$ nm	41
Obr. 21 Chromatogram biologického vzorku č. 2, $\lambda = 249$ nm	42
Obr. 22 Chromatogram biologického vzorku č. 2, $\lambda = 260$ nm	42

Obr. 23 Chromatogram biologického vzorku č. 3, $\lambda = 249$ nm	43
Obr. 24 Chromatogram biologického vzorku č. 3, $\lambda = 260$ nm	43
Obr. 25 Chromatogram biologického vzorku č. 4, $\lambda = 249$ nm	44
Obr. 26 Chromatogram biologického vzorku č. 4, $\lambda = 260$ nm	44
Obr. 27 Chromatogram biologického vzorku č. 5, $\lambda = 249$ nm	45
Obr. 28 Chromatogram biologického vzorku č. 5, $\lambda = 260$ nm	46
Obr. 29 Chromatogram biologického vzorku č. 6, $\lambda = 249$ nm	47
Obr. 30 Chromatogram biologického vzorku č. 6, $\lambda = 260$ nm	47

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

(1) KLIMEŠ J., et al. - Kontrola léčiv I. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0419-1

(2) SMOLKOVÁ-KEULEMANSOVÁ E. - 100. výročí objevu chromatografie - Život a dílo M. S. Cvěta, Chem. listy 97, 2003, 134-139

(3) KLOUDA P. - Moderní analytické metody. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863369-07-51

(4) NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M. - Moderní HPLC separace v teorii a praxi 1. Hradec Králové: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

(5) DOUŠA M. - Adsorbenty a chemicky vázané fáze. [online]. 2010 [cit. 2020-02-17]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>

(6) KLIMEŠ J., et al. - Kontrola léčiv II. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0818-9

(7) VRZÁŇOVÁ M., HERESOVÁ J. - Fytoestrogeny, Interní medicína pro praxi, 2003, 5(9). Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/int/2003/09/04.pdf>

(8) KŘÍŽOVÁ L., DADÁKOVÁ K., KAŠPAROVSKÁ J., KAŠPAROVSKÝ T. – Isoflavones, Molecules, 2019, 24(6)

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30893792>

(9) SLÍVA J. – Isoflavony v současné medicíně, Edukafarm monitor medicinae, 2006

Dostupné z: <http://www.edukafarm.cz/data/soubory/casopisy/24/isoflavony.pdf>

(10) KAŠPAROVÁ M. - Fytoestrogeny z jetele lučního, Praktické lékařství, 2013; 9(4-5).

Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2013/04/11.pdf>

(11) MORAVCOVÁ J., KLEINOVÁ T. - Fytoestrogeny ve výživě - přinášejí užitek nebo riziko? Chem. Listy 96, 2002, 282–289

Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2002_05_03.pdf

(12) CORNWELL T., COHICK W., RASKIN I. - Dietary phytoestrogens and health, Phytochemistry, 2004, 65(8)

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15110680>

(13) LAPČÍK O., SOSVOROVÁ L. - Fytoestrogeny a jejich využití v menopauze, Interní medicína pro praxi, 2011, 13(1).

Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2011/01/10.pdf>

(14) MORAVCOVÁ J. - Vliv fytoestrogenů na symptomy menopauzy a rakovinu prsu, Interní medicína pro praxi, 2008, 11(10).

Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2008/11/07.pdf>

(15) SLÍVA J. - Mechanismus účinku fytoestrogenů, Edukafarm Medinews, 2009. Dostupné z:

<http://www.edukafarm.cz/data/soubory/casopisy/38/fytoestrogeny.pdf>

(16) MIADOKOVÁ E. - Isoflavonoids – an overview of their biological activities and potential health benefits, Interdisciplinary Toxicology, 2009, 2(4)

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2984117/>

(17) Walter E. D. - Genistin (an Isoflavone Glucoside) and its Aglucone, Genistein, from Soybeans - Journal of the American Chemical Society, 1941, 63(12)

(18) POLKOWSKI K., MAZUREK P. A. - Biological properties of genistein, a review of in vitro and in vivo data, Acta Poloniae Pharmaceutica, 2000, 57(2)

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10934794>

(19) BARLOW J., JOHNSON J. A. P., SCOFIELD L. – Early Life Exposure to the Phytoestrogen Daidzein and Breast Cancer Risk in Later Years - Fact Sheet on the Phytoestrogen Daidzein, 2007. Dostupné z: https://www.zerobreastcancer.org/research/bcerc_factsheets_phytoestrogen_genistein.pdf

(20) SUN M.-Y., YE Y., XIAO L., RAHMAN K., XIAD W., ZHANG H. - Daidzein: a review of pharmacological effects. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2016, 13(3). Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v13i3.15>

(21) SONG T. T., HENDRICH S., MURPHY P. A. - Estrogenic Activity of Glycitein, a Soy Isoflavone, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(8)

Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf020260v>

(22) Sigma-Aldrich, [online]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html> [citace: 4.8.2020]

(23) SZYMCZAK G., WÓJCIAK-KOSIOR M., SOWA I., ZAPALA K., STRZEMSKI M., KOCJAN R.: Evaluation of isoflavone content and antioxidant activity of selected soy taxa, J. Food. Comp. Anal. 57 (2017), 40 - 48